



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS PELO FUNGO *Metarhizium anisopliae* UTILIZANDO RESÍDUOS AMILÁCEOS COMO SUBSTRATO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Natália Capeletti Guandalini
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Co-orientador (Ibilce/Unesp)

CAMPINAS
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

G931e Guandalini, Natália Capeletti
Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo
Metarhizium ansioptiae utilizando resíduos amiláceos como
substrato / Natália Capeletti Guandalini. – Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Co-orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Metarhizium ansioptiae*. 2. Alfa-Amilase. 3.
Amiloglicosidase. 4. Fermentação semi-sólida. 5. Farelo de
arroz. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Del Bianchi, Vanildo Luiz.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Study of the amylolytic enzymes production by *Metarhizium ansioptiae*
using chaff and rice bran as substrates.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Metarhizium ansioptiae*, Alpha-Amylase,
Amiloglicosidase, Solid state fermentation,
Rice bran.

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre
Crispin Humberto Garcia Cruz
Rodrigo de Oliveira Moraes
Victor Haber Pérez

Programa de Pós-Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Orientador)

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
(Membro)

Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes
(Membro)

Dr. Victor Haber Pérez
(Membro)

Dedico

*Aos meus pais, Camélio e Neide, pela
educação que recebi, pela dedicação,
carinho e amor.*

*Ao meu irmão Edson e cunhada Joelma
pelo carinho e apoio incondicional em
todas as minhas conquistas.*

*“Se as coisas são intangíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa*

*Põe quanto és
No mínimo que fazes*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho contei com a ajuda de pessoas especiais, as quais sou profundamente grata.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação neste trabalho, pela atenção e acima de tudo pela confiança.

Ao querido Prof. Dr. Vanildo Del Bianchi pela co-orientação, apoio, dedicação, paciência e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora pela atenção, correção e contribuição na finalização deste trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas - IBILCE-UNESP por disponibilizar recursos e instalações para a realização dos experimentos.

A amiga Gisele Bueno, pela especial ajuda na parte experimental, pelo bom humor incontestável e por tornar o laboratório um ambiente alegre e descontraído. Obrigada pela amizade e companheirismo.

As amigas Cíntia Kobori e Giovanna Pisanelli, que me acompanham desde a graduação, pela amizade, por me acolherem durante as visitas à Campinas e principalmente por me ajudarem e incentivarem nos momentos mais difíceis. Obrigada, meninas!

Ao amigo Daniel Kamiya pelo incentivo, pelas dicas, pela paciência com minhas dúvidas e pela ajuda com os problemas de informática.

Aos colegas de laboratório, especialmente a Fernanda Ferraz e aos colegas de pós graduação.

Ao Grupo Cerradinho, representado aqui por Andréa Sanches Fernandes e Ana Maria Taricano, por incentivarem a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio em todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão Edson e cunhada Joelma pela dedicação, pelo apoio e carinho, principalmente durante a realização dos experimentos.

A todos os amigos e aos que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

E finalmente, a Deus por me guiar em mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>xi</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xiv</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1.INTRODUÇÃO	<i>1</i>
2. OBJETIVOS	<i>3</i>
2.1. Objetivos gerais	<i>3</i>
2.1.1. Objetivos específicos	<i>3</i>
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	<i>4</i>
3.1. Fermentação semi-sólida	<i>4</i>
3.2. Tipos de substratos utilizados na fermentação semi-sólida	<i>5</i>
3.4. Tipos de reatores empregados na fermentação semi-sólida	<i>7</i>
3.5. Vantagens e desvantagens da FSS	<i>10</i>
3.6. Enzimas.....	<i>11</i>
3.6.1. Enzimas amilolíticas.....	<i>12</i>
3.6.1.1. Amido	<i>12</i>
3.6.1.2. Amilases	<i>13</i>
3.6.1.2.1. α -Amilase	<i>14</i>
3.6.1.2.2. β -amilase.....	<i>15</i>
3.6.1.2.3. Glicoamilase.....	<i>15</i>
3.6.1.2.4. Isoamilase	<i>15</i>
3.6.1.2.5. Pululanases.....	<i>15</i>
3.6.1.3 Efeito dos íons metálicos na atividade enzimática	<i>16</i>
3.6.2. Fatores que afetam a produção da enzima em FSS	<i>16</i>
3.6.2.1 Tamanho da partícula	<i>17</i>
3.6.2.2. Umidade.....	<i>18</i>
3.6.2.3. pH	<i>18</i>

3.6.2.4. Temperatura	18
3.6.2.5. Agitação	19
3.6.3. Aplicações industriais de amilases	19
3.6.3.1. Panificação	19
3.6.3.2. Liquefação e sacarificação do amido.....	20
3.6.3.3. Indústria têxtil	20
3.6.3.4. Indústria de papel	21
3.7. Microrganismos para FSS	22
3.7.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Microrganismos.....	25
4.2. Meio de manutenção	25
4.3. Inóculo	25
4.4. Meio para estudo da produção de enzimas	26
4.5. Análise do substrato	26
4.5.1. Determinação da umidade do substrato	26
4.5.2. Determinação do pH do substrato	26
4.6. Seleção da cepa padrão de <i>Metarhizium anisopliae</i> para realização dos ensaios fermentativos.....	26
4.7. Estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno.....	27
4.8. Estudo da influência de meio de cultivo, umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno.....	27
4.9 Extração da enzima.....	28
4.10 Determinação das atividades enzimáticas.....	29
4.10.1. Atividade de α -amilase.....	29
4.10.2 Atividade de amiloglicosidase.....	30
4.11 Determinação do pH e da temperatura ótimos	30
4.12 Determinação da estabilidade térmica e da estabilidade frente às variações de pH.....	31

4.13 Efeito de íons na atividade enzimática.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Análise do substrato a ser utilizado	32
5.2. Seleção da cepa padrão de <i>Metarhizium anisopliae</i> para utilização nos ensaios fermentativos.....	32
5.3. Estudo da influência do meio de cultivo e da umidade empregados na fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno.....	36
5.4 Estudo da influência do meio de cultivo, umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno.....	45
5.5. Caracterização físico-química das enzimas amilolíticas produzidas.....	56
5.5.1. Caracterização físico-química das enzimas quanto ao pH e temperatura ótimos	56
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE.....	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase, glicoamilase, isolamilase e pululanase. 14
- Figura 2.** Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa ATCC 60582 em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas. 33
- Figura 3.** Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa CG 291, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas. 33
- Figura 4.** Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa 3935, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas. 34
- Figura 5.** Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa 4516, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas. 35
- Figura 6.** Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído por (A) farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 47% de umidade; (B) farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 65% de umidade e (C) farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 74% de umidade. 37
- Figura 7.** Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído em (A) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 47% de umidade; (B) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade e (C) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 74% de umidade, em 480 horas de fermentação. 38
- Figura 8.** Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído por (A) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 47% de umidade; (B) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 65% de umidade e (C) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 74% de umidade, em 480 horas de fermentação. 39

Figura 9. Ensaio 1. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (4,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	45
Figura 10. Ensaio 2. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (4,5), umidade (50%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	46
Figura 11. Ensaio 3. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (6,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	47
Figura 12. Ensaio 4. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (6,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	47
Figura 13. Ensaio 5. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (4,5), umidade (70%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	48
Figura 14. Ensaio 6. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (4,5), umidade (70%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	49
Figura 15. Ensaio 7. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (6,5), umidade (70%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo <i>M. anisopliae</i> ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.	49
Figura 16. Ensaio 8. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (6,5), umidade (70%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção	

de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas. 50

Figura 17. Ponto central com três repetições. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (7/3 – p/p), pH (5,5), umidade (60%) e concentração de esporos (2×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas. 51

Figura 18. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) produzidas através de fermentação semi-sólida em farelo de arroz pelo fungo *M. anisopliae* ATCC 60582..... 56

Figura 19. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) produzidas através de fermentação semi-sólida em farelo de arroz pelo fungo *M. anisopliae* ATCC 60582..... 57

Figura 20. Estabilidade da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) frente às variações de pH..... 58

Figura 21. Estabilidade da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) frente às variações de temperatura. 58

Figura 22. Efeito dos íons na atividade enzimática de α -amilase..... 60

Figura 23. Efeito dos íons na atividade enzimática de amiloglicosidase..... 60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis independentes (fatores) utilizadas no estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado. ... 28
- Tabela 2.** Ensaios realizados no estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado. 28
- Tabela 3.** Análise dos substratos utilizados nos ensaios fermentativos..... 32
- Tabela 4.** Média e desvio padrão das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase produzidas por cepas de *Metarhizium anisopliae*. 35
- Tabela 5.** Média e desvio padrão das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase produzidas ao longo de 480 horas de fermentação, por *M. anisopliae* ATCC 60582, em variados meios de cultivo e umidade. 42
- Tabela 6.** Valores máximos de atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase, relacionados ao tempo de fermentação, por *M. anisopliae* ATCC 60582, em variados meios de cultivo e umidade..... 42
- Tabela 7.** Resultados das médias e desvio padrões das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase, obtidos através de ensaios realizados do planejamento experimental 2^{4-1} fracionado. 52
- Tabela 8.** Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, para produção de α -amilase. 53
- Tabela 9.** Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, para produção de amiloglicosidase. 53
- Tabela 10.** Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, considerando a média das produções de α -amilase e amiloglicosidase durante 480 horas de fermentação..... 54
- Tabela 11.** Efeito dos íons na atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase. 59

Tabela 1A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i> em meio constituído por farelo e casca de arroz.....	73
Tabela 2A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por <i>M. anisopliae</i> em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 6/4 (p/p) e com variados níveis de umidade.....	74
Tabela 3A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por <i>M. anisopliae</i> em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 7/3 (p/p) e com variados níveis de umidade.....	75
Tabela 4A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por <i>M. anisopliae</i> em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 8/4 (p/p) e com variados níveis de umidade.....	76
Tabela 5A. Valores de atividade enzimática de α -amilase, obtidas através de FSS por <i>M. anisopliae</i> em planejamento experimental 2^{4-1} , variando meio de cultivo, umidade, pH e concentração e inóculo.....	77
Tabela 6A. Valores de atividade enzimática de α -amilase, obtidas através de FSS por <i>M. anisopliae</i> em planejamento experimental 2^{4-1} , variando meio de cultivo, umidade, pH e concentração e inóculo.....	78

RESUMO

O fungo *Metharhizium anisopliae* tem sido empregado no biocontrole de insetos em diferentes regiões do Brasil, com aplicação principal em lavouras de cana-de-açúcar. O processo de biocontrole envolve a adesão dos esporos do fungo à superfície do inseto, a destruição do mesmo através da pressão mecânica das hifas, além de processos de digestão enzimática de proteínas, quitinas e lipídeos. Por esse motivo, estudos indicam a viabilidade da produção de amilases, proteases, lipases e quitinases pelo fungo. Além disso, este fungo tem sido objeto de estudos como produtor de *swainsonine*, um alcalóide com ação potencial na inibição da metástase celular e do crescimento primário de tumores, sendo promissora a sua utilização em tratamentos contra o câncer e AIDS. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial amilolítico de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Para a produção das enzimas utilizou-se fermentação em meio sólido. Para tanto, o microrganismo mantido em meio BDA foi inoculado através da suspensão de células na concentração de 10^7 esporos/g em 10 g de meio farelo e casca de arroz, em proporções de 7/3 (p/p), 6/4 (p/p) e 8/2 (p/p). A umidade inicial dos meios de cultivo variou em 47%, 65% e 74%. A fermentação ocorreu em sacos de polipropileno, os quais foram mantidos a 28°C durante 480 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas. No extrato enzimático obtido foram determinadas as atividades de α -amilase e de amiloglicosidase. Para o estudo da influência da interação de fatores como meio de cultivo, umidade, pH e concentração de esporos na produção das enzimas em estudo, foi utilizado um planejamento experimental 2^{4-1} , onde se observou que o pH apresenta influência na produção de α -amilase. Para a produção de α -amilase e amiloglicosidase, observou-se que o melhor meio de cultivo foi o constituído por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p), com umidade de 47%. O pH ótimo para a atividade de α -amilase e de amiloglicosidase foi de 5 - 5,5, apresentando estabilidade numa faixa de 5 – 6,5 para a α -amilase e de 5,5 – 6 para a amiloglicosidase. A temperatura ótima para a atividade enzimática de α -amilase foi de 70°C e de 60°C para a amiloglicosidase, apresentando estabilidade numa faixa de 10 a 50°C. A atividade enzimática de α -amilase foi influenciada positivamente pelos íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} e EDTA, enquanto o íon Zn^{+2} influenciou negativamente a atividade da enzima. Para a amiloglicosidase, todos os íons testados apresentaram efeito negativo, com destaque para o Zn^{+2} que apresentou a maior redução na atividade enzimática.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, α -amilase, amiloglicosidase, fermentação semi-sólida, farelo de arroz.

ABSTRACT

The fungus *Metharhizium anisopliae* has been used as biocontrol agent, acting on insects in different areas of Brazil, with main application in sugarcane farmings. Such a biocontrol process involves the adhesion of the fungus spores to the surface of the insect, destruction of the same through the mechanical pressure of the hyphal, as well the processes of enzymatic digestion of proteins, chitins and lipids. For that reason, studies indicate the viability of the production of amylases, proteases, lipases and chitinases by this fungus. Besides, it is object of studies as producer of *swainsonine*, an alkaloid with potential action in the metastasis cellular and in the primary growth of tumors, being promising its use in treatments against the cancer and AIDS. The objective of this work was to evaluate the amylolytic potential of the strains of *Metharhizium anisopliae*. For the enzymes production, it was utilized solid state fermentation. For that, the microorganism maintained in PDA media was inoculated through the suspension of cells in the concentration of 10^7 spores/g in 10 g of media constituted by bran and rice chaff, in proportions of 7/3 (p/p), 6/4 (p/p) and 8/2 (p/p). The initial moisture content of fermentation was varied on 47%, 65% and 74%. The experiments were carried in polypropylene bags, which were incubated at 28°C for 480 hours of fermentation, being removed from it, samples every 24 hours. From the crude enzymatic solution, there were determined the activities of α -amylase and the amiloglucosidase. For the study of the interaction of factors such as cultivation medium, moisture, pH and inoculum size in the enzymes production, a statistical design 2^{4-1} was used, where it was observed that the pH presents influence in the production of α -amylase. For the production of α -amylase and amiloglucosidase, it was concluded that the best cultivation medium is constituted by bran and rice chaff in the proportion 6/4 (p/p), with a moisture content of 47%. The optimum pH for α -amylase and amiloglucosidase was of 5 - 5,5, presenting stability in a pH range from 5 to 6,5 for the α -amylase and 5,5 to 6 for the amiloglucosidase activity. The best temperature for α -amylase activity was 70°C and 60°C for the amiloglucosidase, presenting stability in a range from 10 to 50°C. The α -amylase activity was influenced positively by the ions Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} and EDTA, while the ion Zn^{+2} influenced negatively the enzyme activity. For the amiloglucosidase, all of the tested ions presented negative effect, with prominence for Zn^{+2} that presented the largest reduction in the enzymatic activity.

Key-words: *Metarhizium anisopliae*, α -amylase, amiloglucosidase, solid state fermentation, rice bran.

1. INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, pertencendo à classe das hidrolases, entre as quais encontram-se a α -amilase, a β -amilase e a amiloglicosidase. Esta última produz glicose a partir do amido, a β -amilase produz maltose e a α -amilase dá origem as dextrinas.

Durante as últimas décadas, a liquefação e a sacarificação do amido por meio de enzimas vêm crescendo, devido ao aumento da produtividade do processo hidrolítico, à melhor qualidade do produto final e à economia de energia, quando comparado aos processos químicos. As enzimas amilolíticas são vantajosas devido a sua capacidade de catalisar reações contínuas sob condições moderadas, o que nem sempre é possível utilizando processos químicos, além destes apresentarem hidrólises não específicas e formação de produtos não desejados.

As aplicações das enzimas amilolíticas são inúmeras. De uma maneira geral, podem ser utilizadas sempre que seja necessária a hidrólise parcial ou total do amido. Na indústria de alimentos, as amilases são amplamente empregadas na obtenção de amido modificado, na produção de xaropes com elevado teor de glicose, na melhoria dos produtos de panificação e na indústria cervejeira.

A maioria das agro-indústrias gera, além do produto final, um grande volume de resíduos e subprodutos. Hoje, esses materiais podem ser aproveitados para a obtenção de produtos de alto valor comercial, através da sua utilização em bioprocessos, sendo substratos alternativos para a fermentação semi-sólida, além de ajudar a resolver os problemas de poluição, uma vez que esses resíduos não serão depositados no meio ambiente. Com o advento das inovações tecnológicas, principalmente na área de enzimas e fermentação, muitos novos caminhos têm sido abertos para a utilização destes resíduos. Os principais resíduos agro-industriais são farelo de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, casca de café, casca de maçã, polpa de beterraba, farelo de trigo, farelo e casca de arroz.

Nos últimos anos, a utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos e pragas tem recebido grande aumento de interesse. Um interessante candidato que se encontra amplamente distribuído na natureza e afeta mais de 200 espécies de insetos é o *Metarhizium anisopliae*. Este fungo tem sido empregado no controle biológico de pragas como *Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*, que atacam principalmente as lavouras de cana-de-açúcar. O processo de destruição das pragas envolve a adesão dos esporos do fungo à superfície do inseto, tendo continuidade nas fases de germinação, diferenciação, penetração e invasão da cutícula do inseto através do crescimento das hifas. Esta penetração ocorre devido à pressão mecânica das hifas e envolve processos de digestão enzimática de proteínas, quitinas e lipídeos. Estudos indicam a viabilidade da produção de amilases, proteases, lipases e quitinases pelo *Metarhizium anisopliae* (ALVES, 1998).

Outro importante fator a ser considerado é a capacidade que o *M. anisopliae* possui de produzir o *swainsonine*, um alcalóide com ação potencial contra componentes imunossupressivos encontrados em tumores de animais. Este alcalóide é utilizado na inibição da metástase celular e do crescimento primário de tumores. O *swainsonine* possui ação anti-metastática, antiproliferativa e imunomodulatória, sendo promissora a sua utilização em tratamento contra o câncer e a AIDS (PATRICK et al. 1996). Tradicionalmente, este alcalóide é obtido de extratos de plantas e sementes, que são fontes escassas e de baixo rendimento, sendo, por este motivo, bastante interessante à viabilidade da sua produção utilizando fermentações com o *M. anisopliae*.

Uma vez que o fungo *M. anisopliae* vem sendo produzido por diversas pequenas e médias empresas com a finalidade de se obter um biopesticida e o meio de cultura utilizado para a sua propagação é o arroz, torna-se evidente que, durante o período de fermentação, ocorre a produção de amilases.

Sendo assim, o objetivo central do presente estudo foi o de avaliar a produção de duas amilases, a α -amilase e a amiloglicosidase, visando verificar a possibilidade de além da produção de esporos do biopesticida, obter também um outro produto de valor comercial agregado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- ✓ Estudar a produção de enzimas amilolíticas pelo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio semi-sólido composto por farelo e casca de arroz.

2.1.1. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar uma cepa padrão, produtora de α -amilase e amiloglicosidase, para condução dos estudos da produção de enzimas amilolíticas pelo *M. anisopliae*.
- ✓ Estudar a influência da composição do meio de cultivo e da umidade na produção de α -amilase e amiloglicosidase pelo fungo *M. anisopliae*.
- ✓ Estudar o efeito da interação de variáveis como meio de cultivo, umidade, pH inicial do meio de cultivo e concentração de esporos, na produção de α -amilase e amiloglicosidase pelo *M. anisopliae*.
- ✓ Caracterizar as enzimas produzidas quanto ao pH e temperatura ótimos.
- ✓ Estudar a estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura.
- ✓ Estudar os efeitos dos íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Edta nas atividades enzimáticas das enzimas produzidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fermentação semi-sólida

A fermentação é utilizada há muito tempo na biotecnologia e é entendida como um processo no qual mudanças bioquímicas ocorrem num substrato orgânico, através da ação de catalisadores (enzimas), obtidos de microrganismos *in vivo* ou *in vitro* (ATKINSON, 1984).

De Bianchi *et al.* (2001) definem a fermentação semi-sólida (FSS) como processos que se referem à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está em um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida. É importante ressaltar que o substrato utilizado neste tipo de fermentação não tem necessariamente que ser insolúvel em água e, desta forma, ser sólido, uma vez que ocorrem exemplos em que o substrato líquido (solução de sacarose e de sais nutrientes ou melaço) está umedecendo uma matriz sólida inerte (sabugo de milho ou bagaço de cana).

A FSS tem sido utilizada desde a antiguidade, podendo ser observados vários tipos de alimentos que fazem parte da dieta de diversos povos já há muitos séculos e que são obtidos através de processos fermentativos. Exemplo típico disto é o *koji* que consiste em uma massa umidificada de um cereal cozido (na maior parte dos casos, arroz) na qual houve o crescimento de *Aspergillus oryzae* e conseqüentemente a produção de um complexo enzimático com atividade diastática (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). Outro exemplo interessante é o uso de *Penicillium roquefortii* para produção de queijo. Na China, a FSS tem sido extensivamente usada, desde os tempos antigos, para produzir alimentos fermentados como vinho chinês, molho de soja e vinagre (CHEN, 1992, citado por COUTO e SANRÓMAN, 2006). No Japão, a FSS é comercialmente usada para a produção de enzimas industriais (SURYANARAYAN, 2003), além de saquê, *shoyu* (molho de soja), *miso* (pasta de grãos de soja) e outros alimentos.

Nos últimos anos, a FSS tem atraído o interesse de pesquisadores, desde vários estudos para enzimas (PANDEY *et al.*, 1999), aromas (FERRON, BONNARAME, DURAND, 1996), corantes (JOHNS e STUART, 1991) e outras substâncias de interesse para a indústria de alimentos, sendo observado que a FSS pode dar rendimentos maiores ou melhores características de produto que a fermentação submersa (FSM) (ACUÑA-ARGUELLES *et al.*, 1994).

3.2. Tipos de substratos utilizados na fermentação semi-sólida

A natureza do substrato empregado é um requisito importante que afeta o processo de FSS e sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados ao custo e à disponibilidade e, por este motivo, pode envolver a utilização de vários resíduos agroindustriais. A utilização destes resíduos em FSS é vantajosa, pois, além de prover um substrato alternativo, atua solucionando problemas de poluição que seriam causados pela disposição destes materiais no meio ambiente (PANDEY *et al.*, 1999). Neste processo, os fungos filamentosos apresentam vantagens potenciais por serem capazes de penetrar em substratos rígidos (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004a).

No processo de FSS, o substrato sólido provê os nutrientes para a cultura e atua como um ancoradouro para as células microbianas (COUTO E SANRÓMAN, 2006). Também são conhecidos casos em que os nutrientes são solúveis em água (substrato líquido) e os microrganismos estão aderidos à uma matriz sólida, inerte ou não, que irá absorver o meio de cultura líquido (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). A utilização de substratos inertes também é interessante quando o meio de cultivo é constituído por partículas altamente higroscópicas, que compactam fortemente, ou então, quando as características físicas e geométricas do meio de cultivo são alteradas devido à degradação do meio por microrganismos, reduzindo a troca de gases e calor.

A utilização de meios constituídos por suportes inertes foi discutida por Ooijkaas *et al.* (2000), que relatam ser uma alternativa vantajosa para a FSS, uma vez que permite boa reprodutibilidade, facilitando os controles do processo e monitoramento das variáveis a serem estudadas.

Como substratos inertes sintéticos e naturais, pode-se utilizar vermiculite, perlite, grânulos de barro, polietileno, além de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz, entre outros, sendo que estes últimos somente são adequados a

processos em que os microrganismos possuem pouca ou nenhuma atividade lignolítica ou celulolítica (OOIJKAAS *et al.*, 2000).

De acordo com a fonte utilizada pelos microrganismos, os substratos podem ser divididos em três grupos: os que contêm amido, os que contêm celulose e lignocelulose e os que contêm açúcares solúveis como fonte de carbono. Dos substratos amiláceos, pode-se citar arroz, mandioca, farelo de trigo, farelo de arroz, sementes de milho e resíduos de batata doce. Em relação aos substratos celulósicos, encontram-se bagaço de cana de açúcar, palha de trigo, de milho e de arroz. Dentre os substratos sólidos contendo açúcares solúveis, pode-se citar polpas de uva e beterraba doce, restos de abacaxi, polpa de café, casca de laranja e de manga, entre outros (MITCHELL *et al.*, 2000).

Vandenbergh *et al.* (2000) utilizaram bagaço de mandioca, casca de café e bagaço de cana para produção de ácido cítrico por FSS.

Soares *et al.* (2000) produziram aromas de frutas através de fermentação semi-sólida de casca de café suplementada com diferentes concentrações de glicose, produzindo variadas intensidades de aromas de frutas como abacaxi e banana.

Pandey *et al.* (2000a) discutiram a importância da casca e da polpa de café nos processos biotecnológicos. Trata-se de substratos ricos por apresentarem compostos como cafeína, taninos e derivados fenólicos, podendo ser utilizados como meios de cultivo para processos fermentativos com o intuito de obter produtos de elevado valor agregado tais como enzimas, aromas, cogumelos, fertilizantes, entre outros. Através da hidrólise da casca, é possível obter xilose, arabinose, frutose, glicose e maltose.

Pandey *et al.* (2000b) relatam a importância do aproveitamento de resíduo de mandioca (30 – 50% de amido) em processos biotecnológicos para produção de enzimas, ácidos orgânicos, alimentos e cogumelos, através da fermentação semi-sólida.

3.3. Tipos de substratos empregados na produção de amilases

Recentemente, Ramachandran *et al.* (2004a) relataram o uso de torta de óleo de coco (COC) como um substrato para a produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* sob condições de FSS. O substrato cru favoreceu o crescimento da cultura, resultando na produção de 1.372 U/g de α -amilase em 24 h. Uma suplementação do substrato com

0,5% de amido e 1% peptona aumentou positivamente a síntese enzimática para 3.388 U/g, tornando o COC um substrato promissor para a produção de α -amilase.

Krishna e Chandrasekaran (1996) usaram talo de banana como substrato em FSS com *Bacillus subtilis*. Diferentes fatores como umidade inicial, tamanho da partícula do substrato, pré-tratamento do substrato, pH, temperatura de incubação, nutrientes adicionais, concentração de inóculo e período de incubação, na produção de α -amilase, foram caracterizados. Os resultados obtidos através da otimização do processo mostraram claramente o impacto dos parâmetros analisados no rendimento das enzimas tanto quanto sua influência na capacidade de estimular os organismos para sintetizar a enzima.

Selvakumar *et al.* (1997) utilizaram resíduos de chá suplementados com minerais para a síntese de glicoamilase, utilizando uma linhagem de *Aspergillus niger* NCIM 1248, obtendo a máxima produção enzimática após 96 horas de fermentação a 60% de umidade e pH 4,5.

Rahardjo *et al.* (2005) estudaram o efeito da porosidade do meio constituído de farelo e grãos de trigo na produção de α -amilase durante o crescimento do *A. oryzae*. Os resultados mostraram que o aumento da porosidade do meio de cultivo aumentou a produção da enzima e as taxas de captação de oxigênio.

Francis *et al.* (2003) utilizaram torta de malte (resíduos de cereais da indústria cervejeira), adicionados de Tween-80 ou íons cálcio como substrato para FSS, visando a produção de α -amilase. O modelo estatístico utilizado mostrou que o aumento da produção enzimática se dá a uma temperatura de incubação de 30°C, umidade inicial do substrato de 70% e taxa de inóculo a 1×10^7 esporos/mL. Nestas condições houve um aumento de 20% na produção enzimática.

3.4. Tipos de reatores empregados na fermentação semi-sólida

Existem poucos modelos de bioreatores operando em condições de estado semi-sólido disponíveis na literatura. Isto se deve, principalmente, aos problemas encontrados no controle de diferentes parâmetros de processo, como pH, temperatura, aeração, transferência de oxigênio e umidade.

Apesar da FSS ser menos susceptível a contaminações microbiológicas que a fermentação submersa (FSM), ela apresenta consideráveis desvantagens que afetam o

desempenho do processo e devem ser consideradas no desenvolvimento de reatores, tais como: resistência à transferência de nutrientes, concentração de gases e geração de gradientes de calor no meio de cultivo (GERVAIS e MOLIN, 2002).

Vários tipos e modelos de reatores têm sido propostos em estudos de bancada ou em escala industrial. Abaixo estão descritos os tipos mais comuns:

Reatores de vidro: são os primeiros e mais comumente utilizados em laboratório. Os frascos de Erlenmeyer são utilizados pela facilidade de manuseio durante as pesquisas. Porém, quando se fala em ampliação do processo, esses frascos deixam a desejar devido a problemas de aeração, troca de calor, umidade, etc. Muitos trabalhos de pesquisa em bancada são realizados utilizando esses frascos visando principalmente à produção de enzimas por FSS.

Bandeja: Consiste em bandejas planas, onde o substrato é espalhado sobre cada bandeja formando uma camada fina, variando de 2 a 7 cm. O reator é mantido em uma câmara em temperatura constante onde circula ar umedecido. As bandejas devem ser perfuradas para que haja aeração através da superfície inferior do meio de cultivo. A mão-de-obra é a principal desvantagem deste modelo, além da necessidade de numerosas bandejas e grande volume (espaço) requerido, tornando-o assim um reator sem grandes atrativos para a produção em escala industrial (PANDEY *et al.*, 2001 citado por COUTO e SANRÓMAN, 2006).

Leito empacotado / Tubular vertical: É normalmente composto de uma coluna de vidro ou plástico com o substrato sólido retido em uma base perfurada. O ar umedecido é continuamente forçado pelo leito de substrato (RODRÍGUEZ-COUTO *et al.*, 2000). Pode ser provido com uma jaqueta para circulação de água para controlar a temperatura durante a fermentação, o que nem sempre é efetivo devido à baixa transferência de calor através do substrato. As principais desvantagens associadas a este reator são: dificuldades em extrair o produto, baixa uniformidade do crescimento microbiano e baixa remoção de calor.

Tubular horizontal: Este modelo permite aeração adequada e mistura do substrato. A mistura é realizada girando o recipiente inteiro ou por vários dispositivos de agitação como pás. (PRADO *et al.*, 2004). Sua desvantagem principal é o custo elevado

do processo, uma vez que o tambor é preenchido com somente 30% da capacidade, pois, caso contrário, a mistura torna-se ineficiente.

Leito fluidizado: Para evitar a adesão e a agregação de partículas de substrato, este modelo provê uma agitação contínua com ar forçado. Embora seja possível aumentar a transferência de calor e de massa, a aeração e a mistura do substrato, ainda ocorrem formação de gradientes de temperatura, prejudicando a fermentação (COUTO e SANRÓMAN, 2006).

Embalagens plásticas: geralmente estas embalagens são constituídas de polipropileno, uma vez que este material suporta altas temperaturas de esterilização e são permeáveis ao oxigênio e ao gás carbônico. São de baixo custo e fácil manuseio, permitindo uma boa homogeneização do material e reduzindo as perdas de amostras principalmente por quebra de frascos (COSTA, 1996).

Diferentes estudos foram conduzidos a respeito da produção de alimentos naturais e aditivos derivados de microrganismos em bioreatores de diferentes configurações.

Medeiros *et al.* (2001) estudaram a produção de compostos aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* utilizando bagaço de mandioca através de FSS em reatores de leito empacotado, testando duas diferentes taxas de aeração. A análise do *headspace* da cultura através de cromatografia gasosa mostrou a produção de 11 compostos, dentre os quais predominaram acetato de etila, etanol e acetaldeído. O aroma frutal foi atribuído à produção de ésteres.

Navarrete-Bolaños *et al.* (2004) empregaram um bioreator de tambor giratório modular, equipado com entrada para injeção de ar, bombas de vazões variáveis, umidificadores e análises de gases para extração de xantofilas de flores de calêndula, que são comercializadas internacionalmente e usadas como aditivos em indústrias de alimentos e farmacêuticas. Baseado em estratégias experimentais de otimização de parâmetros, ótimos valores de operação foram encontrados para aeração, umidade, agitação e concentração de inóculo em FSS usando como substrato flores de calêndula inoculadas com uma cultura composta por três microrganismos (*Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus* e *Rhizopus nigricans*), conduzindo a um rendimento de xantofilas de 17,8 g/kg peso seco. Este valor representou um aumento de 65% em relação ao controle.

Milagres et al. (2004) mostraram que *Thermoascus aurantiacus* pode produzir um alto nível de xilanase termoestável quando bagaço de cana é usado como substrato em um reator de coluna de vidro com aeração forçada. A taxa de corrente de ar teve um efeito significativo na atividade enzimática, ao contrário da concentração inicial de bagaço. O maior rendimento de xilanase (1597 U/g) ocorreu a uma taxa de corrente de ar equivalente a 6 l/h g e com 8g de substrato.

3.5. Vantagens e desvantagens da FSS

Conforme discutido anteriormente, a FSS é empregada em virtude da baixa solubilidade do substrato, dos baixos níveis de investimento exigidos pelo processo, além da possibilidade de aproveitamento dos resíduos agroindustriais para a produção de metabólitos de elevado valor agregado e de grande interesse comercial.

A FSS apresenta vantagens econômicas e industriais, tais como: alta concentração dos produtos, baixa quantidade de resíduo aquoso gerado, meio de cultivo simples, ausência de um controle rigoroso dos parâmetros de cultivo, menor exigência de água e facilidade de controle de contaminações microbianas (BECERA e SISO, 1996).

Para a FSS, em relação à FSM, a aeração forçada é mais fácil de ser usada, pois os espaços interpartículas facilitam as trocas gasosas entre as superfícies, porém este tipo de aeração pode criar caminhos preferenciais, dificultando a dispersão homogênea do oxigênio ao meio (BAJRACHARYA e MUDGETT, 1980).

Quanto à avaliação da biomassa produzida, este é um fator fundamental para a caracterização do crescimento microbiano. No entanto, para FSS faltam mecanismos de controle sofisticados que são normalmente usados na FSM. O controle do ambiente dentro dos bioreatores também é difícil de alcançar, particularmente temperatura e umidade (COUTO e SANRÓMAN, 2006).

Sabe-se que a transferência de massa ocorre nas fases sólida, líquida e gasosa na FSS, enquanto o crescimento e o metabolismo microbiano ocorre na maioria das vezes na fase líquida. Na fase gasosa, o oxigênio pode ser transferido para o local de atividade microbiana, enquanto o CO₂, ou outro gás inibidor da atividade, é removido. Nas fases sólida e aquosa, os nutrientes dissolvidos no meio fazem com que as enzimas migrem para as partículas sólidas e os produtos formados sejam levados para longe do local de reação. Porém, a limitação do processo de difusão interpartícula, devido a uma série de fatores como tamanho da partícula, porosidade e fluxo de gases, podem ser um

fator limitante ao crescimento microbiano. Este tipo de limitação não ocorre nos processos submersos, onde os nutrientes e metabólitos estão melhor distribuídos, evitando desta forma, a formação de ligações secundárias ao redor dos microrganismos, que limitam drasticamente o fenômeno de difusão de nutrientes e metabólitos, além de dificultar a remoção de calor do meio de cultivo (GERVAIS e MOLIN, 2002).

Para melhorar a transferência de massa e calor, têm sido estudadas diferentes formas de agitação e rotação. No entanto, estes têm efeitos adversos na porosidade do meio e rompem o micélio do fungo, prejudicando o crescimento microbiano e a síntese dos produtos desejados (COUTO e SANRÓMAN, 2006).

3.6. Enzimas

As enzimas são proteínas que aceleram certas reações químicas por promoverem um mecanismo alternativo, no qual a barreira da energia de ativação é menor do que na reação sem sua presença. São produzidas pelas células vivas e, uma vez sintetizadas por uma célula, poderão atuar independentes desta, se forem mantidas as condições apropriadas. Uma das características de destaque das enzimas é sua especificidade pelo substrato. Suas propriedades adicionais são a atividade em baixa concentração, a rapidez de ação e a não toxicidade. Em consequência do estudo das enzimas, esses catalisadores têm sido empregados na síntese orgânica, em procedimentos analíticos e em processos industriais. O uso de enzimas em processos de tecnologia de alimentos é vantajoso porque, dentre outras razões, elas são específicas, não necessitam de temperaturas elevadas para a reação e não formam produtos indesejáveis (LEHNINGER, 1976).

Segundo o mesmo autor, as enzimas podem ser obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores, animais superiores e microrganismos. No entanto, as enzimas vegetais requerem o cultivo de grande quantidade de plantas para a produção de uma quantidade relativamente pequena de enzima, sendo sua produção praticável somente em regiões onde exista grande disponibilidade de terra e os custos operacionais não sejam elevados. As enzimas de origem animal são subprodutos de indústrias de produtos cárneos, onde o suprimento é limitado e, por essa razão, no caso da necessidade de uma grande demanda da enzima, o estoque existente é insuficiente. Já as enzimas microbianas não apresentam qualquer limitação de produção ou suprimento, quando

comparadas às enzimas vegetais e animais, sendo possível aumentar a produção sempre que houver necessidade.

Além disso, a diversidade de enzimas microbianas úteis é quase sem limite e o desenvolvimento de novos métodos de fermentação para a obtenção desse produto tem assegurado um suprimento ilimitado, ao mesmo tempo em que tornou possível o surgimento de sistemas enzimáticos que não puderam ser obtidos das fontes animais e vegetais.

Atualmente, existe uma tendência de substituir as enzimas vegetais e animais por enzimas de origem microbiana. Essa preferência fundamenta-se na possibilidade de sua aplicação nos mais variados processos biotecnológicos, pois, em função da grande variedade de espécies de linhagens microbianas, é possível o isolamento de enzimas com características diversificadas, que podem ser aplicadas às mais variadas condições físico-químicas, permitindo que cada processo possa ser realizado pelo tipo de enzima que melhor se adapte a ele.

3.6.1. Enzimas amilolíticas

3.6.1.1. Amido

O amido é o polissacarídeo de reserva das plantas, sintetizado como resultado da fotossíntese, podendo ser encontrado em tubérculos, sementes e raízes. Nestas organelas, grandes quantidades de amido são acumuladas como grânulos insolúveis em água, sendo que a forma e o diâmetro destes grânulos depende da sua origem botânica (VAN DER MAAREL *et al.*, 2001).

Quimicamente, o amido é um polímero de glicose, formado por ligações glicosídicas, as quais são estáveis a pH elevado, mas são hidrolisadas em pH baixo. No final da cadeia polimérica, encontra-se um grupo aldeído, que é conhecido como final redutor. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose e amilopectina (VAN DER MAAREL *et al.*, 2001).

A amilose é um polímero linear constituído de aproximadamente 6000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4 e o número de unidades varia de acordo com a origem. Por exemplo, a amilose da batata ou tapioca tem aproximadamente 1000 - 6000 unidades de glicose, enquanto a amilose de trigo ou milho varia entre 200 -1200 unidades.

A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, constituída por resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4, das quais partem ramificações unidas por ligações α -1,6. A média de ramificações na amilopectina é de aproximadamente 5%, sendo bastante variável de acordo com a origem botânica. A molécula de amilopectina pode chegar a possuir até 2.000.000 de unidades de glicose, o que a torna uma das maiores moléculas da natureza. Enquanto a amilopectina é solúvel em água, a amilose sozinha é insolúvel em água fria.

O amido é hidrocolóide mais comumente utilizado na indústria de alimentos devido ao seu custo relativamente baixo. Também é extensivamente usado na indústria têxtil, metalúrgica, farmacêutica, celulósica e de plásticos. Tem um amplo intervalo de propriedades funcionais e pode ser usado em forma natural ou em forma modificada. Várias modificações físicas, químicas e enzimáticas melhoram as propriedades funcionais que permitem uma gama extensiva de aplicação. A hidrólise do amido é um modo fácil de produção de carboidratos com propriedades funcionais especiais. O recente desenvolvimento de enzimas tem melhorado o processamento de amido, tanto econômica quanto tecnicamente (MOORE *et al.*, 2005).

3.6.1.2. Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, pertencendo à classe das hidrolases, dentre as quais encontram-se a α -amilase, a β -amilase e a amiloglicosidase. Esta última produz glicose a partir do amido, a β -amilase produz maltose e a α -amilase dá origem às dextrinas. Estas enzimas possuem grande importância biotecnológica com aplicações em alimentos, fermentação, indústria têxtil e de papel.

Amilases podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos. Atualmente, grande quantidade de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem substituído quase completamente a hidrólise química do amido (GUPTA *et al.*, 2003).

As amilases são classificadas como endoamilases ou exoamilases conforme seu ponto de atuação.

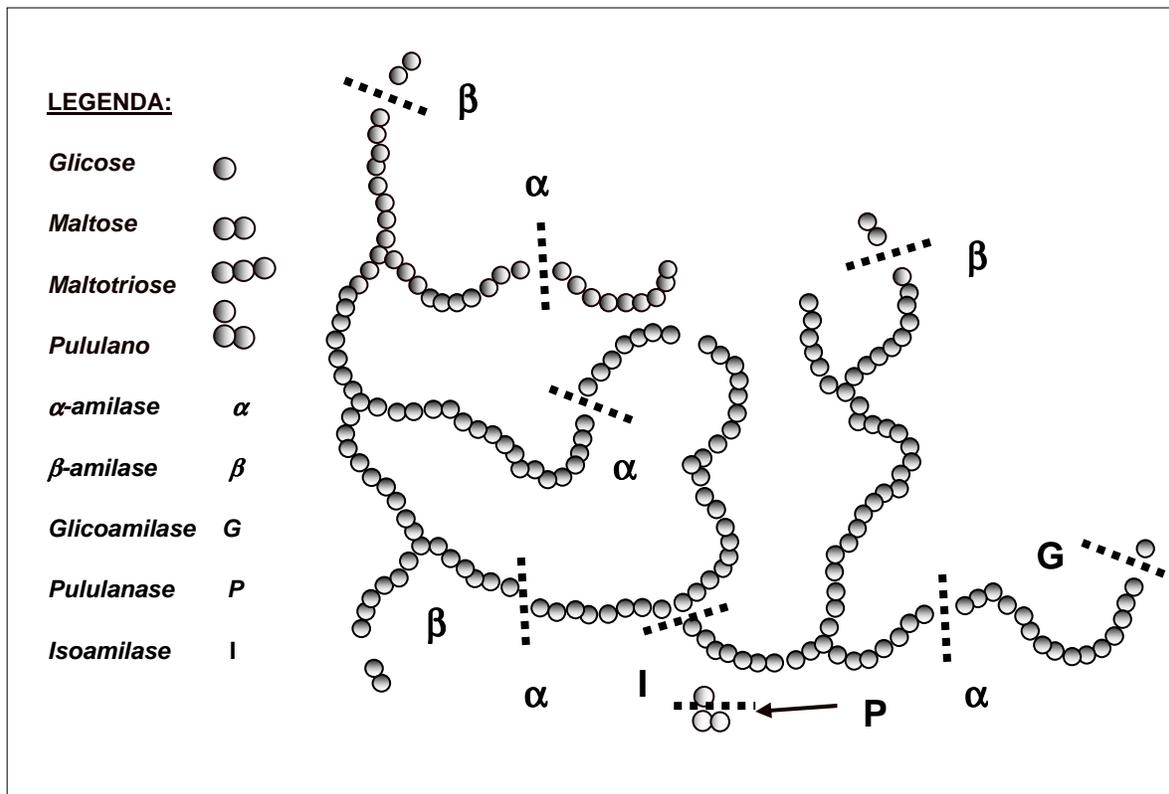


Figura 1. Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase, glicoamilase, isolamilase e pululanase.

3.6.1.2.1. α -Amilase

Pertencem à classe das endoamilases, atuando ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos. As ligações α -(1,6) não são quebradas por esta enzima. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases sacarificantes que hidrolisam de 50 a 60% do substrato, e as liqueficientes, que quebram 30 a 40% do substrato. De maneira geral, esta enzima ataca os grânulos de amido, formando dextrinas que serão hidrolisadas pela β -amilase (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

A ação da α -amilase sobre a amilose consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose e em seguida uma etapa mais lenta permite a formação de glicose e maltose.

A hidrólise da amilopectina pela α -amilase produz oligossacarídeos contendo ligações α -(1,6), além de glicose e maltose.

3.6.1.2.2. β -amilase

Trata-se de uma exoenzima que hidrolisa ligações β -(1,4) a partir da extremidade não redutora, produzindo maltose, não sendo capaz de hidrolisar ligações α -1,6 dos substratos ramificados, ou seja, esta enzima é bloqueada por ramificações ou outras irregularidades na cadeia. Assim, a amilopectina é apenas parcialmente degradada pela β -amilase (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

3.6.1.2.3. Glicoamilase

A ação desta enzima é similar à da β -amilase, pois são exoamilases que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio através da hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4, removendo sucessivas unidades de glicose.

Entretanto, as glicoamilases têm capacidade de hidrolisar tanto ligações α -(1,4) como α -(1,6), mas, para esta última, com uma velocidade muito menor. A princípio, estas enzimas podem degradar a molécula de amido completamente, produzindo glicose. Na prática, entretanto, isso só ocorre em incubações por longos períodos, provavelmente devido às irregularidades da molécula de amilose (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

3.6.1.2.4. Isoamilase

Esta enzima ataca ligações α -(1,6) do amido e atua sem necessidade de diminuição das ramificações de polímeros naturais. Para a hidrólise, esta enzima requer no máximo três unidades de glicose na ramificação (ANTO *et al.*, 2006).

3.6.1.2.5. Pululanases

São enzimas desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e

que não pode ser degradado por α ou β -amilase. O produto desta hidrólise corresponde às maltotrioses. Dentro desta categoria, estão também as isopululanases que são enzimas que quebram também as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, mas que não têm nenhuma atividade sobre o amido (ANTO *et al.*, 2006).

3.6.1.3 Efeito dos íons metálicos na atividade enzimática

Sabe-se que para a atividade da α -amilase é necessária a presença de Ca^{+2} como cofator e as amilases de origem diferentes se diferenciam pela força de ligação com o cálcio. Segundo Bruchmann (1980), tem sido demonstrado que as α -amilases privadas deste íon carecem de atividade. O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH. Apesar de não participar diretamente na formação do complexo enzima-substrato, o cálcio mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade. Na prática, é importante a presença deste íon para garantir que a enzima permaneça completamente ativa. Na verdade, traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar enzimas sem adição de cálcio. Entretanto, a adição de sais de cálcio é recomendada para alcançar máxima proteção das enzimas contra desnaturação pelo calor.

Martins *et al.* (2002), estudando a α -amilase produzida por uma linhagem de *Bacillus* sp, relatam que a enzima foi fortemente inibida pelos íons Co^{2+} , Cu^{2+} e Ba^{2+} , mas foi menos afetada por Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} . Pires *et al.* (2002), analisando a influência dos íons na atividade enzimática de amilase da mandioquinha-salsa, constataram que a presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} provoca um aumento na atividade enzimática, enquanto que íons de Cu^{2+} causam uma diminuição.

3.6.2. Fatores que afetam a produção da enzima em FSS

A máxima produtividade enzimática, ou seja, a maior produção em um menor tempo, é o objetivo dos processos biotecnológicos. Considerando isto, várias estratégias, como, desenvolvimento de linhagens, otimização do meio de cultivo e do bioprocessamento, além de modelagem matemática, têm sido bastante estudadas. Ao desenvolver uma

fermentação industrial, a seleção do meio de cultivo é de fundamental importância. Concentrações de metabólitos e crescimento do fungo são fortemente influenciados pela composição do meio, como fonte de carbono, nitrogênio e sais inorgânicos.

A otimização do processo pode envolver o estudo de parâmetros biológicos e físico-químicos, incluindo formulação do meio e parâmetros de cultura (DJEKRIF-DAKHMOUCHE *et al.*, 2006).

Para processos de FSM, a etapa limitante é a transferência de oxigênio pela interface gás-líquido. Em contraste, em processos de FSS, o crescimento pode ser limitado pela transferência de calor, ou pela transferência de massa, de oxigênio ou nutrientes, dependendo do local no leito de substrato, a fase da fermentação, o modelo e operação do bioreator. Embora os efeitos de agitação variem, dependendo do microrganismo, alguns efeitos danosos têm sido notados em alguns sistemas. Por exemplo, em alguns processos para produção de esporos de fungos, a agitação retarda o crescimento e danifica os conídios, reduzindo grandemente os rendimentos de esporos (MITCHELL *et al.*, 1999).

3.6.2.1 Tamanho da partícula

Geralmente, partículas menores provêm uma maior área de superfície para ataque microbiano, mas também podem resultar em aglomeração de substrato e crescimento pobre. Em contraste, partículas maiores provêm melhor aeração, mas uma superfície limitada para ataque microbiano. Então, o tamanho da partícula deve ser selecionado para cada processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999).

WARD (1989) relatou a importância da otimização dos espaços vazios interpartículas para facilitar as transferências de gases e calor, sendo de grande importância a seleção do tamanho das partículas e a constituição do meio da fermentação em substratos sólidos.

Além disso, os substratos amiláceos podem ser prejudicados pelo aumento da viscosidade do substrato, que pode causar uma aglomeração das partículas durante o processo de FSS, especialmente se o substrato for misturado a outros materiais. Essa compactação exclui todo o ar do meio e prejudica o crescimento microbiano (MITCHELL *et al.* 2000)

3.6.2.2. Umidade

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia o êxito de uma fermentação em estado sólido. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar.

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado. Além disso, a alta umidade resulta num decréscimo da porosidade, o que impede a penetração do oxigênio. Isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale mencionar que, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado. A umidade na fermentação semi-sólida pode variar de 18 a 85%, variando em função da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (DEL BIANCHI et al., 2001).

3.6.2.3. pH

Dentre os parâmetros físicos, o pH do meio de cultivo representa um importante papel através da indução de mudanças morfológicas no organismo e na excreção da enzima. A mudança do pH observada durante o crescimento do microrganismo também afeta a estabilidade do produto no meio. A maioria das linhagens de *Bacillus* utilizadas comercialmente para a produção de α -amilases bacterianas através de fermentação submersa tem um pH ótimo entre 6,0 – 7,0 para o crescimento e a produção da enzima. O mesmo ocorre para as linhagens utilizadas em fermentação semi-sólida. No caso de processos fúngicos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio de cultivo elimina a necessidade do controle do pH (GUPTA et al., 2003).

3.6.2.4. Temperatura

A influência da temperatura na produção de amilase está relacionada ao crescimento do microrganismo. No caso dos fungos, a maioria dos estudos de produção de amilase tem sido feita com microrganismos mesofílicos, numa área de temperatura de

25 a 37°C e os estudos com fungos termófilos têm despertado grande interesse devido à viabilidade tecnológica (GUPTA *et al.*, 2003).

3.6.2.5. Agitação

A intensidade de agitação influencia a mistura e a transferência de massa em muitas fermentações com fungos e assim influencia a morfologia micelial e a formação de produto (AMANULLAH *et al.*, 1999 citado por GUPTA *et al.*, 2003). Relata-se que uma alta velocidade de agitação é algumas vezes prejudicial ao crescimento do micélio, podendo diminuir a produção da enzima.

3.6.3. Aplicações industriais de amilases

A amilase é a mais importante enzima hidrolítica para todas as indústrias de amido e a comercialização da enzima é antiga, com início em 1984 como produto farmacêutico para o tratamento de distúrbios digestivos. No cenário atual, as amilases possuem aplicação em diversos setores industriais, tais como alimentos, detergentes, indústria têxtil e de papel. Nas indústrias de processamento de amido, as amilases microbianas substituíram totalmente a hidrólise química (AEHLE, 1999 citado por GUPTA *et al.*, 2003).

3.6.3.1. Panificação

Kim *et al.* (2006) estudaram o efeito do uso da α -amilase como aditivo na indústria de alimentos nas propriedades da massa e do pão através da combinação da farinha refinada com amilases, promovendo a aplicação em alimentos processados. A adição de α -amilase, além de ter efeito antienvelhecimento, aumentando a vida de prateleira do produto, proporciona uma melhora na elasticidade do miolo, o que é fundamental no processo de panificação, uma vez que a atividade de α -amilase é muito baixa na farinha de trigo. Além disso, algumas enzimas e amidos modificados com α -amilase são conhecidos pelo efeito sinérgico que exercem nos processos de panificação, pois quando estes estão em contato com uma pequena quantidade de α -amilase, há um aumento do volume do pão e as propriedades da massa se mantêm aceitáveis, sem se tornar pegajosa.

Além disso, pesquisas indicam que os consumidores não são favoráveis ao uso de aditivos químicos nos produtos de panificação e por este motivo o uso de enzimas é importante para a evolução do processo de panificação (HARADA *et al.*, 2000 citado por KIM *et al.*, 2006). As amilases fúngicas têm sido permitidas como aditivos em pães desde 1955 nos Estados Unidos e desde 1963 no Reino Unido, depois da confirmação da sua condição GRAS (Generally Recognized as Safe) (PRITCHARD, 1992 citado por GUPTA *et al.*, 2003).

A tecnologia atual da panificação exige a ocorrência do processo fermentativo numa velocidade adequada e uniforme. A suplementação de farinhas com α -amilases fúngicas aumenta a taxa de fermentação e reduz a viscosidade da massa (resultando no aumento do volume e da textura do produto), além de aumentar a disponibilidade de açúcar fermentável na massa. O aumento do teor de açúcar no produto final melhora o paladar e a qualidade de tostagem do pão. A α -amilase tem um efeito marcante na viscosidade e na maciez da massa. Além disso, confere ótimo volume final, sedosidade e textura (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

3.6.3.2. Liquefação e sacarificação do amido

O maior mercado de α -amilase está na produção de amido hidrolisado, obtendo glicose e frutose como produto final. O amido é convertido em xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS). Devido ao seu alto poder adoçante, é utilizado em grande quantidade nas indústrias de bebidas, como adoçante em refrigerantes (PANDEY *et al.* 2000b e VAN DER MAAREL *et al.* 2002).

3.6.3.3. Indústria têxtil

Avanços tecnológicos na indústria têxtil oferecem maior resistência ao fio durante o processo de tecelagem e, para tal, o fio precisa ser resistente à quebra, o que é feito aplicando-se uma camada removível de proteção (goma) aos fios. Neste caso, o amido é bastante atrativo, pois é barato, apresenta grande disponibilidade em diversas regiões do mundo e pode ser removido facilmente. A α -amilase tem sido utilizada para a extração da goma das fibras do tecido, uma vez que a enzima quebra as moléculas do amido em dextrinas que são solúveis em água, podendo ser facilmente removidas através da lavagem (HENDRIKSEN, 1999 citado por GUPTA *et al.*, 2003).

3.6.3.4. Indústria de papel

O uso de α -amilase para a produção de amido com baixa viscosidade e alto peso molecular para a cobertura de papel tem sido reportada. As gomas de amido são utilizadas para fornecer proteção ao papel contra danos mecânicos durante o processamento, melhorando a qualidade do produto final e fornecendo força e flexibilidade. Além disso, facilita o “apagamento” e oferece um bom revestimento ao papel. O amido é adicionado ao papel na etapa de prensagem, onde dois rolos fazem a transferência da pasta de amido ao papel. A temperatura deste processo é em torno de 45 a 60°C. A constante de viscosidade do papel é importante neste estágio para a reprodutibilidade dos resultados e cada tipo de papel requer um amido com viscosidade específica. O ajuste da viscosidade do amido natural é feito com α -amilase, em processos contínuos ou por batelada, e as condições do processo dependem da fonte de amido e do tipo de amilase utilizada (BRUINEMBERG, 1996 citado por GUPTA *et al.*, 2003).

3.6.3.5. Aplicações em detergentes

As enzimas são um dos ingredientes utilizados nos detergentes atuais e a principal vantagem desta aplicação é que estes detergentes são mais suaves quando comparados aos detergentes comuns. Os primeiros detergentes utilizados para máquinas de lavar louça eram agressivos, causando severos danos quando ingeridos e não eram compatíveis às porcelanas ou a utensílios de madeira. Isso forçou as indústrias de detergentes a procurar soluções mais suaves e eficientes. As α -amilases têm sido usadas em detergentes desde 1975 e atualmente estão presentes em cerca de 90% destes produtos. Uma das limitações da amilase é a baixa estabilidade em meio com baixo teor de cálcio. Além disso, alguns tipos de amilases são sensíveis a agentes oxidantes presentes em alguns componentes da formulação. Para resolver tal problema, as amilases têm sido utilizadas em combinação com outras enzimas, como a protease, e os compostos oxidantes têm sido substituídos por outros que não afetam a estabilidade enzimática (MITIDIERI *et al.*, 2006).

3.7. Microrganismos para FSS

Os microrganismos, por muito tempo, tiveram um papel importante na produção de alimentos (laticínios, peixes e produtos cárneos) e bebidas alcoólicas. Além disso, vários produtos de fermentação microbiana estão incorporados em alimentos como aditivos e suplementos (antioxidantes, aromas, corantes, conservantes, edulcorantes, etc.) (COUTO e SANRÓMAN, 2006).

Devido à facilidade de cultivo de microrganismos e às desejáveis propriedades físico-químicas das enzimas, certas espécies de *Aspergillus* e *Bacillus* são quase exclusivamente usadas para a produção de α -amilases comerciais (SCRIBAN, 1993, citado por DJEKRIF-DAKHOUCHE *et al.*, 2006).

O modo de crescimento das hifas de fungos e sua boa tolerância para baixa atividade de água (a_w) e altas condições de pressão osmótica fazem dos fungos organismos eficientes e competitivos na microflora natural para bioconversão de substratos sólidos (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004a).

3.7.1. *Metarhizium anisopliae*

Os fungos entomopatogênicos vêm sendo estudados no Brasil há mais de sessenta anos. No entanto, somente após a utilização do *Metarhizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, estes fungos passaram a receber maior atenção dos pesquisadores. Estes microrganismos atacam o hospedeiro por penetração direta da cutícula, a qual é uma barreira contra a maioria dos micróbios. Conseqüentemente, os patógenos fúngicos têm um potencial biológico significativo na sucção dos fluidos vitais dos insetos que não podem ser controlados facilmente pelos pesticidas comuns (KANG *et al.*, 1998).

As enzimas produzidas por estes fungos atuam no processo de penetração do hospedeiro, inclusive na fase de adesão, antes mesmo da germinação dos conídios. São liberadas pelo tubo germinativo, que tem fundamental importância na produção destas enzimas.

A produção de enzimas por estes patógenos tem sido usada com várias finalidades, sendo uma delas a de correlacioná-la com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência. Apesar da importância das enzimas no processo de doença,

é difícil correlacionar a produção de enzimas em meios artificiais com a virulência dos fungos, já que a morte do inseto ocorre em função de uma complexa seqüência de eventos. Alguns trabalhos, entretanto, têm sido realizados com essa finalidade (ALVEZ, 1998).

Quanto às enzimas amilolíticas, Al-Aidroos e Seifert (1980) citado por Alvez (1998) demonstraram que um mutante de *M. anisopliae* possuía a habilidade de degradar amido e, quando crescia em meios de cultura contendo essa substância, comportava-se de forma altamente virulenta contra o pernilongo *Culex pipiens*, em testes de laboratório.

Os mutantes virulentos de *M. anisopliae* estão correlacionados com altas produções de proteases, as quais causam a lise das proteínas do tegumento, agilizando o processo de penetração do fungo. Entretanto, elevada atividade lipolítica foi observada nos isolados mais virulentos de *M. anisopliae*, provenientes de diversas regiões do Brasil (ALVES, 1998).

Kang *et al.* (1998) detectaram atividade quitinolítica no fluido extracelular do *M. anisopliae* ATCC 20500 cultivado em meio líquido com quitina como única fonte de carbono. A enzima purificada mostrou elevada atividade contra quitina cristalina de casca de caranguejo. A enzima apresentou atividades de endo e exoquitinase, atuando em um pH ótimo de 5.

Quanto aos meios de cultivo empregados para produção de esporos do *M. anisopliae*, o arroz tem se destacado por ser um meio de cultivo simples e de grande disponibilidade. No entanto, meios alternativos tem sido pesquisados. Uma vez que o *M. anisopliae* este fungo cresce profusamente em meios sólidos e geralmente, são necessários elevados níveis de inóculo (em torno de 10^{12} conídios por hectare) para o uso como bioinseticida, para a produção de esporos em larga escala é interessante a utilização meios de baixo custo farelo de trigo e farelo de arroz (DORTA *et al.*, 1996).

Dorta *et al.* (1996) relatam que quando arroz inteiro é usado, o tamanho relativamente grande das partículas limita o acesso do fungo ao substrato e, por esse motivo, é interessante a utilização de um substrato de menor granulometria, que aumentará a disponibilidade de água e ar, favorecendo o crescimento do fungo. Os autores indicam o uso de bagaço de cana-de-açúcar junto com arroz como substrato para o cultivo de esporos de *M. anisopliae*.

Dorta e Arcas (1998) utilizaram farelo e casca de arroz (proporção 1/1 em base seca), umidecidos até 47%, em fermentadores de coluna de vidro com o intuito de estudar a esporulação do *M. anisopliae* em fermentação semi-sólida com aeração forçada.

Através dos estudos, observaram que após 300 horas de fermentação, ao final do processo de esporulação, foi verificado um rendimento de $1,4 \times 10^{11}$ esporos/ g de meio de cultivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

O microrganismo estudado foi o fungo *Metarhizium anisopliae* depositado no ATCC – *American Type Culture Collection* sob o número 60582. Também foram realizados testes preliminares com as culturas CG 291, 3935 e 4516, cedidas pela EMBRAPA.

4.2. Meio de manutenção

O fungo *M. anisopliae* foi conservado sob refrigeração a 4°C em meio BDA (Batata Dextrose Agar), preparado conforme recomendação do fabricante, sendo repicado a cada dois meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 26°C durante 7 dias. Após este tempo, os tubos foram mantidos sob refrigeração à 7°C.

4.3. Inóculo

O meio para produção de esporos foi constituído por meio BDA distribuído em frascos Ernmeyer (250 mL), posteriormente inclinados e, após solidificação, o microrganismo foi repicado no mesmo. Após o crescimento e a esporulação do fungo, por aproximadamente 5 dias, os esporos foram suspensos em solução de Tween 80 a 0,2%, com o auxílio de alça de platina. A contagem de esporos em cada suspensão foi feita utilizando câmara de Neubauer e foram utilizados volumes de suspensão suficientes para se obter um inóculo de 10^7 esporos/mL.

4.4. Meio para estudo da produção de enzimas

Como substrato para a fermentação semi-sólida, foram utilizadas misturas de farelo e casca de arroz obtidas de usina de beneficiamento da região. Os dois componentes foram misturados em diferentes proporções e hidratados, conforme descrito no item 4.7.

4.5. Análise do substrato

4.5.1. Determinação da umidade do substrato

Foi utilizada uma amostra de aproximadamente 1g dos meios de cultivo, os quais foram secos a uma temperatura de 105°C em estufa até peso constante. A diferença entre o peso inicial e o peso final, após a secagem, foi usada para o cálculo da umidade expressa em porcentagem (%).

4.5.2. Determinação do pH do substrato

O pH do meio de cultivo foi determinado, através de método potenciométrico, de uma suspensão 1:10 do substrato em água. Após a homogeneização da solução foi determinado o pH direto do meio.

4.6. Seleção da cepa padrão de *Metarhizium anisopliae* para realização dos ensaios fermentativos

Para a seleção da cepa padrão de *Metarhizium anisopliae*, foram realizadas fermentações preliminares com meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), distribuído em embalagens de polipropileno e hidratados até 47% de umidade. As fermentações foram conduzidas em duplicata até 480 horas, com amostras retiradas a cada 24 horas.

4.7. Estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno

Foram realizadas fermentações variando o meio de cultivo e a umidade com o intuito de estudar o efeito destes fatores sobre a produção de α -amilase e amiloglicosidase. O meio de cultivo foi constituído de farelo e casca de arroz, variando as proporções em 7/3 (p/p), 6/4 (p/p) e 8/2 (p/p) e o teor de umidade do meio foi variado em 47%, 65% e 74%.

Para tal, dez gramas de substrato foram adicionados à embalagens de polipropileno, as quais foram seladas com fita adesiva e esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, o meio foi inoculado com a suspensão de esporos (10^7 esporos/g de substrato), previamente preparados conforme item 4.3 e, em seguida, o material inoculado foi incubado à 28°C por 20 dias. Os ensaios foram feitos em duplicata e as amostras eram retiradas a cada 24 horas.

4.8. Estudo da influência de meio de cultivo, umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno

Para avaliar a influência da interação das variáveis meio de cultivo umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase, foi realizado um planejamento experimental fracionado 2^{4-1} , com três repetições no ponto central. A combinação dos níveis e fatores estão apresentados na Tabela 1 e totalizaram 11 experimentos. A temperatura de incubação para o desenvolvimento da fermentação foi de 28°C e o tempo de cultivo foi de 480 horas. As amostras foram feitas em duplicata e retiradas a cada 48 horas.

Tabela 1. Variáveis independentes (fatores) utilizadas no estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado.

Planejamento experimental 2^{4-1} fracionado			
Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Meio de cultivo (proporção farelo e casca de arroz)	6/4	7/3	8/2
Umidade inicial (%)	50	60	70
pH inicial	4,5	5,5	6,5
Concentração de inoculo (esporos/ g de substrato)	1×10^7	2×10^7	3×10^7

Tabela 2. Ensaios realizados no estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado.

Ensaio	Meio de cultivo	pH	Umidade (%)	Concentração de esporos
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

A análise dos resultados obtidos foi feita com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., USA).

4.9 Extração da enzima

Depois de fermentado, o material foi homogeneizado e foram retiradas amostras de cada embalagem, para a extração das enzimas. Para cada 10g de amostra, foram adicionados 50 mL de água destilada, e logo após a suspensão foi filtrada em papel filtro.

O material filtrado foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar as atividades enzimáticas.

4.10 Determinação das atividades enzimáticas

4.10.1. Atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase foi determinada pela diminuição da capacidade de ligação entre o amido e o iodo de uma solução de amido tratada com uma solução enzimática bruta, como descrito por Cruz *et al.*, (1997). A mistura foi constituída por 0,5 mL de solução enzimática bruta e 0,5 mL de solução de amido 0,5% em tampão acetato de sódio 0,25 M ajustado a pH 5. Após 10 minutos de reação a 60°C, foram adicionados 4 mL de HCL 2 N e 0,5 mL de reagente iodo (0,03% de I₂ + 0,3% de KI). Após homogeneização a mistura da reação foi diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620 nm em espectrofotômetro.

O controle da reação foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada. No controle da enzima, substitui-se o amido pelo volume equivalente em solução tampão.

Uma unidade de enzima (U/g) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições da reação, calculadas segundo a equação.

$$U/g = [(Ct - R) / Ct] \times (Qs/10) \times (fd/Ve)$$

onde: U/g = unidade de enzima por grama de substrato;

Ct = controle da enzima somado ao controle do substrato;

Qs = quantidade de substrato utilizado na reação (em mg);

10 = fator de referência de hidrólise de amido (10 mg);

fd = fator de diluição;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

4.10.2 Atividade de amiloglicosidase

A atividade amilolítica foi determinada pela dosagem dos açúcares redutores liberados durante a reação enzimática, pelo método de DNS (3,5 – ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959), utilizando glicose como padrão.

Para a reação, foram adicionados 0,5 mL de solução enzimática bruta a 0,5 mL de solução de amido 0,5% em tampão acetato a 0,25 M e pH 5 e os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C, durante 10 minutos. A reação foi paralisada com 1 mL de reagente DNS e levada ao banho de ebulição por mais 10 minutos. Após isso, os tubos de reação foram postos em banho de gelo até resfriarem e em seguida foram adicionados 10 mL de H₂O destilada. Os tubos foram agitados por inversão e a leitura realizada em espectrofômetro a 540 nm. O valor obtido na leitura foi utilizado no cálculo da concentração de açúcares redutores, a partir de uma curva padrão relacionando concentração de glicose com densidade óptica.

O controle da reação foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada. No controle da enzima, substituiu-se o amido pelo volume equivalente em solução tampão.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por grama de substrato, por minuto de reação.

4.11 Determinação do pH e da temperatura ótimos

A realização das análises de determinação do pH e da temperatura ótimos, bem como a análise de estabilidade frente às variações de pH e temperatura, além da influência dos íons na atividade enzimática, foram realizadas no extrato enzimático obtido através da fermentação semi-sólida em meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz, na proporção 6/4 (p/p), hidratados até 47%, inoculados com a suspensão de 1.10^7 esporos/g e incubados por 240 horas a 28°C.

O comportamento da atividade das enzimas em função do pH foi estudado incubando-se o extrato enzimático com tampões acetato (pH 3,0 – 5,5), citrato/ NaOH (pH 5,5 – 7,0), Tris/ HCl (pH 7,0 – 8,5) e glicina/ NaOH (pH 8,5 – 10,5).

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 30°C a 80°C, no pH ótimo.

4.12 Determinação da estabilidade térmica e da estabilidade frente às variações de pH

O extrato enzimático foi mantido por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10°C a 70°C. Após este período, foram tomadas amostras para determinar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se as enzimas em tampões com pH variando de 3,0 a 10,0 em ausência de substrato, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para determinar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

4.13 Efeito de íons na atividade enzimática

Foi testado o efeito dos íons cálcio, prata, magnésio, manganês, zinco, potássio e mercúrio sob a forma de sulfatos, além de EDTA e CaCl₂ sobre a atividades enzimática de α -amilase e amiloglicosidase. Os íons foram testados a uma concentração de 10mM na mistura de reação enzimática.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do substrato a ser utilizado

Foram realizadas determinações do teor de umidade e pH dos substratos utilizados, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos substratos utilizados nos ensaios fermentativos.

Substrato	Umidade (%)	pH
Farelo de arroz	12,1%	6,8
Casca de arroz	10,3%	7,2

5.2. Seleção da cepa padrão de *Metarhizium anisopliae* para utilização nos ensaios fermentativos

Foram conduzidas fermentações com o intuito de avaliar qual cepa de *M. anisopliae* seria a melhor produtora de α -amilase e amiloglicosidase, e a partir dos resultados, definir uma cepa padrão para a continuidade das pesquisas. Para tal foram realizadas fermentações preliminares com meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), hidratados até 47% de umidade. As fermentações foram conduzidas em duplicata até 480 horas, com amostras retiradas a cada 24 horas.

Para a fermentação realizada com a cepa ATCC 60582 (Figura 2), observou-se que a maior produção da α -amilase (16,373 U/g) ocorreu com 408 horas de fermentação, enquanto a atividade máxima de amiloglicosidase (18,987 U/g) ocorreu após 216 horas de fermentação.

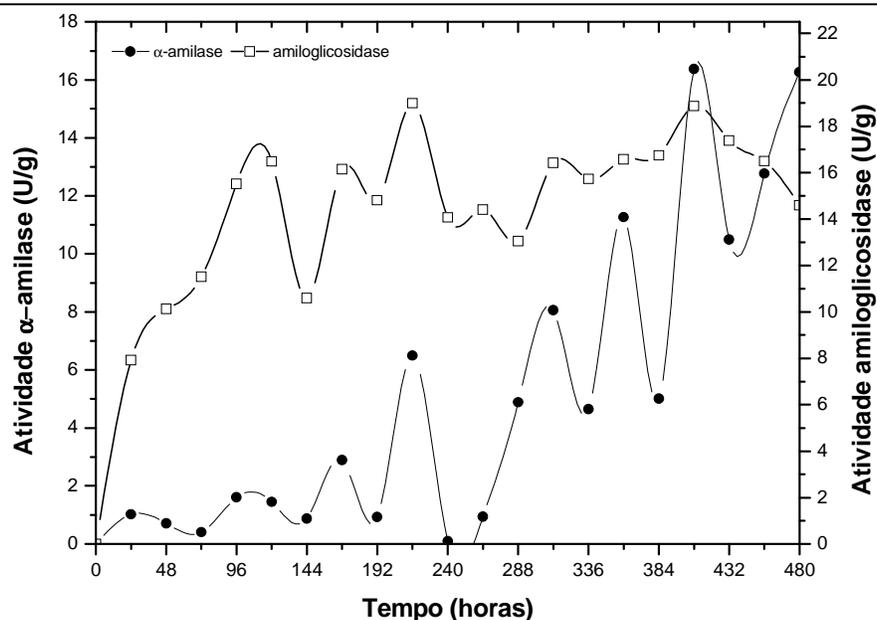


Figura 2. Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa ATCC 60582 em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas.

Na Figura 3, observa-se o perfil da atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase produzidas pela cepa CG291, a qual apresentou a maior atividade enzimática de α -amilase (2,043 U/g) em 336 horas de fermentação e para a amiloglicosidase a maior atividade enzimática obtida (6,678 U/g) ocorreu após 48 horas de fermentação.

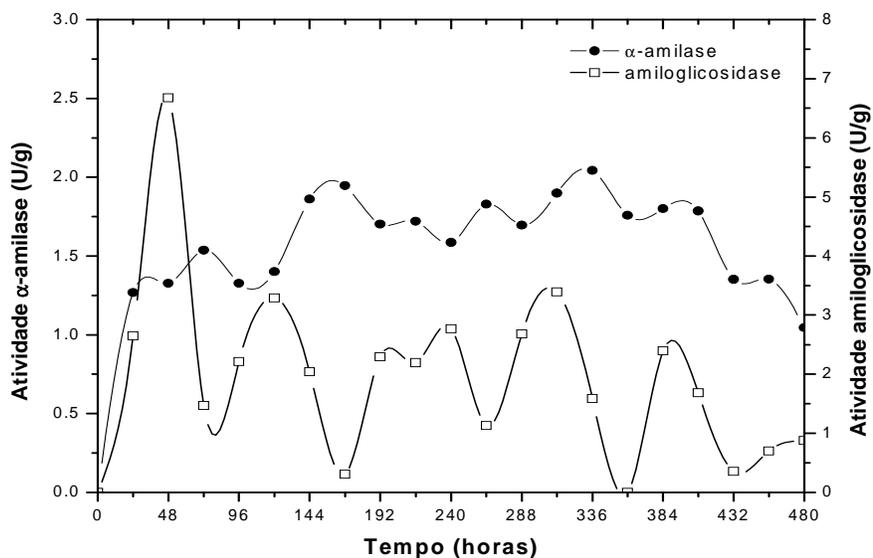


Figura 3. Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa CG 291, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas.

Com relação às atividades enzimáticas estudadas através da fermentação com a cepa 3935 (Figura 4), observa-se que a maior produção de α -amilase (2,407 U/g) ocorreu em 216 horas de cultivo, ao passo que, para a amiloglicosidase a maior produção da enzima (10,615 U/g) ocorreu em 72 horas de fermentação.

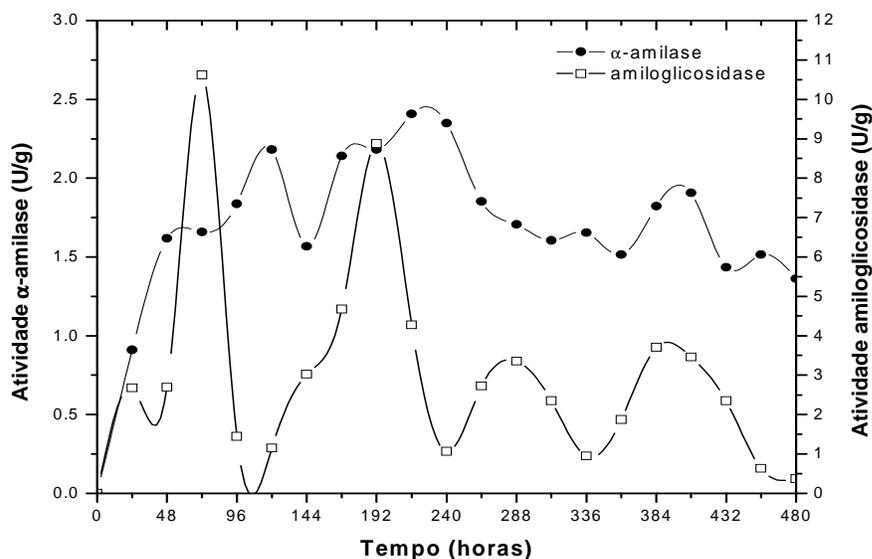


Figura 4. Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa 3935, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas.

Relativo ao estudo da produção enzimática pela cepa 4516 (Figura 5), através dos resultados obtidos foi possível observar que após 120 horas de fermentação ocorreu a maior produção de α -amilase (1,931 U/g), enquanto a maior atividade enzimática de amiloglicosidase (6,948 U/g) foi observada em 360 horas de fermentação.

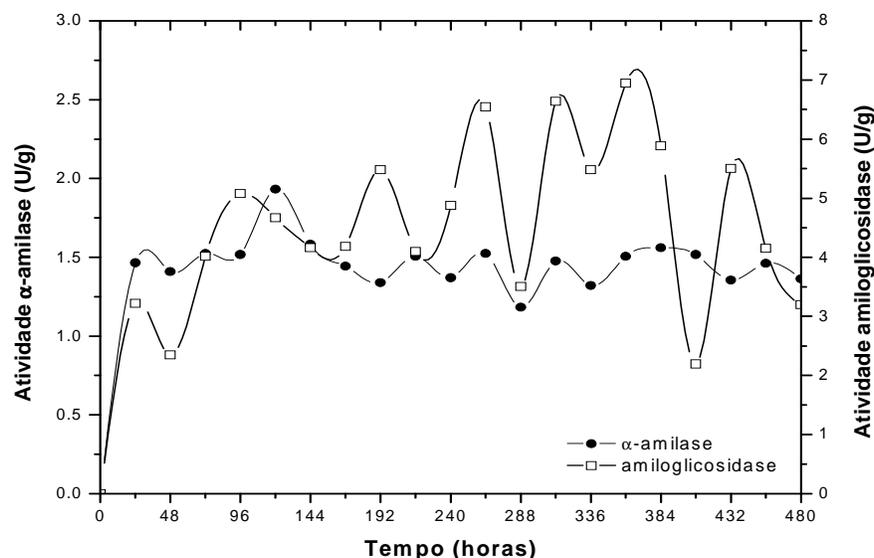


Figura 5. Produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M. anisopliae*, cepa 4516, em meio constituído de farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade, durante 480 horas.

Os resultados de média e desvio padrão, obtidos através dos ensaios realizados, encontram-se na Tabela 4. Observa-se que em média a cepa ATCC 60583 apresentou maiores atividades enzimáticas, tanto para a α -amilase (14,821 U/g), quanto para a amiloglicosidase (5,360 U/g) e as atividades enzimáticas máximas (16,373 U/g para α -amilase e 18,987 U/g para a amiloglicosidase), também foram encontradas através de fermentação utilizando esta linhagem. Por esta razão, o *Metarhizium anisopliae* ATCC 60582 foi selecionado para a realização dos ensaios deste trabalho.

Tabela 4. Média e desvio padrão das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase produzidas por cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Fungo	Atividade α-amilase (U/g) (média e desvio padrão)	Atividade amiloglicosidase (U/g) (média e desvio padrão)
ATCC 60582	5,360 \pm 5,390	14,821 \pm 0,217
CG 291	1,612 \pm 0,217	2,035 \pm 1,470
3935	1,760 \pm 0,364	3,109 \pm 2,570
4516	1,467 \pm 0,146	4,608 \pm 1,354

5.3. Estudo da influência do meio de cultivo e da umidade empregados na fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno

Para estudar a influência do meio de cultivo e da umidade na produção de α -amilase e amiloglicosidase, foram realizadas fermentações com meios de cultivo constituídos de farelo e casca de arroz em diferentes proporções 6/4 (p/p), 7/3 (p/p) e 8/2 (p/p), variando o teor de umidade inicial em 47%, 65% e 74%. Os ensaios foram conduzidos em duplicata por 480 horas, com amostras retiradas a cada 24 horas. Os resultados obtidos estão expressos nas Figuras 6, 7 e 8 a seguir.

Observando os dados apresentados na Figura 6A, verifica-se que a atividade enzimática de amiloglicosidase aumentou gradativamente durante o processo fermentativo, atingindo o máximo de produção (1.433,36 U/g) ao final da fermentação, ou seja, após 480 horas. Para a produção da α -amilase, esta apresentou atividade máxima (210,86 U/g) após 432 horas de cultivo.

No caso da produção enzimática obtida através do ensaio conduzido em meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p), com umidade inicial de 65% (Figura 6B), nota-se que as atividades enzimáticas foram instáveis em todo o processo de fermentação, atingindo um máximo de 2,052 U/g de atividade de α -amilase, após 288 horas de fermentação e 31,93 U/g de atividade de amiloglicosidase em 312 horas de cultivo.

Analisando os resultados obtidos com a fermentação em farelo e casca de arroz na proporção 6/4 e umidade 74% (Figura 6C), verificou-se que a atividade máxima observada para a α -amilase foi de 2,36 U/g, após 312 horas de cultivo e 9,93 U/g para a atividade máxima de amiloglicosidase ao final da fermentação.

De maneira geral, para este ensaio, os melhores valores de produção enzimática, tanto para a α -amilase quanto para a amiloglicosidase, ocorreram em meio com 47% de umidade. Observa-se também que, quanto maior a umidade do meio de cultivo, menores são os valores de síntese das enzimas.

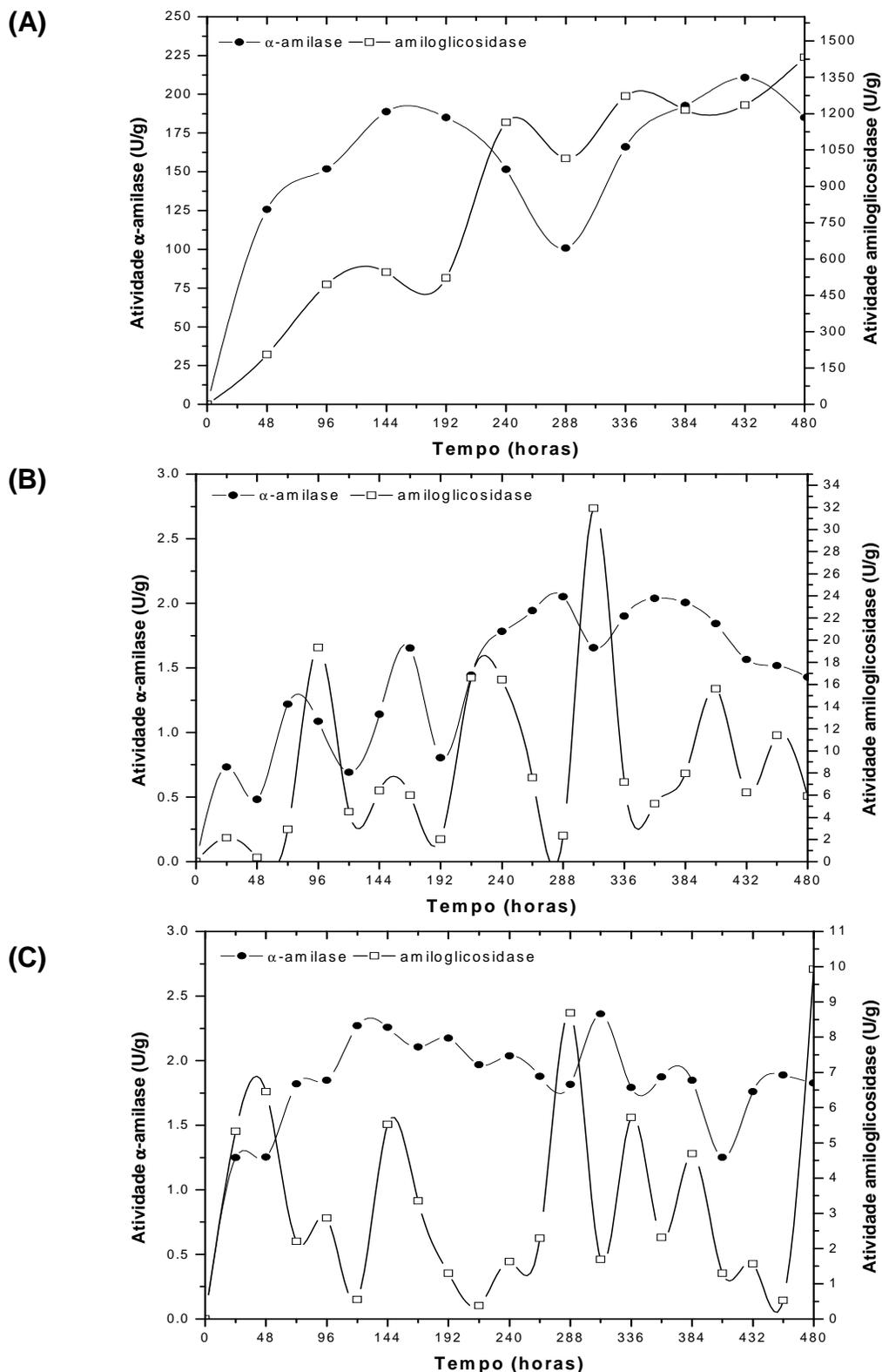


Figura 6. Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglucosidase (□), por *M.anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído por **(A)** farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 47% de umidade; **(B)** farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 65% de umidade e **(C)** farelo e casca de arroz (6/4 – p/p) e 74% de umidade.

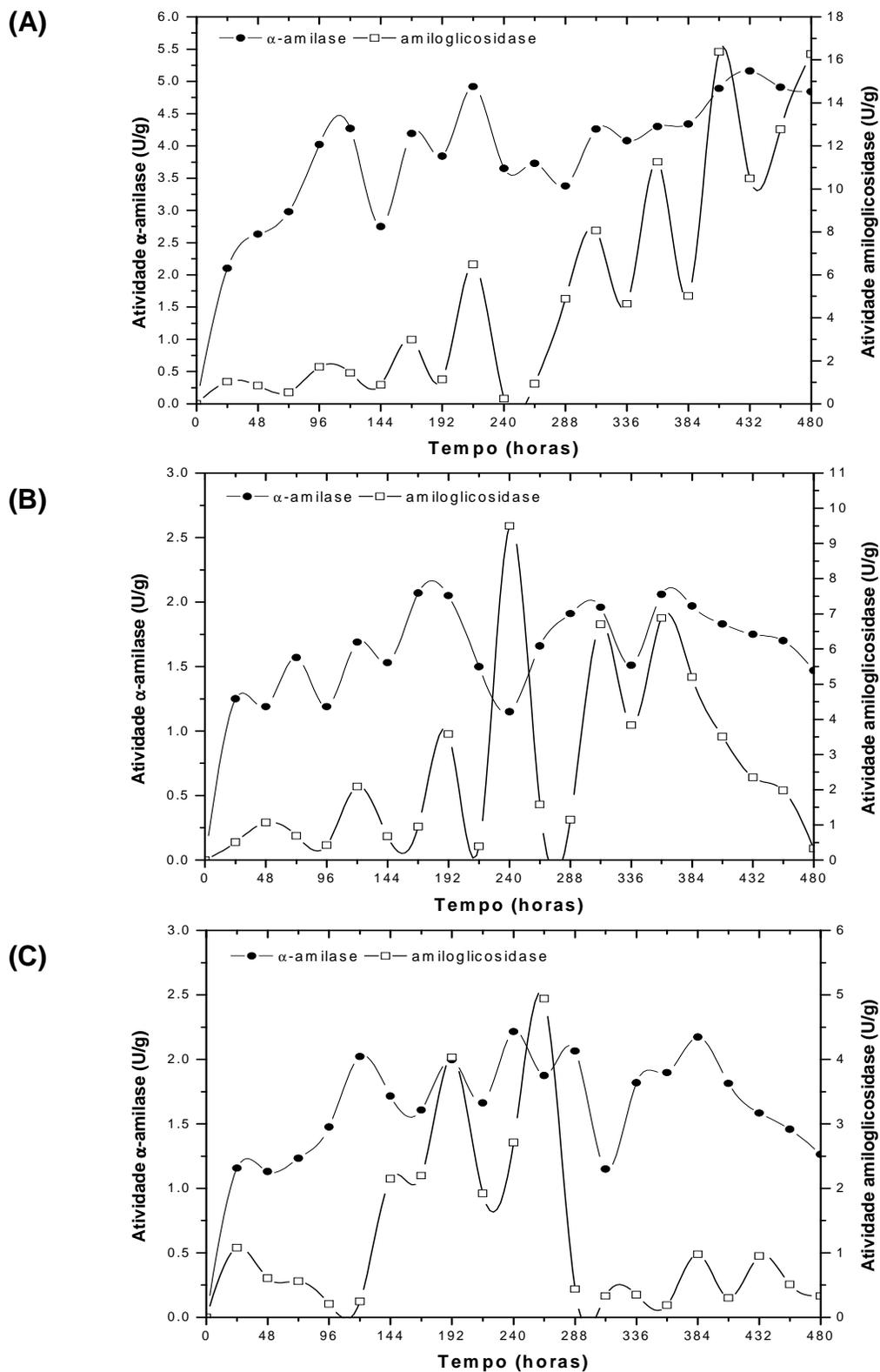


Figura 7. Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M.anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído em (A) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 47% de umidade; (B) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 65% de umidade e (C) farelo e casca de arroz (7/3 – p/p) e 74% de umidade, em 480 horas de fermentação.

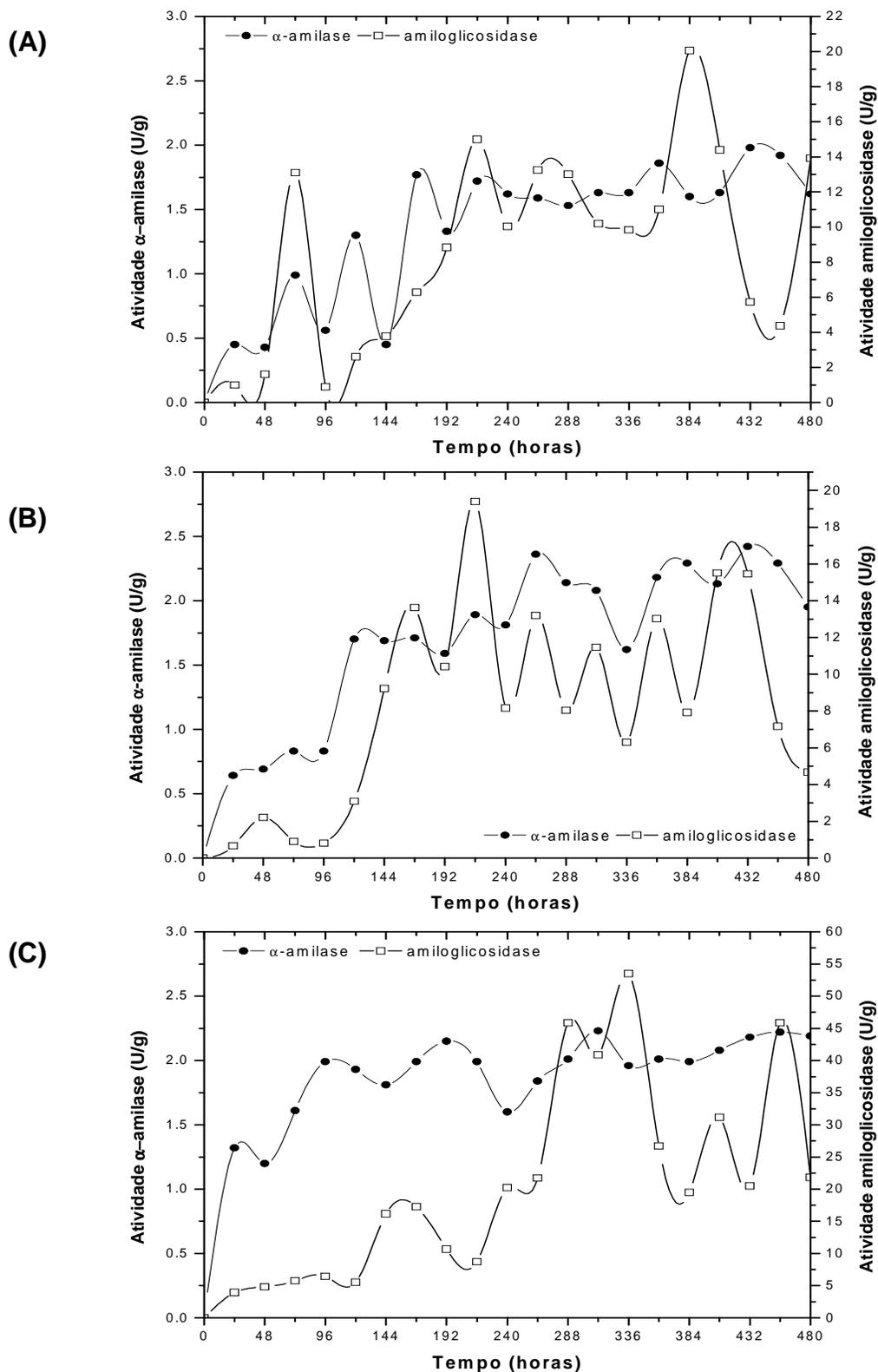


Figura 8. Estudo da produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□), por *M.anisopliae* ATCC 60582, em meio constituído por (A) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 47% de umidade; (B) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 65% de umidade e (C) farelo e casca de arroz (8/2 – p/p) e 74% de umidade, em 480 horas de fermentação.

Relativo ao estudo da produção de enzimas em meio constituído por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), hidratados até 47% de umidade (Figura 7A), observa-se que a máxima produção de α -amilase (5,16 U/g) nesta condição ocorreu após 432 horas de fermentação, enquanto a atividade máxima de amiloglicosidase (16,37 U/g) ocorreu em 408 horas de fermentação.

Através da Figura 7B, observa-se que durante a produção de enzimas em meio constituído por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p) e umidade 65%, a máxima atividade enzimática de α -amilase foi de 2,07 U/g após 168 horas de fermentação, enquanto a atividade de amiloglicosidase máxima foi de 9,50 (U/g) em 240 horas de cultivo.

Quanto à produção de α -amilase em farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p) e umidade 74% (Figura 7C), verifica-se que o valor máximo obtido foi de 2,215 U/g após 240 horas de cultivo. Para a produção de amiloglicosidase nestas mesmas condições, observa-se que a máxima atividade foi detectada foi de 4,94 U/g em 264 horas de cultivo.

Em relação aos ensaios realizados com meio de cultivo composto por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), observa-se que o efeito da umidade foi semelhante ao ocorrido no meio 6/4 (p/p), ou seja, as maiores produções de α -amilase e amiloglicosidase ocorreram em meio com 47% de umidade e com maiores níveis de umidade, menores foram as produções das enzimas.

Referente à produção de α -amilase em farelo e casca de arroz na proporção 8/2 (p/p) e umidade 47% (Figura 8A), observou-se um valor máximo foi de 1,98 U/g após 432 horas de cultivo, enquanto que, para a produção de amiloglicosidase nestas mesmas condições, observa-se que a máxima atividade foi detectada foi de 20,05 U/g em 384 horas de cultivo.

Através da Figura 8B, observa-se que durante a produção de enzimas em meio constituído por farelo e casca de arroz na proporção 8/2 (p/p) e umidade 65%, a máxima atividade enzimática de α -amilase foi de 2,42 U/g após 432 horas de fermentação, enquanto a atividade de amiloglicosidase máxima foi de 19,40 (U/g) em 216 horas de cultivo.

Relativo ao estudo da produção de enzimas em meio constituído por farelo e casca de arroz na proporção 8/2 (p/p), hidratados até 74% de umidade (Figura 8C), observa-se que a máxima produção de α -amilase (2,22 U/g) nesta condição ocorreu após

456 horas de fermentação, enquanto a atividade máxima de amiloglicosidase (53,52 U/g) ocorreu em 336 horas de fermentação.

Nos ensaios realizados com o meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 8/2 (p/p), nota-se que, quando a umidade foi variada de 47 a 74%, as produções enzimáticas para α -amilase pouco variaram. Relativo à produção da amiloglicosidase neste meio de cultivo, observa-se que os valores obtidos em níveis de umidade de 47 e 65% foram semelhantes, havendo um aumento da produção da enzima quando a umidade foi elevada para 74%. Tal resultado diverge dos observados nos meios constituídos por farelo e casca de arroz em proporções de 6/4 (p/p) e 7/3 (p/p), onde o aumento da umidade prejudicou a produção das enzimas. Uma vez que o meio em questão tem uma granulometria menor que os demais (devido a maior quantidade de farelo e menor concentração de casca de arroz), o aumento da umidade para 74% ocasionou a compactação do meio de cultivo, diminuição da porosidade, tornando-se pegajoso e susceptível à contaminação microbiana. Além disso, como os ensaios foram conduzidos em embalagens de polipropileno vedadas com fita adesiva, quando a umidade de 74% foi utilizada, o meio de cultivo não foi capaz de reter toda a umidade adicionada, ocorrendo vazamentos indesejáveis nas embalagens. Por este motivo, nos próximos ensaios a umidade máxima utilizada foi reduzida para 70%.

Os resultados das médias e desvio padrões das atividades de α -amilase e amiloglicosidase, produzidas durante as 480 horas de cultivo estão expressos na Tabela 5. Pelos resultados apresentados nesta tabela, observa-se que, em média, a maior produção de enzimas amilolíticas ocorreu em meio de cultivo constituídos por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p) e umidade 47%. Além disso, em todos os ensaios realizados, os valores de produção de amiloglicosidase foram superiores aos observados para a α -amilase. Este resultado já era esperado, visto que os fungos são conhecidos por serem melhores produtores de amiloglicosidase do que de α -amilase.

Na Tabela 6 estão expressos os valores máximos de produção de α -amilase e amiloglicosidase, bem como em que períodos do processo fermentativo ocorreram. Analisando os dados apresentados, observa-se que os maiores valores de síntese das enzimas ocorreram com meio de cultivo composto por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p), umidade de 47% e praticamente no final do processo de fermentação estudado. Também é possível notar que, em todos os meios testados, as atividades enzimáticas máximas alcançadas diminuiriam com o aumento da umidade. No entanto,

observa-se que em meios onde a umidade utilizada era de 47%, foi necessário um maior tempo de cultivo para atingir a produção máxima das enzimas.

Tabela 5. Média e desvio padrão das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase produzidas ao longo de 480 horas de fermentação, por *M. anisopliae* ATCC 60582, em variados meios de cultivo e umidade.

Ensaio	Meio de cultivo	Umidade	Atividade α-amilase (U/g)	Atividade Amiloglicosidase (U/g)
1	6/4 (p/p)	47%	165,768 \pm 31,789	910,27 \pm 425,923
2	6/4 (p/p)	65%	1,450 \pm 0,490	8,910 \pm 7,677
3	6/4 (p/p)	74%	1,860 \pm 0,317	3,410 \pm 2,745
4	7/3 (p/p)	47%	3,960 \pm 0,845	5,400 \pm 5,359
5	7/3 (p/p)	65%	1,650 \pm 0,303	2,670 \pm 2,600
6	7/3 (p/p)	74%	1,670 \pm 0,352	1,25 \pm 1,347
7	8/2 (p/p)	47%	1,380 \pm 0,514	8,940 \pm 5,437
8	8/2 (p/p)	65%	1,740 \pm 0,569	8,561 \pm 5,464
9	8/2 (p/p)	74%	1,920 \pm 0,285	21,250 \pm 15,136

Tabela 6. Valores máximos de atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase, relacionados ao tempo de fermentação, por *M. anisopliae* ATCC 60582, em variados meios de cultivo e umidade.

Ensaio	Meio de cultivo	Umidade	Atividade de α-amilase (U/g)	Tempo (horas)	Atividade de amiloglicosidase (U/g)	Tempo (horas)
1	6/4 (p/p)	47%	210,858	432	1433,361	480
2	6/4 (p/p)	65%	2,052	288	31,930	312
3	6/4 (p/p)	74%	2,361	312	9,931	400
4	7/3 (p/p)	47%	5,157	432	16,373	408
5	7/3 (p/p)	65%	2,070	168	9,501	240
6	7/3 (p/p)	74%	2,215	240	4,937	264
7	8/2 (p/p)	47%	1,978	432	20,047	384
8	8/2 (p/p)	65%	2,424	432	19,400	216
9	8/2 (p/p)	74%	2,233	456	53,518	336

De forma geral, para a produção de α -amilase e amiloglicosidase, os dados obtidos nesta etapa da pesquisa divergem dos encontrados na literatura, onde existem relatos de que maiores valores de umidade são necessários para a síntese destas enzimas. Francis *et al.* (2002), estudando a produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 através de fermentação semi-sólida em resíduos de cereais da indústria cervejeira, observaram que com uma umidade inicial de 70% do meio de cultivo é possível aumentar a produção da enzima em 20%, obtendo uma atividade enzimática de 6523 U/g. Fato semelhante foi relatado por Ramachandram *et al.* (2004a), que utilizaram torta de óleo de coco para fermentação com *A. niger* e observaram que a produção de α -amilase aumenta com o aumento da umidade e a melhor produção encontrada (1827 U/g) ocorreu em meio com 68% de umidade. No entanto, os mesmos autores relatam que após este teor, para o substrato estudado, o meio tem sua porosidade diminuída, tornando-se pegajoso e aumentando as chances de contaminação.

Por outro lado, Arzumanov *et al.* (2005) estudaram as condições de umidade e aeração para a produção de esporos de *M. anisopliae* através de fermentação semi-sólida em bioreatores de coluna de vidro, utilizando arroz e bagaço de cana como substrato. Testando umidades de 45% a 65%, observaram que a melhor produção de esporos ocorreu em umidade de 57%. Tal resultado assemelha-se ao obtido nesta pesquisa, indicando que o fungo estudado não necessita de elevados teores de umidade para adaptar-se ao meio de cultivo, bem como produzir metabólitos.

Quanto ao tempo de cultivo, este mostrou ser uma variável importante na produção da enzima, uma vez que, para cada ensaio realizado foi necessário um tempo de fermentação diferente para a síntese máxima das enzimas. Além disso, observa-se que as condições de cultivo testadas influenciaram no tempo de obtenção das enzimas, uma vez que, em meios de cultivo com menor umidade (47%), foram verificados os maiores períodos de fermentação para a obtenção da produção enzimática máxima. Berovic e Logar-Derencin (1993), estudando a produção de pectinases por *A. niger*, observaram que, em níveis de umidade abaixo de 38%, o tempo de fermentação para a produção da enzima era demasiadamente longo.

Quando comparados os períodos de fermentação para meios de cultivo com umidades de 65% e 74%, nota-se que para um maior teor de umidade (74%), foi necessário um maior período de fermentação até atingir a atividade máxima. Tal resultado pode ser explicado devido ao efeito negativo do aumento da umidade no meio de cultivo,

causando compactação do mesmo, impedindo a circulação de ar, a dissipação de gases e calor produzidos, os quais podem prejudicar o rendimento do processo conforme relatado por Del Bianchi *et al.* (2001).

Relativo aos meios de cultivo testados, as melhores produções enzimáticas, tanto de α -amilase quanto de amiloglicosidase, ocorreram em meio de cultivo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p). No entanto, observa-se neste meio de cultivo foram necessários tempos maiores de fermentação para alcançar a produção máxima das enzimas. Neste meio de cultivo, havia uma maior quantidade de casca de arroz, constituída por partículas grandes que, quando comparadas às do farelo de arroz, apresentam maior granulometria e menor valor nutritivo. Sendo assim, a casca de arroz é um substrato de difícil acesso pelo microrganismo, o que explica a necessidade de um período de fermentação mais longo.

Por outro lado, a adição da casca de arroz ao meio de cultivo é benéfica, uma vez que eleva a porosidade, favorece a absorção de água e facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio de cultivo e os microrganismos (DEL BIANCHI *et al.*, 2001). Arasaratnam *et al.* (2001) citado por Anto *et al.* (2006) estudaram a utilização de farelo e casca de arroz como substratos em substituição ao farelo de trigo para a produção de glicoamilase por *A. niger* e observaram que o meio de cultivo estudado provocou um efeito positivo sobre a produção da enzima. Os mesmos autores relatam que com a adição de casca de arroz ao meio de cultivo, ocorre um aumento da utilização dos nutrientes, devido à melhor circulação de ar e difusão dos mesmos, causada pelo espaço intersticial. Além disso, ocorre um aumento da superfície para germinação dos esporos e crescimento micelial, facilitando o acesso aos nutrientes.

5.4 Estudo da influência do meio de cultivo, umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase em fermentação semi-sólida em embalagens de polipropileno.

Através da utilização de planejamento experimental fracionado 2^{4-1} , com três repetições no ponto central, foi estudado o efeito da interação da variação de meio de cultivo umidade, pH inicial e concentração de esporos na produção de α -amilase e amiloglicosidase. Ao todo foram realizados 11 experimentos, em duplicata e em cada ensaio as fermentações foram conduzidas por 480 horas, sendo retiradas amostras a cada 48 horas.

O perfil da produção de α -amilase e de amiloglicosidase observado através da realização dos ensaios do planejamento experimental estão expressos nas Figuras 9 a 17.

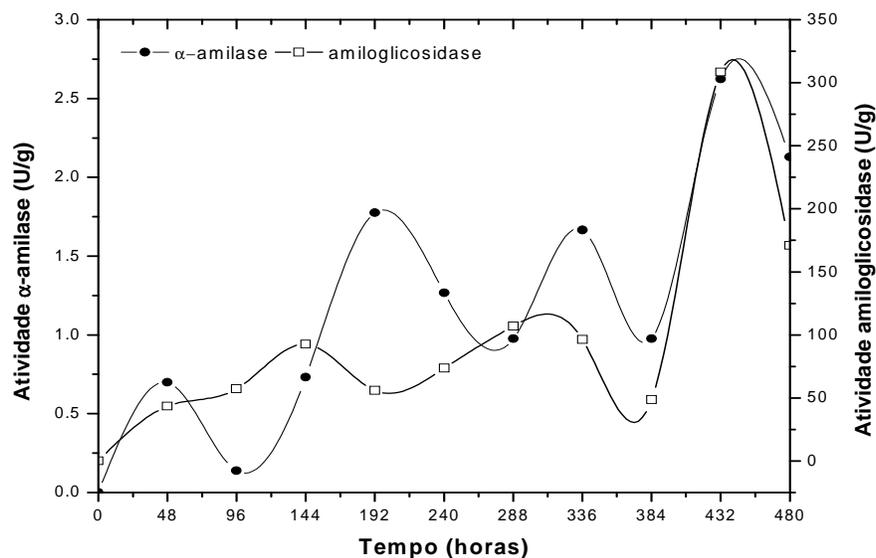


Figura 9. Ensaio 1. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 -p/p), pH (4,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

Na Figura 9, observa-se que no ensaio 1 as máximas atividades enzimáticas, tanto de α -amilase quanto de amiloglicosidase, ocorreram ao final da fermentação, em 432 horas de cultivo, sendo a máxima produção de α -amilase (2,63 U/g) e o maior valor de amiloglicosidase foi 308,431 U/g.

No ensaio 2, de acordo com a Figura 10, observa-se que a produção máxima das enzimas estudadas ocorreram em momentos diferentes da fermentação, sendo que a maior atividade de α -amilase (11,876 U/g) ocorreu em 480 horas de fermentação, enquanto que a máxima produção de amiloglicosidase (32,481 U/g) ocorreu em 144 horas de fermentação.

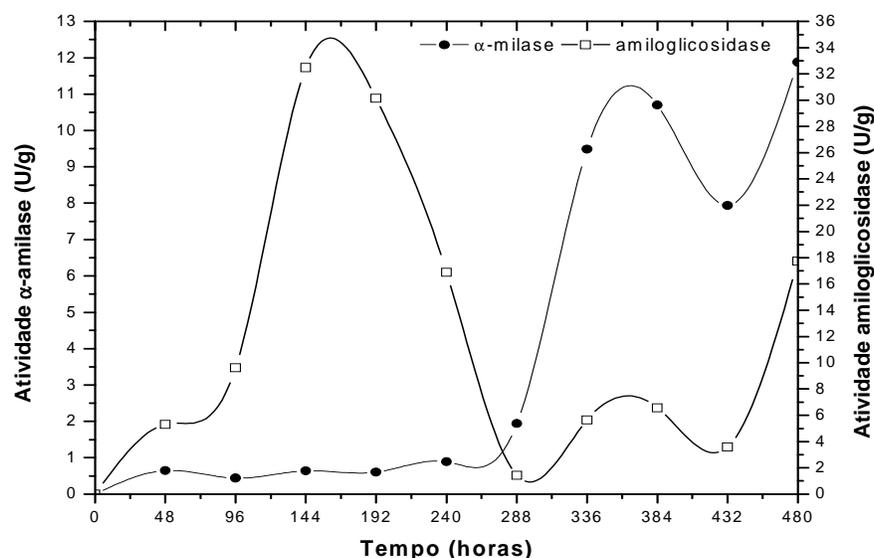


Figura 10. Ensaio 2. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (4,5), umidade (50%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

Relativo ao estudo da produção de α -amilase e amiloglicosidase realizado através do ensaio 3 (Figura 11), observa-se que a melhor atividade enzimática de α -amilase (19,367 U/g) ocorreu ao final da fermentação, enquanto que a maior produção de amiloglicosidase foi verificada em 480 horas de cultivo, atingindo o valor numérico de 222,549 U/g.

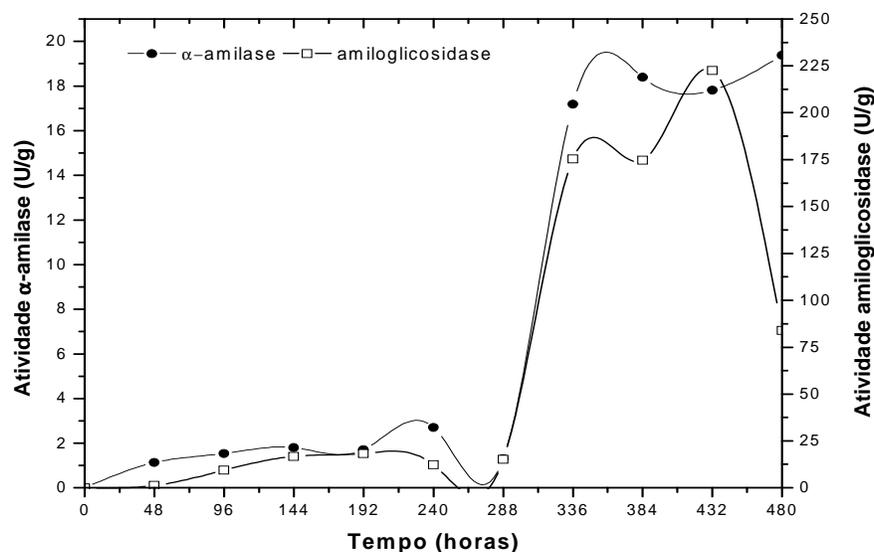


Figura 11. Ensaio 3. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (6,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

Quanto ao ensaio 4 (Figura 12), observa-se que as enzimas em estudo atingiram sua produção máxima no final do período de fermentação, atingindo um máximo de 17,683 U/g para a α -amilase e 178,275 U/g para a amiloglicosidase.

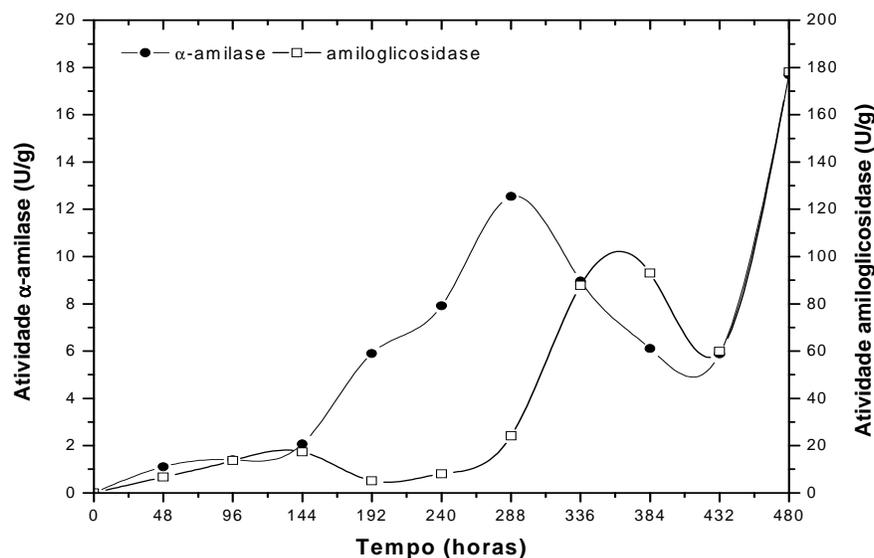


Figura 12. Ensaio 4. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (6,5), umidade (50%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

Observando os resultados obtidos através do ensaio 5 (Figura 13), verifica-se que as máximas produções das enzimas em estudo ocorreram no meio do processo fermentativo, atingindo um máximo de 4,470 U/g para a atividade de α -amilase, em 288 horas de fermentação e 39,34 U/g para a atividade de amiloglicosidase, após 192 horas de fermentação.

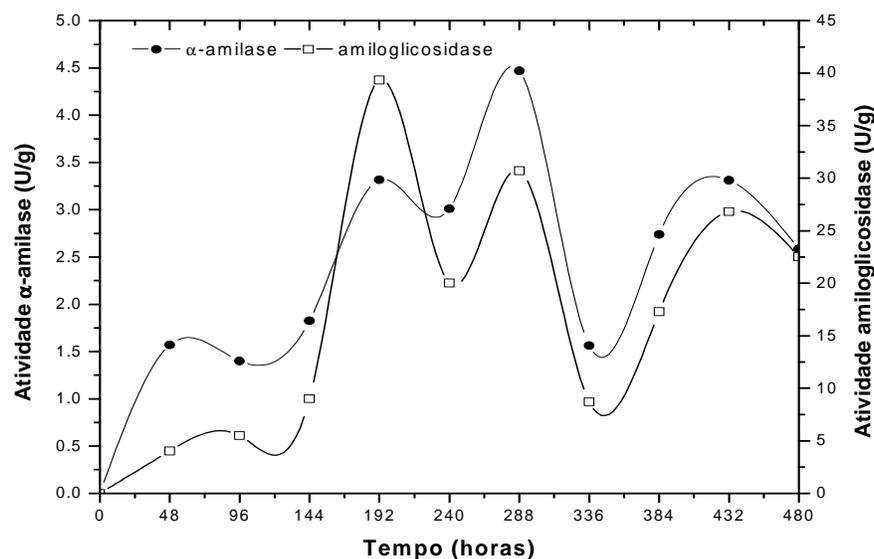


Figura 13. Ensaio 5. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (4,5), umidade (70%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

Através dos dados apresentados na Figura 14, observa-se que no ensaio 6 a maior produção de α -amilase (4,85 U/g) ocorreu em 336 horas de fermentação, enquanto a atividade máxima de amiloglicosidase (132,68 U/g) ocorreu em 432 horas de fermentação.

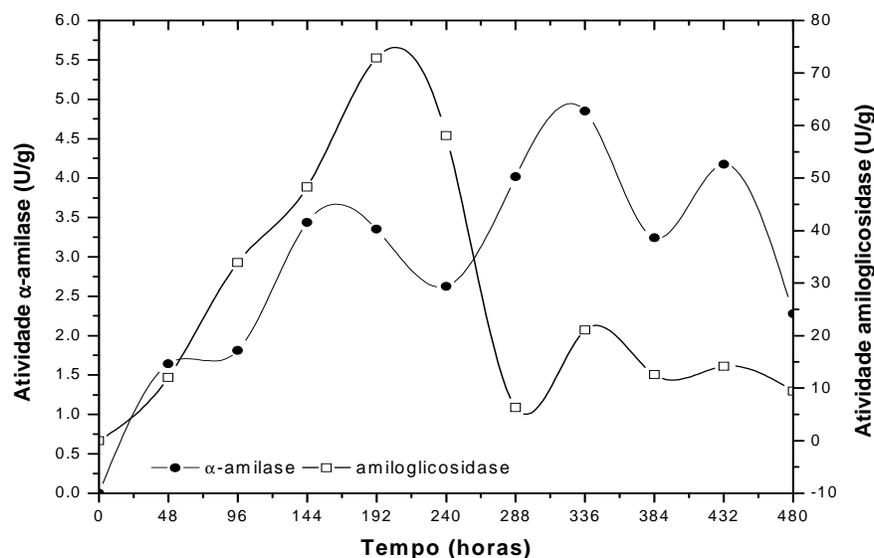


Figura 14. Ensaio 6. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (4,5), umidade (70%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

No caso dos resultados observados no ensaio 7 (Figura 15), constata-se que as máximas produções de α -amilase e amiloglicosidase ocorreram no mesmo tempo de fermentação, ou seja, em 432 horas de fermentação, a atividade máxima de α -amilase foi de 18,122 U/g e a atividade de amiloglicosidase foi de 132,68 U/g.

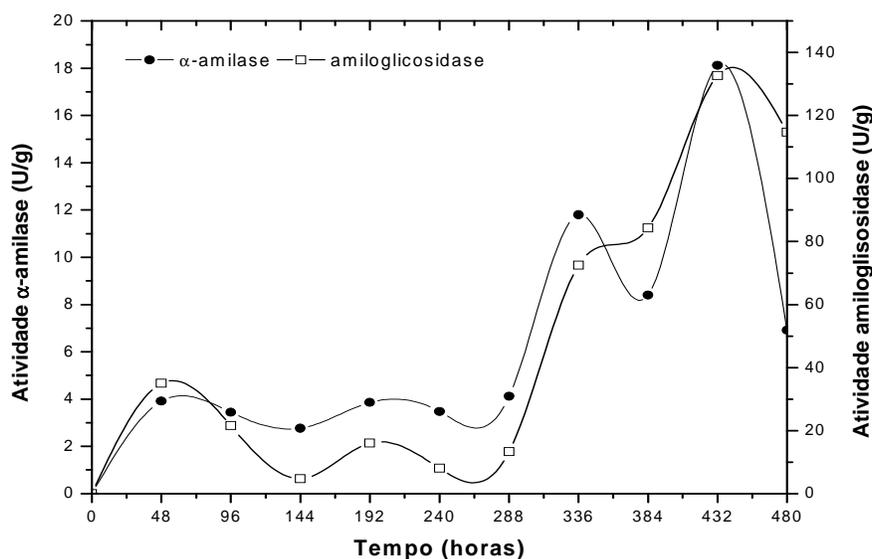


Figura 15. Ensaio 7. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (6/4 – p/p), pH (6,5), umidade (70%) e concentração de esporos (1×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio 8 (figura 16), verifica-se que a maior atividade de α -amilase (14,409 U/g) ocorreu em 384 horas de fermentação, enquanto a maior atividade de amiloglicosidase (226,35 U/g) ocorreu em 288 horas de fermentação.

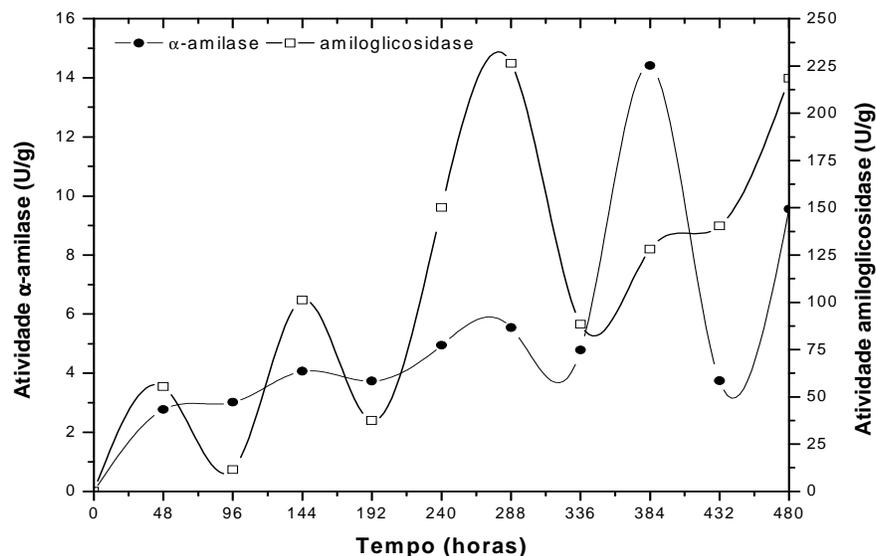


Figura 16. Ensaio 8. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (8/2 – p/p), pH (6,5), umidade (70%) e concentração de esporos (3×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

A Figura 17 expressa os resultados das médias obtidas nas três repetições dos ensaios do ponto central. Através dos dados, observa-se que os valores máximos de atividade de α -amilase e amiloglicosidase ocorreram após 432 horas de fermentação, atingindo valores máximos de 20,685 U/g para a α -amilase e 254,96 U/g para a amiloglicosidase.

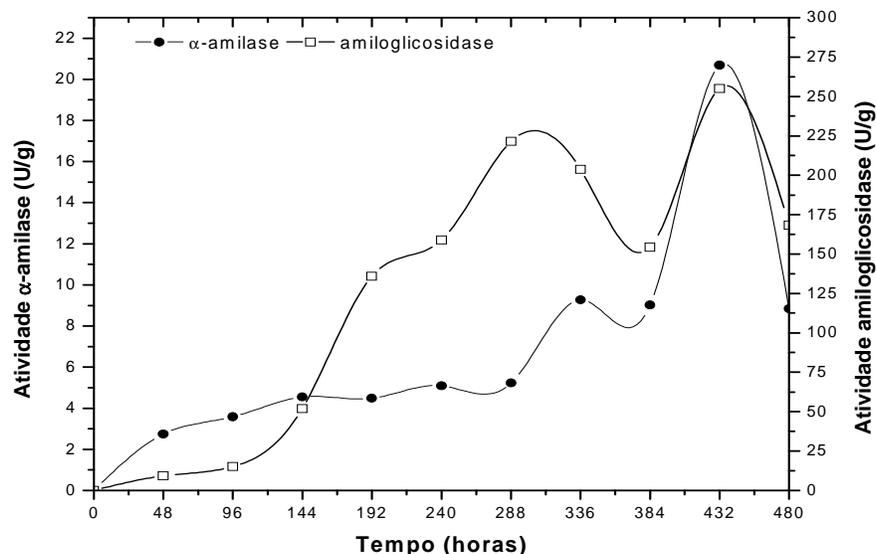


Figura 17. Ponto central com três repetições. Estudo do efeito da interação entre meio de cultivo (7/3 – p/p), pH (5,5), umidade (60%) e concentração de esporos (2×10^7 esporos/g) na produção de α -amilase (●) e amiloglicosidase (□) pelo *M. anisopliae* ATCC 60582 em fermentação semi-sólida por 480 horas.

A Tabela 7 expressa a média das atividades de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado. Nota-se pelos resultados apresentados que, para a atividade de α -amilase, a maior média obtida ocorreu no ensaio 3 (meio de cultivo constituído por farelo de arroz na proporção 6/4 (p/p), pH 6,5, umidade 50% e 3×10^7 esporos/g). Já para a amiloglicosidase, os maiores valores de atividade obtidos foram no ponto central (ensaios 9, 10 e 11).

Tabela 7. Resultados das médias e desvio padrões das atividades enzimáticas de α -amilase e amiloglicosidase, obtidos através de ensaios realizados do planejamento experimental 2^{4-1} fracionado.

Ensaio	Variáveis Independentes				Variáveis Dependentes	
	Meio de cultivo	pH	Umidade	Concentração de esporos	Atividade α -amilase (U/g)	Atividade amiloglicosidase (U/g)
1	6/4	4,5	50	1×10^7	$1,2973 \pm 0,749$	$105,336 \pm 80,711$
2	8/2	4,5	50	3×10^7	$4,5147 \pm 4,837$	$12,939 \pm 11,055$
3	6/4	6,5	50	3×10^7	$8,2937 \pm 8,542$	$72,955 \pm 85,390$
4	8/2	6,5	50	1×10^7	$6,954 \pm 5,199$	$49,376 \pm 56,247$
5	6/4	4,5	70	3×10^7	$2,5797 \pm 0,993$	$18,404 \pm 11,721$
6	8/2	4,5	70	1×10^7	$3,1427 \pm 1,050$	$28,873 \pm 23,349$
7	6/4	6,5	70	1×10^7	$6,68 \pm 4,926$	$50,281 \pm 47,184$
8	8/2	6,5	70	3×10^7	$5,6534 \pm 3,626$	$115,688 \pm 71,758$
9	7/3	5,5	60	2×10^7	$7,5767 \pm 4,993$	$146,818 \pm 91,492$
10	7/3	5,5	60	2×10^7	$7,5147 \pm 5,005$	$138,379 \pm 84,060$
11	7/3	5,5	60	2×10^7	$6,955 \pm 5,789$	$126,943 \pm 87,773$

Uma vez que o planejamento experimental é uma ferramenta estatística empregada, na maioria das vezes, com o intuito de se estudar, de forma sintetizada, os efeitos dos fatores (variáveis) no processo de fermentação, os valores obtidos nos ensaios foram estudados estatisticamente. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software Statistica 7.0, onde foi feita a análise dos efeitos estimados, estudando qual das variáveis testadas influenciou significativamente a produção das enzimas. As análises estatísticas foram realizadas para todos os tempos de fermentação, num intervalo de confiança de 95% e, para tal, foi observado o valor numérico do p-valor, que é o nível descritivo do teste. Portanto se o p-valor de um efeito for menor que o nível de significância estabelecido a princípio, esse efeito pode ser considerado estatisticamente significativo.

Tabela 8. Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, para produção de α -amilase.

Variável	<i>p</i> -valor									
	Tempo de cultivo									
	48h	96h	144h	192h	240h	288h	336h	384h	432h	480h
Meio de cultivo	0,6666	0,9745	0,5043	0,5118	0,2884	0,1502	0,7297	0,6386	0,4617	0,1515
pH	0,1383	0,2485	0,3867	0,1946	0,0682	0,1800	0,0698	0,0101	0,3244	0,0016
Umidade	0,0483	0,2094	0,1650	0,3498	0,8085	0,8676	0,2570	0,3926	0,8544	0,0033
Concentração de esporos	0,6460	0,9292	0,8813	0,2374	0,4899	0,3334	0,6324	0,0139	0,9403	0,0634

Tabela 9. Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, para produção de amilglicosidase.

Variável	<i>p</i> -valor									
	Tempo de cultivo									
	48h	96h	144h	192h	240h	288h	336h	384h	432h	480h
Meio de cultivo	0,9443	0,4580	0,5215	0,9411	0,6334	0,8062	0,5672	0,6284	0,2039	0,8898
pH	0,6042	0,1624	0,7184	0,5805	0,9677	0,7228	0,2828	0,0547	0,5637	0,1394
Umidade	0,4453	0,6003	0,9732	0,7959	0,6165	0,7318	0,5077	0,6455	0,4299	0,7114
Concentração de esporos	0,6266	0,0285	0,9754	0,9091	0,8354	0,7437	0,9989	0,6140	0,7259	0,5746

Uma vez que estabelecemos um intervalo de confiança de 95%, a influência das variáveis testadas só será considerada significativa, caso o *p*-valor seja inferior a 0,05. Sendo assim, de acordo com a Tabela 8, observa-se que a produção de α -amilase foi influenciada por fatores diferentes, dependendo do tempo de cultivo. Para 48 horas de fermentação, a umidade apresentou influência significativa, enquanto para os períodos de 384 e 480 horas, o pH foi um fator significativo. No caso do tempo de cultivo de 480 horas, a umidade e o pH foram fatores que influenciaram a produção de α -amilase, enquanto que a concentração de esporos apresentou influência significativa somente em 384 horas de cultivo.

Para a produção de amiloglicosidase (Tabela 9), somente com um tempo de cultivo de 96 horas a concentração de esporos mostrou apresentar influência significativa na produção de amilases. No entanto, sabe-se que quando se consideram as atividades enzimáticas ao longo do tempo de cultivo, temos grandes variações entre elas, então para que se possa fazer uma análise mais concreta, também é importante avaliar globalmente o processo. Por esse motivo, também foi realizada a análise estatística das médias de produção enzimática, obtidas ao longo de todo o tempo de cultivo de cada ensaio e os resultados estão expressos na Tabela 10.

Analisando os valores da Tabela 10, observa-se que para a produção da α -amilase, somente o pH apresentou influência significativa, enquanto nenhum dos fatores testados pareceu influenciar a produção de amiloglicosidase.

Tabela 10. Resultados obtidos através da análise estatística dos ensaios realizados através de planejamento experimental 2^{4-1} fracionado, considerando a média das produções de α -amilase e amiloglicosidase durante 480 horas de fermentação.

<i>Variável</i>	<i>p-valor</i>	
	<i>α-amilase</i>	<i>Amiloglicosidase</i>
<i>Meio de cultivo</i>	0,7926	0,8248
<i>pH</i>	0,0206	0,5055
<i>Umidade</i>	0,5804	0,8798
<i>Concentração de esporos</i>	0,5849	0,9388

Apesar da análise estatística dos dados não ter apontado influência significativa em todos os fatores testados, os valores de atividade enzimática observados nos experimentos foram bastante discrepantes. Para os ensaios realizados nesta etapa, a melhor atividade enzimática de amiloglicosidase (308,431 U/g) ocorreu utilizando meio de cultura constituído por farelo e casa de arroz na proporção 6/4 (p/p), pH de 4,5, umidade de 50% e concentração de inóculo de 1×10^7 /g. No entanto, este valor encontrado não foi superior ao verificado na primeira etapa da pesquisa (1433,361 U/g, em meio de cultivo 6/4, umidade 47% e concentração de inóculo de 1×10^7 esporos/g), indicando que o pH pode ter influenciado negativamente a produção da enzima. Ao contrário do verificado

neste estudo, Costa (1996) estudou a influência do pH na produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em FSS de farelo de arroz, obtendo o pH ótimo de produção da enzima equivalente a 4,6. No entanto, sabe-se que entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática (GUPTA *et al*, 2003), fazendo com que cada microrganismo tenha atuações diferentes em diferentes faixas de pH.

Os melhores valores médios observados para a produção das enzimas, tanto para a amiloglicosidase quanto para α -amilase, encontram-se no ponto central do planejamento experimental. Os resultados obtidos nesta condição são muito superiores aos observados na primeira etapa da pesquisa, ou seja, em meio constituído por farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), umidade de 65% e concentração de inóculo de 1×10^7 esporos/g. Em comparação ao ensaio realizado na primeira etapa, nos experimentos realizados no ponto central, além da diferença de pH, temos o aumento da concentração de inóculo para 2×10^7 esporos/g, que pode ter afetado positivamente a síntese da enzima. Sabe-se que, quanto menor a quantidade de inóculo, mais tempo é requerido para a multiplicação celular até atingir um número suficiente para a utilização do substrato e conseqüentemente para a obtenção do produto desejado. Um equilíbrio entre a proliferação de biomassa e a disponibilidade de nutrientes favorece a produção máxima da enzima. Ramachandram *et al.* (2004a) observaram que com o aumento da concentração de inóculo, ocorre aumento da produção de α -amilase, sendo que a melhor atividade verificada (1857 U/g) ocorreu com uma concentração de 6×10^8 esporos/mL. No entanto, após aumento desta concentração de inóculo, ocorreu diminuição da síntese da enzima, indicando que uma limitação de nutrientes ocorreu devido ao aumento da atividade microbiana.

Comparando os resultados de atividade enzimática obtidos em cada ensaio realizado, observa-se que no ponto central foi possível obter as maiores médias associadas de α -amilase e amiloglicosidase, sendo esta uma boa condição para a obtenção simultânea das duas enzimas estudadas.

5.5. Caracterização físico-química das enzimas amilolíticas produzidas

Os ensaios para a caracterização enzimática das enzimas α -amilase e amiloglicosidase foram realizados a partir das soluções enzimáticas brutas obtidas pelo cultivo do *Metarhizium anisopliae* durante a fermentação semi-sólida em farelo de arroz.

5.5.1. Caracterização físico-química das enzimas quanto ao pH e temperatura ótimos

Para o estudo do pH ótimo foi utilizada uma faixa de pH de 3,0 a 10,5. De acordo com a Figura 18, verifica-se que tanto a atividade enzimática de α -amilase quanto a amiloglicosidase apresentou pH ótimo de 5, sendo que em pH 5,5 as atividades ainda ficam bem próximas ao valor máximo obtido.

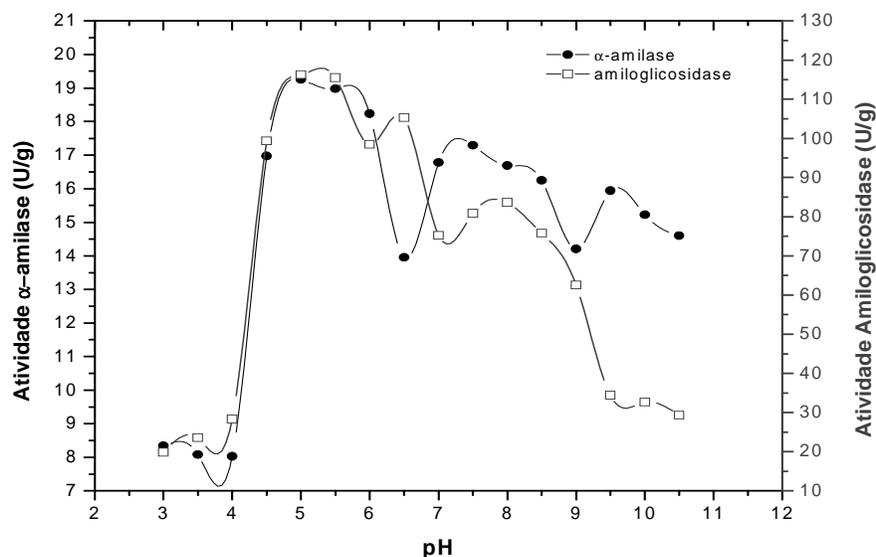


Figura 18. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) produzidas através de fermentação semi-sólida em farelo de arroz pelo fungo *M. anisopliae* ATCC 60582..

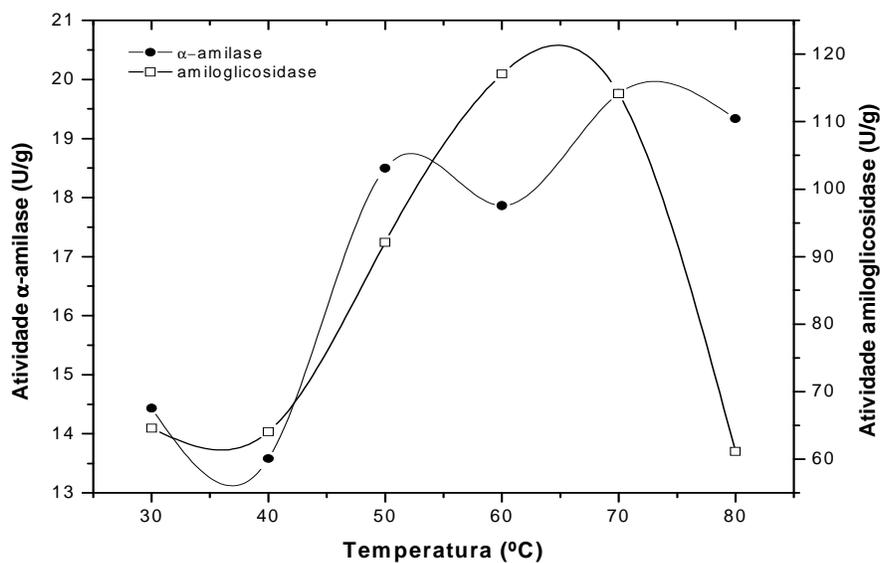


Figura 19. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) produzidas através de fermentação semi-sólida em farelo de arroz pelo fungo *M. anisopliae* ATCC 60582.

As enzimas também foram analisadas quanto à temperatura de atividade, variando a temperatura da reação enzimática numa faixa de 30 a 80°C. Os resultados obtidos (Figura 19) indicaram uma temperatura ótima de 70°C para a α -amilase, mantendo valores de atividade enzimática próximo ao máximo na faixa de 50 a 80°C, enquanto que a amiloglicosidase apresentou temperatura ótima de 60°C, mantendo atividade enzimática próximo ao máximo até 70°C.

5.5.2. Caracterização das enzimas quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura

Através da caracterização das enzimas quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura, observou-se que a α -amilase apresentou maior estabilidade numa faixa de pH de 5 a 6,5, mantendo cerca de 85 a 95% de sua atividade enzimática e na faixa de 7,5 a 9 manteve cerca de 85 a 90% da atividade enzimática (Figura 20). Em relação à estabilidade da amiloglicosidase, esta se apresentou estável numa faixa de pH de 5 a 5,5, mantendo cerca de 85 a 100% de atividade enzimática residual.

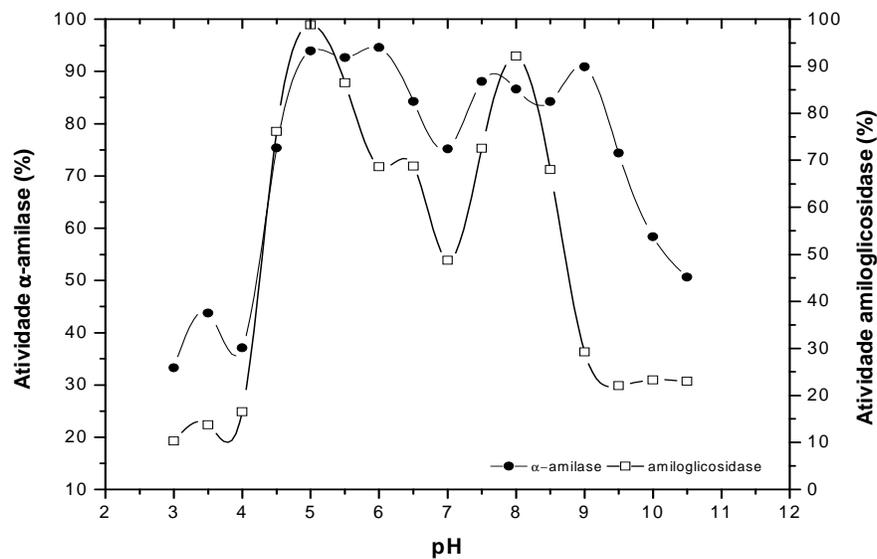


Figura 20. Estabilidade da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) frente às variações de pH.

Quando caracterizada quanto à estabilidade térmica, a α -amilase apresentou-se estável na faixa de temperatura de 10 a 50°C, apresentando nessa faixa uma atividade média de 90%, caindo gradativamente após 60°C até atingir um mínimo de 15% de atividade à 80°C (Figura 21).

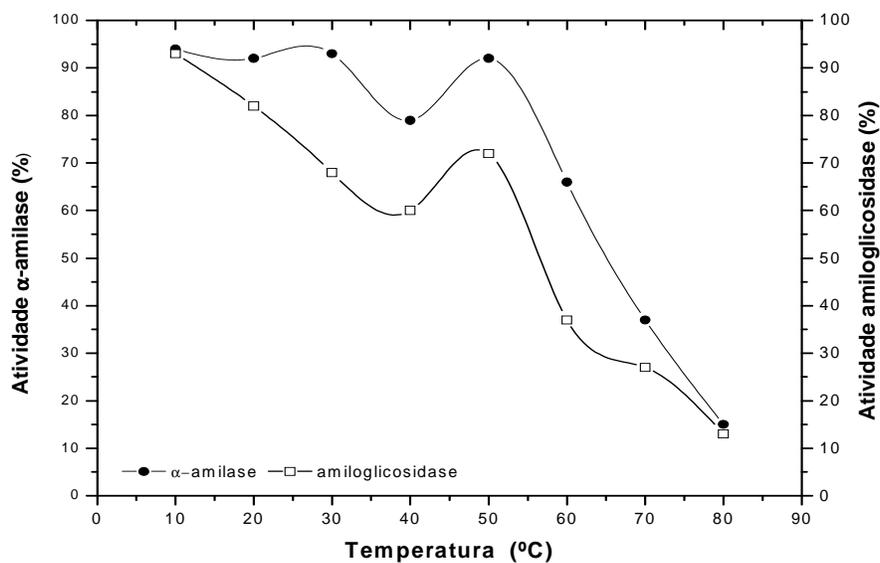


Figura 21. Estabilidade da α -amilase (●) e da amiloglicosidase (□) frente às variações de temperatura.

Relativo à estabilidade térmica da amiloglicosidase, esta apresentou estabilidade de 60 a 90% numa faixa de 10 a 50°C, obtendo em média 75% de atividade residual nesta faixa. Após 50°C a atividade enzimática diminuiu linearmente até atingir um mínimo de 13% à 80°C.

5.6 Efeitos dos íons nas atividades enzimáticas das amilases

As enzimas foram testadas quanto ao efeito de diferentes íons em sua atividade enzimática. Os resultados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 11. Efeito dos íons na atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase.

<i>Íons (10mM)</i>	<i>α-amilase (%)</i>	<i>Amiloglicosidase (%)</i>
<i>Controle</i>	100,0	100,0
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	288,5	59,4
<i>MnSO₄.H₂O</i>	264,0	83,9
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	68,2	14,7
<i>K₂SO₄</i>	262,6	69,8
<i>CaSO₄.2H₂O</i>	239,4	60,2
<i>EDTA</i>	245,8	50,0

Observa-se que para a α -amilase todos os íons testados apresentaram efeito positivo na atividade enzimática, exceto para o íon Zn^{+2} que ocasionou uma diminuição de aproximadamente 30% na atividade da enzima (Figura 22). No entanto, no caso da amiloglicosidase, todos os íons testados apresentaram efeito negativo na atividade enzimática, com destaque para o Zn^{+2} que apresentou a maior redução (aproximadamente 85%) na atividade enzimática (Figura 23)..

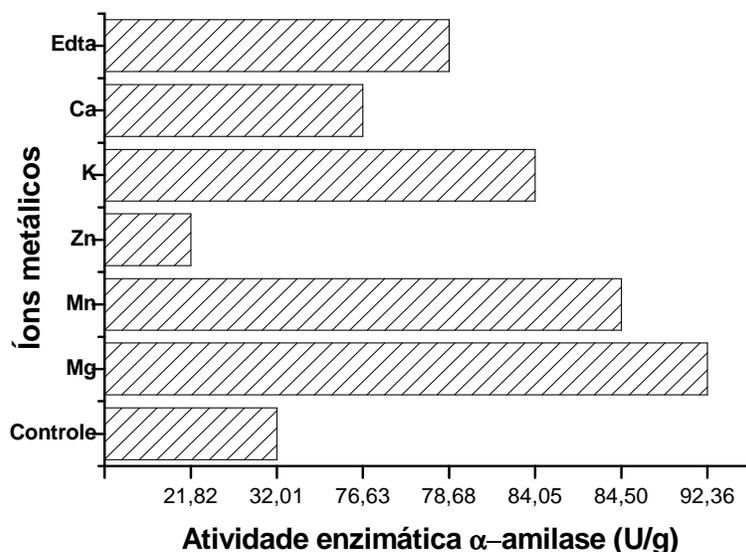


Figura 22. Efeito dos íons na atividade enzimática de α-amilase.

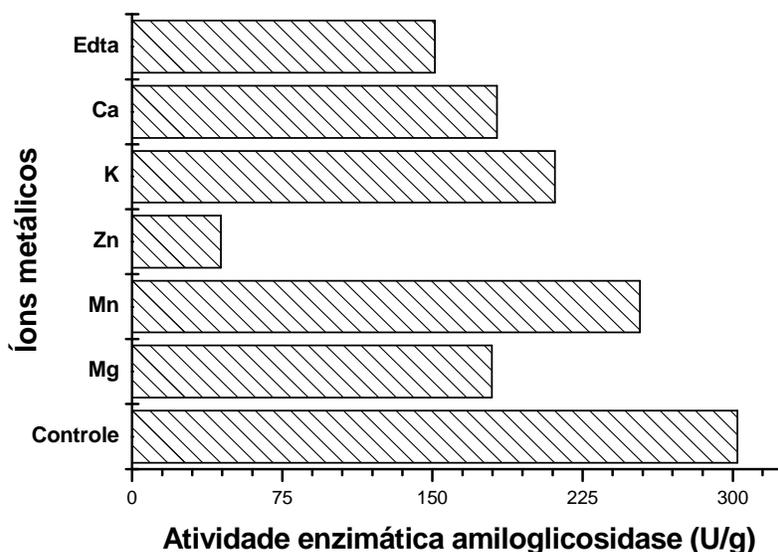


Figura 23. Efeito dos íons na atividade enzimática de amiloglicosidase

Os resultados obtidos quanto à caracterização do pH e temperatura ótimos são semelhantes aos encontrados na literatura. A faixa ótima de temperatura para atividade enzimática de amilases é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte. A atividade aumenta consideravelmente de 0° a 40°C e após 80°C ocorre queda considerável na atividade, permanecendo um residual de 1% (REED, 1975). O pH ótimo para a α-amilase fúngica está entre 5 e 6, possuindo caráter ácido (HARGER, 1982).

Mitidieri *et al.* (2006) pesquisaram a produção de amilase em fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus Niger* L119 e a temperatura e pH ótimo para a atividade amilolítica ocorreu na faixa de 50 – 55 °C e pH 4.

Moreira *et al.* (1999) estudaram a α -amilase e a glicoamilase obtidas através de fermentação com *Aspergillus tamaritii* em meio mineral suplementado com amido. As enzimas parcialmente purificadas exibiram máxima atividade na faixa de pH entre 4,5 - 6, mas atividades significativas foram observadas em condições ácidas (pH 4 a 7). Quanto à temperatura ótima, a máxima atividade foi obtida nas temperaturas entre 50 e 60°C.

Pires *et al.* (2002), caracterizando as enzimas amilolíticas da mandioca-salsa, observaram que as enzimas apresentaram pH ótimo de atividade em torno de 6 e mostraram-se sensíveis a pH próximo à alcalinidade. A temperatura ótima de ativação enzimática foi de 50°C, enquanto aos 70°C a atividade amilolítica foi reduzida em 80%. Em temperaturas altas (60 e 70°C), a inativação enzimática ocorreu após 60 e 25 minutos, respectivamente. Ensaio de estabilidade térmica mostraram que as amilases mantiveram alta atividade após 25 h mediante a incubação a 20 e 30°C.

Quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura, Jin *et al.* (1998) estudaram a α -amilase produzida pelo *Aspergillus oryzae* através de fermentação em água residual de processamento de amido e observaram que a enzima apresenta estabilidade em pH 5 a 9 e temperatura de 25°C e 35°C por 60 minutos.

Com relação aos ensaios realizados para identificar influência dos íons metálicos nas atividades enzimáticas, verificou-se que os dados divergem dos encontrados na literatura, pois para a α -amilase os íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} e EDTA apresentaram efeito positivo na atividade enzimática, enquanto o íon Zn^{+2} influenciou negativamente a atividade da enzima. Este resultado é interessante, uma vez que, durante a utilização das enzimas em processos industriais, podem ser gerados íons metálicos por corrosão de equipamentos e por esta razão, é importante que as enzimas utilizadas não sejam influenciadas negativamente por estes íons (CORDEIRO *et al.*, 2002). Além disso, os íons Ca^{2+} são importantes para a atividade enzimática, para a estabilidade térmica e para a manutenção da conformação espacial da enzima (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

Ramachandran *et al.*, (2004b) estudaram a influência de diferentes íons metálicos na atividade de α -amilase e indicaram que a enzima foi consideravelmente inibida por Na^{2+} , Mg^{2+} , K^{2+} . De forma interessante o íon Ca^{2+} que geralmente é conhecido por aumentar e estabilizar a atividade de α -amilase alfa em altas temperaturas, foi detectado

por inibir a atividade de α -amilase. Entre os íons de metal, manganês foi apontado por aumentar a atividade enzimática.

Martins et al. (2002), estudando a α -amilase produzida por uma linhagem de *Bacillus* sp, relatam que a enzima foi fortemente inibida pelos íons Co^{2+} , Cu^{2+} e Ba^{2+} , mas foi menos afetada por Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} . Pires et al. (2002), analisando a influência dos íons na atividade enzimática de amilase da mandioquinha-salsa, constataram que a presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} provoca um aumento na atividade enzimática, enquanto que íons de Cu^{2+} causam uma diminuição.

Para a atividade enzimática de amiloglicosidase, todos os íons testados apresentaram efeito negativo, com destaque para o Zn^{+2} , que apresentou a maior redução na atividade enzimática.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Das cepas estudadas, conclui-se que a melhor produtora de enzimas amilolíticas é o ATCC 60582.
- ✓ Os fatores umidade e meio de cultivo influenciaram a produção de α -amilase e amiloglicosidase, sendo que a melhor condição verificada para a produção das enzimas foi constituída por meio de cultivo com farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (p/p) e umidade de 47%.
- ✓ Quanto as variáveis testadas através de planejamento experimental, o pH influenciou na produção de α -amilase.
- ✓ O pH ótimo para a atividade de α -amilase e de amiloglicosidase é de 5 - 5,5, apresentando estabilidade numa faixa de 5 – 6,5 para a α -amilase e de 5,5 - 6 para a amiloglicosidase.
- ✓ A temperatura ótima para a atividade enzimática de α -amilase foi de 70°C e de 60°C para a amiloglicosidase, apresentando estabilidade numa faixa de 10 a 50°C.
- ✓ A atividade enzimática de α -amilase foi influenciada positivamente pelos íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} e EDTA, enquanto o íon Zn^{+2} influenciou negativamente a atividade da enzima. Para a amiloglicosidase, todos os íons testados apresentaram efeito negativo, com destaque para o Zn^{+2} que apresentou a maior redução na atividade enzimática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.

ARASARATNAM, V.; MYLVAGANAM, K.; BALASUBRAMANIAM, K. Glucoamylase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation with paddy husk as support. **Journal of Food Science**, v. 38, p. 334-338, 2001 *apud* ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.

ARZUMANOV, T.; JENKINS, N.; ROUSSOS, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1037-1042, 2005.

AEHLE, W.; MISSET, O. Enzymes for industrial applications. In: Rehm HJ, Reed G, editors. **Biotechnology**, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, p.189-216, 1999. *apud* GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B.; Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

ACUÑA-ARGUELLES, M. E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of water activity on exopectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 23–28, 1994.

AL-AIDROOS, K.; SEIFERT, A. M. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Invertebr. Pathol.** v. 36, p. 29-34, 1980. *apud* ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora FEALQ, Piracicaba, 1998, 1163p.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora FEALQ, Piracicaba, 1998, 1163p.

AMANULLAH, A.; BLAIR, R.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Bioengineering**. v. 62, p. 434-442, 1999. *apud* GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

ATKINSON, B. **Biochemical Reactors**. Pion Limited, London, 1984, 267 p.

- BAJRACHARYA, R.; MUDGETT, R. E. Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. **Biotechnology Bioengineering**, v. 22, p. 2219-2235, 1980.
- BECERA, M.; SISO, M. I. G. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 39-49, 1996.
- BEROVIC, M.; LOGAR-DERENCIN, M. Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 56, p. 209-211, 1993.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980, 233p.
- BRUINENBERG, P.M.; HULST, A. C.; FABER, A.; VOOGD, R.H. A process for surface sizing or coating of paper. 1996. European Patent Application EP 0,690,170 A1. *apud* GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN. B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- CHEN, H. Z. Advances in solid-state fermentation. **Research and Application of Microbiology**, v. 3, p. 7-10, 1992. *apud* COUTO, R. S.; SANROMÁN, M^a. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.
- CORDEIRO, M. A; MARTINS, M. L. L; LUCIANO, A. B. Production and properties of α -amilase from thermophilic *Bacillus sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57-61, 2002.
- COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. Tese de doutorado em engenharia de alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas. 1996, Campinas, 202 p.
- COUTO, R.S.; SANROMÁN, M^a. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.
- CRUZ, R.; SOUZA, E. L.; HOFFMAN, E. H. E.; BELINI, M. Z.; CRUZ, V.D.; VIEIRA, C. R. Relationship between carbon source, production and pattern action α -amylase from *Rhizopus sp.* **Rev. Microbiol.** v. 28, p.101-105, 1997.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em estado sólido**. In: SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial. Engenharia bioquímica, vol II. Editora Edgard Blucher, 1^a. edição. São Paulo, Brasil, 2001.
- DJEKRIF-DAKHMOCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, A.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p.190-197, 2006.

DORTA, B.; ERTOLA, J.R.; ARCAS, J. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 434-439, 1996.

DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 501-505, 1998.

ERATT, J. A.; DOUGLAS, P. E.; MORANELLI, F.; SELIGY, V. L. The induction of α -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. **J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 62, p. 678-690, 1984.

FERRON, G.; BONNARAME, P.; DURAND, A. Prospects of the microbial production of food flavours. **Trends Food Science Technology**, v. 7, p. 285–293, 1996.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, A.; SZAKACS, G. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, p.107–115, 2003.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HARADA, O.; LYSENKO, E. D.; PRESTON, K. R. Effects of commercial hydrolytic enzyme additives on Canadian short process bread properties and processing characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 77, p.70–76, 2000. *apud* KIM, J. H.; MAEDA, T.; MORITA, N. Effect of fungal α -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. **Food Research International**, v. 39, p. 117-126, 2006.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das fermentações**, 1982. 56 p.

HENDRIKSEN, H. V.; PEDERSEN, S.; BISGARD-FRANTZEN, H. **A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches**. Patent Application. WO 99/35325. 1999. *apud* GUPTA, R., GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN. B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

JIN, B.; VAN LEEUWEN, H. J.; PATEL, B.; YU, Q. Utilization of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 201-206, 1998.

JOHNS, M. R.; STUART, D. M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 23–28, 1991.

- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D.G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 276 – 281, 1998.
- KIM, J.H.; MAEDA, T.; MORITA, N. Effect of fungal α -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. **Food Research International**, v. 39, p. 117-126, 2006.
- KRISHNA, C.; CHANDRASEKARAN, M. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 46, p. 106–111, 1996.
- LACHMUND, A.; URMANN, U.; MINOL, K.; WIRSEL, S.; RUTTKOWSKI, E. Regulation of α -amilase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. **Curr. Microbiol**, v. 26, p. 47-51, 1993.
- LEHNINGER, A .L. **Bioquímica: Componentes moleculares das células**, 2^a ed, Editora Edgar Blucher, São Paulo, 1976.
- MARTINS, M. L. L.; CORDEIRO, C. A. M.; LUCIANO, A. B. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57-61, 2002.
- MC KNIGHT, I.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene Alimentar**, v.14, n.72, p.35 – 45, 2000.
- MEDEIROS, A.; PANDEY, A.; CHRISTEN, P.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S.; SOCCOL, C. R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.17, p. 767–771, 2001.
- MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1387–1391, 2004.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Biochem**, v.31 p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.
- MITCHELL, D. A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p.167-178, 1999.
- MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MOORE, G. R. P.; DO CANTO, L. R.; AMANTE, E. R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. **Química nova**, v. 28, n.4, p. 596-600, 2005.

MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Revista de microbiologia**, v. 30, p.157-162, 1999.

MORKEBERG, R.; CARLSEN, M.; NEILSEN, J. Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. **Microbiology**, v. 141, p. 2449-2454, 1995.

NAVARRETE-BOLAÑOS, J. L.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; BOTELLO-ALVAREZ, E.; RICO-MARTÍNEZ, R.; PAREDES-LÓPEZ, O. An optimization study of solid-state fermentation: xanthophylls extraction from marigold flowers. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 65, p.383–390, 2004.

OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inerte supports: their potential as soli-state fermentation production systems. **TIB Technology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

PATRICK, M.S; ADLARD, M.W.; KESHAVARZ, T. *Swainsonine* production from batch cultures of *Metarhizium anisopliae* in stirred-tank reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 428-432, 1996.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p.149–162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDERBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000b.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J., NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology. New Delhi: Asiatech Publishers Inc, 2001. *apud* COUTO, R.S., SANROMÁN, M^a. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

PIRES, T. C. P.; VEIGA, E. M.; FINARDI FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa. (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 278-284, 2002.

PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; LISBOA, C.; PACA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p.179–186, 2004.

PRITCHARD, P. A. Studies on the bread improving mechanisms of fungal α -amylase. **J. Biol. Educ.**, v. 8, p.12-26, 1992. *apud* GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.;

GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P.; JOLINK, F.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. **Biomolecular Engineering**, v. 22, p. 133-139, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G. Coconut oil cake - a potential raw material for the production of α -amylase. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 169-174, 2004a.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 309-317, 2004b.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

RODRÍGUEZ-COUTO, S.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 287-293, 2000.

SCRIBAN, R. **Biotechnologie, Techniques et documentations**. Lavoisier, p. 90-717. 1993. *apud* DJEKIRIF-DAKHMOCHE, S.; Z. GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, A. BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p.190-197, 2006.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 83-85, 1997.

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Fruit flavor production by *Ceratocystis frimbriata* grown on coffee rusk in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 857-861, 2000.

SURYANARAYAN, S. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.189-195, 2003.

TUNGA, R.; TUNGA, B.S. **Extra-cellular amylase production by *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation**. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 2003. 12p.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2001.

VANDERBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid state fermentation for the syntesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.

WARD, O. **Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos y Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p. 64-67 e 233-247.

APÊNDICE

Tabela 1A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por diferentes linhagens de *M. anisopliae* em meio constituído por farelo e casca de arroz.

Tempo (horas)	ATCC 60582		CG291		3935		4516	
	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)						
24	1,026	7,928	1,268	2,648	0,909	2,674	1,465	3,221
48	0,707	10,127	1,327	6,678	1,617	2,685	1,409	2,345
72	0,412	11,510	1,537	1,468	1,658	10,615	1,524	4,014
96	1,608	15,518	1,327	2,210	1,837	1,441	1,518	5,076
120	1,450	16,479	1,401	3,289	2,181	1,146	1,931	4,665
144	0,880	10,592	1,861	2,041	1,566	3,023	1,582	4,159
168	2,897	16,150	1,947	0,304	2,139	4,673	1,443	4,183
192	0,927	14,807	1,702	2,294	2,181	8,876	1,339	5,481
216	6,492	18,987	1,721	2,193	2,407	4,275	1,506	4,098
240	0,099	14,067	1,586	2,766	2,348	1,062	1,370	4,874
264	0,935	14,404	1,828	1,130	1,852	2,720	1,523	6,543
288	4,886	13,048	1,696	2,682	1,706	3,346	1,183	3,504
312	8,064	16,418	1,899	3,390	1,604	2,343	1,477	6,639
336	4,649	15,723	2,043	1,586	1,654	0,944	1,321	5,481
360	11,263	16,572	1,758	0,000	1,514	1,865	1,506	6,948
384	5,015	16,750	1,801	2,395	1,822	3,704	1,559	5,886
408	16,373	18,870	1,786	1,687	1,906	3,456	1,517	2,193
432	10,490	17,385	1,352	0,355	1,433	2,343	1,355	5,500
456	12,766	16,503	1,353	0,700	1,514	0,631	1,461	4,150
480	16,266	14,589	1,045	0,880	1,361	0,364	1,363	3,200

Tabela 2A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por *M. anisopliae* em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 6/4 (p/p) e com variados níveis de umidade.

Tempo (horas)	Farelo/casca: 6/4 – Umidade: 47%		Farelo/casca: 6/4 – Umidade: 65%		Farelo/casca: 6/4 – Umidade: 74%	
	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)*	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)
24	111,953	-	0,733	2,159	1,248	5,333
48	125,710	205,377	0,481	0,355	1,254	6,446
72	135,128	-	1,219	2,932	1,819	2,195
96	151,809	494,205	1,087	19,341	1,847	2,858
120	187,239	-	0,692	4,517	2,270	0,548
144	188,792	545,635	1,140	6,422	2,257	5,517
168	186,539	-	1,653	6,008	2,106	3,345
192	185,039	521,823	0,804	2,032	2,173	1,302
216	159,803	-	1,444	16,608	1,967	0,382
240	151,530	1164,319	1,782	16,443	2,037	1,634
264	132,941	-	1,943	7,581	1,878	2,287
288	100,739	1015,213	2,052	2,364	1,816	8,692
312	153,631	-	1,656	31,930	2,361	1,689
336	166,053	1271,990	1,900	7,192	1,791	5,723
360	191,842	-	2,038	5,229	1,873	2,309
384	192,621	1214,970	2,006	7,977	1,847	4,692
408	193,576	-	1,843	15,621	1,250	1,300
432	210,858	1235,840	1,564	6,260	1,760	1,558
456	204,497	-	1,517	11,413	1,888	0,527
480	185,065	1433,361	1,428	5,916	1,826	9,931

* Experimentos realizados com 4 repetições, com amostras retiradas a cada 48 horas.

Tabela 3A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por *M. anisopliae* em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 7/3 (p/p) e com variados níveis de umidade.

Tempo (horas)	Farelo/casca: 7/3 – Umidade: 47%		Farelo/casca: 7/3 – Umidade: 65%		Farelo/casca: 7/3 – Umidade: 74%	
	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)
24	2,102	1,026	1,249	0,511	1,157	1,082
48	2,625	0,861	1,190	1,072	1,131	0,612
72	2,984	0,539	1,570	0,686	1,234	0,557
96	4,023	1,717	1,187	0,419	1,476	0,207
120	4,273	1,450	1,690	2,094	2,022	0,253
144	2,746	0,879	1,534	0,668	1,716	2,149
168	4,187	2,986	2,070	0,953	1,608	2,195
192	3,839	1,137	2,049	3,575	1,998	4,026
216	4,923	6,492	1,500	0,391	1,663	1,919
240	3,647	0,253	1,155	9,501	2,215	2,710
264	3,734	0,935	1,656	1,579	1,874	4,937
288	3,383	4,886	1,914	1,146	2,065	0,437
312	4,256	8,063	1,960	6,704	1,150	0,327
336	4,076	4,649	1,511	3,833	1,818	0,355
360	4,296	11,263	2,057	6,879	1,898	0,189
384	4,342	5,014	1,969	5,204	2,172	0,980
408	4,892	16,373	1,831	3,511	1,814	0,299
432	5,157	10,490	1,748	2,351	1,584	0,953
456	4,908	12,766	1,705	1,983	1,458	0,511
480	4,836	16,265	1,466	0,327	1,263	0,327

Tabela 4A. Valores de atividade enzimática de α -amilase e amiloglicosidase, obtidas através de FSS por *M. anisopliae* em meio constituído por farelo e casca de arroz em proporção 8/4 (p/p) e com variados níveis de umidade.

Tempo (horas)	Farelo/casca: 8/2 – Umidade: 47%		Farelo/casca: 8/2 – Umidade: 65%		Farelo/casca: 8/2 – Umidade: 74%	
	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)	α -amilase (U/g)	Amiloglicosidase (U/g)
24	0,453	0,999	0,644	0,649	1,322	3,941
48	0,434	1,606	0,691	2,195	1,201	4,821
72	0,992	13,100	0,834	0,907	1,610	5,766
96	0,555	0,888	0,829	0,815	1,990	6,453
120	1,304	2,609	1,704	3,078	1,930	5,551
144	0,451	3,769	1,686	9,223	1,812	16,137
168	1,770	6,281	1,708	13,624	1,985	17,275
192	1,332	8,839	1,588	10,404	2,151	10,683
216	1,718	14,995	1,889	19,400	1,995	8,729
240	1,622	10,026	1,811	8,149	1,596	20,216
264	1,585	13,237	2,359	13,195	1,844	21,719
288	1,528	13,007	2,138	8,042	2,014	45,831
312	1,634	10,192	2,081	11,456	2,233	40,872
336	1,632	9,842	1,620	6,303	1,957	53,518
360	1,862	11,011	2,182	13,023	2,012	26,700
384	1,600	20,047	2,292	7,913	1,990	19,508
408	1,635	14,397	2,131	15,514	2,084	31,167
432	1,978	5,719	2,424	15,449	2,177	20,495
456	1,917	4,367	2,294	7,162	2,221	45,831
480	1,621	13,928	1,953	4,671	2,191	21,805

Tabela 5A. Valores de atividade enzimática de α -amilase, obtidas através de FSS por *M. anisopliae* em planejamento experimental 2^{4-1} , variando meio de cultivo, umidade, pH e concentração e inóculo.

<i>Atividade enzimática α-amilase (U/g)</i>										
<i>ENSAIO</i>	<i>48 h</i>	<i>96 h</i>	<i>144 h</i>	<i>192 h</i>	<i>240 h</i>	<i>288 h</i>	<i>336 h</i>	<i>384 h</i>	<i>432 h</i>	<i>480 h</i>
1	0,698	0,137	0,731	1,774	1,266	0,975	1,665	0,975	2,623	2,129
2	0,643	0,441	0,636	0,605	0,886	1,938	9,488	10,697	7,937	11,876
3	1,135	1,533	1,797	1,705	2,710	1,308	17,184	18,381	17,817	19,367
4	1,101	1,398	2,063	5,902	7,914	12,536	8,958	6,106	5,879	17,683
5	1,569	1,400	1,826	3,317	3,013	4,470	1,566	2,739	3,312	2,585
6	1,642	1,811	3,439	3,351	2,625	4,016	4,850	3,240	4,176	2,277
7	3,912	3,445	2,762	3,857	3,477	4,120	11,797	8,399	18,122	6,909
8	2,771	3,011	4,060	3,731	4,945	5,539	4,783	14,409	3,736	9,549
9	3,452	4,367	4,907	4,879	5,096	5,405	9,038	9,107	20,420	9,096
10	2,920	4,768	4,846	5,162	5,122	5,133	9,394	9,104	20,400	8,298
11	1,843	1,605	3,905	3,422	5,047	5,135	9,394	8,832	21,236	9,131

Tabela 6A. Valores de atividade enzimática de α -amilase, obtidas através de FSS por *M. anisopliae* em planejamento experimental 2^{4-1} , variando meio de cultivo, umidade, pH e concentração e inóculo.

<i>Atividade enzimática amiloglicosidase (U/g)</i>										
ENSAIO	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	288 h	336 h	384 h	432 h	480 h
1	43,413	57,161	92,607	55,836	73,559	106,852	96,251	48,465	308,431	170,787
2	5,308	9,623	32,481	30,150	16,881	1,424	5,648	6,559	3,578	17,740
3	1,228	9,409	16,859	18,319	12,312	15,185	175,259	174,597	222,549	83,828
4	6,617	13,660	17,396	5,136	8,099	24,138	87,804	92,938	59,894	178,075
5	4,032	5,514	9,029	39,340	19,994	30,730	8,725	17,302	26,843	22,528
6	12,025	33,889	48,299	72,896	58,072	6,311	21,046	12,565	14,197	9,430
7	34,966	21,540	4,792	16,043	8,035	13,295	72,482	84,325	132,608	114,720
8	55,256	11,528	101,137	37,367	150,083	226,358	88,301	128,053	140,393	218,408
9	9,323	12,458	42,518	188,842	156,708	229,174	227,683	167,061	248,802	185,612
10	9,645	16,709	58,735	157,371	160,021	217,745	177,413	176,916	263,626	145,611
11	8,722	16,237	54,345	61,468	160,021	217,745	205,902	119,109	252,446	173,438