

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES
FÚNGICAS: ESTUDO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS
E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS**

Osania Emerenciano Ferreira

Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES
FÚNGICAS: ESTUDO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS
E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS**

Osania Emerenciano Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária)

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

F383 Ferreira, Osania Emerenciano
a Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a produção
de amilases fúngicas: Estudo de parâmetros fermentativos e
caracterização das enzimas / Osania Emerenciano Ferreira. – –
Jaboticabal, 2011
xv, 56 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001

Orientadora: Marcia Rossini Justino Mutton. Banca examinadora:
Eduardo da Silva Martins, João Martins Pizauro Júnior

Bibliografia

1. Enzimas . 2. Alfa-amilase. 3. *Rhizopus oryzae*. 4. *Malbranchea pulchella*. 5. *Chrysosporium zonatum*. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 663.1:577.73

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

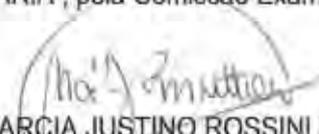
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES FÚNGICAS: ESTUDO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

AUTORA: OSANIA EMERENCIANO FERREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. EDUARDO DA SILVA MARTINS

Universidade do Estado de Minas Gerais / Frutal/MG



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 29 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

OSANIA EMERENCIANO FERREIRA – nasceu aos 20 de abril de 1983, na cidade de Frutal, estado de Minas Gerais. Em Agosto de 2002 ingressou no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, na Universidade do Norte Paulista recebendo o título de licenciatura plena no ano de 2004 e Bacharel em 2005 ambos em Ciências Biológicas. A partir de 2007 passou a integrar o quadro docente da Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG - Campus de Frutal, MG, dedicando-se a área de Microbiologia Aplicada, voltada para processos fermentativos e qualidade da matéria-prima. Foi aprovada para o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) da FCAV – UNESP em Agosto de 2009, obtendo o título de mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) em 29 de agosto de 2011.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

Ofereço

A minha amada família meus pais Osorio e Odete;
Minhas irmãs Odelma e Ozilenia
e ao nosso pequeno anjo meu sobrinho Ryan.
Obrigada, pelo carinho e apoio incondicional.

Agradecimento

-A Deus, por tudo, por todos, pela vida...

-A Fundação de Amparo a pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa.

-A Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - Campus de Frutal, MG, pelo apoio na realização do mestrado.

-Aos Coordenadores e docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária que me possibilitam este crescimento profissional.

-A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, por aceitar me orientar, pela acolhida carinhosa, atenção, pelos ensinamentos, pelas amizades e pela paciência.

-Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela amizade e atenção.

-Aos meus queridos colegas de trabalho, Eduardo por me incentivar sempre, Prof. Maria José, Patricia, Monica, Gercina, Allynson, Marília, Vera, Fernanda, Fernando, ao Jhansley pelo auxílio e paciência na análise estatística.

-Aos meus queridos alunos Elker, Nayara e Matheus, ao Felipe Zuccoloto pelo auxílio na identificação das cepas dos fungos.

-Aos meus queridos amigos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool, Ju, Lidyane, Igor, Gustavo, Bruno, Larissa, Allynson ao Técnico do laboratório Sergio.

-A secretárias do departamento de Tecnologia Renata e Bethe pela amizade, carinho e atenção.

-A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e de minha formação profissional e pessoal. Obrigada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Acúmulo de amido pela cana-de-açúcar	3
2.2 Utilização industrial das enzimas	6
2.3 Amilases	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Isolamento das linhagens	13
3.2 Identificação das cepas fúngicas	13
3.3 Conservação e manutenção das cepas	14
3.4 Meios de cultivo para inóculo e substratos para a fermentação e obtenção do extrato enzimático	14
3.5 Determinação do pH inicial do substrato	15
3.6 Preparo do suporte	15
3.7 Condições fermentativas iniciais para a produção enzimática	17
3.8 Obtenção do extrato enzimático	17
3.9 Determinação da atividade de α -amilase (reação dextrinizante)	18
3.10 Avaliação de diferentes condições fermentativas para a produção enzimática	19
3.10.1 Fontes de nitrogênio suplementares ao meio de fermentação	19
3.10.2 Determinação da melhor Umidade	19
3.10.3 Temperatura de incubação e pH inicial do substrato	20
3.11 Caracterização dos extratos enzimáticos	20
3.11.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática	20
3.11.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática	20
3.11.3 Determinação da estabilidade térmica da enzima a 75°C	20
3.12 Análise estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Análise do substrato utilizado	22
4.2 Classificação taxonômica das cepas de fungos	22
4.3 Seleção da cepa com maior potencial amilolítico	23
4.3.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	23
4.3.2 <i>Malbranchea pulchella</i>	24
4.3.3 <i>Chrysosporium zonatum</i>	26

4.4 Efeito da fonte de nitrogênio sobre a atividade enzimática em <i>Rhizopus oryzae</i>	29
4.5 Umidade	33
4.6 Efeito do pH inicial do substrato e temperatura de incubação do fungo sobre a síntese de α -amilase em farelo de trigo.	36
4.7 Caracterização da α -amilase de <i>R. oryzae</i>	37
4.7.1 Efeito do pH.....	37
4.7.2 Efeito da temperatura	39
4.8. Estabilidade da Enzima a 75°C	41
5 CONCLUSÕES	45
6 REFERÊNCIAS.....	46
7 APÊNDICE	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Esquema da síntese de sacarose nas plantas.4
- Figura 02.** Substratos agroindústrias utilizados no processo de Fermentação em Estado Sólido (FES). 14
- Figura 03.** Bagaço de cana após processamento para utilização como suporte. 16
- Figura 04.** Placa de Petri com cultura de *R. oryzae* em meio Sabouraud com 1% de amido, após 48 h de cultivo, verso e reverso da placa.23
- Figura 05.** Atividade de α -amilase em *R. oryzae*, em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.24
- Figura 06.** Placa de Petri *M. pulchella* em meio de cultura Sabouraud com 1% de amido, com 120 h de cultivo verso e reverso da placa.25
- Figura 07.** Atividade de α -amilase em *M. pulchella*, em meio de cultivo contendo quirea de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 45°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.25
- Figura 08.** Placa de Petri *Chrysosporium zonatum* em meio de cultura Sabouraud.26
- Figura 09.** Atividade de α -amilase em *C. zonatum*, em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 45°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.27
- Figura 10.** Visualização da atividade enzimática da α -amilase de *R. oryzae* em 24 horas de fermentação. A esquerda (Controle do amido) tampão com substrato sem extrato enzimático. A direita tampão com substrato e extrato enzimático.28
- Figura 11.** Influência do teor de umidade na atividade de α -amilase em *R. oryzae*, a) 50% de umidade b) 60% de umidade c) 70% de umidade em meio de cultivo contendo farelo de trigo como substrato, em solução nutriente

composta por NH_4NO_3 a 0,1% e NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C , contendo bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 120h.	34
Figura 12. Caracterização físico-química da enzima bruta de <i>R. oryzae</i> , avaliação da atividade da enzima frente as variações de pH, nos seguintes tampões: acetato (pH 3,0 -5,5), citrato/NaOH (pH 5,5 – 7,0), Tris/HCl (pH 7,0 – 8,5) e glicina/ NaOH (8,5 – 10,5).....	38
Figura 13. Caracterização físico-química da enzima bruta de <i>R. oryzae</i> , avaliação da atividade da enzima frente as variações de temperatura entre $30\text{-}95^\circ\text{C}$	40
Figura 14. Perda da estabilidade da enzima em função do tempo (min).....	42
Figura 15. Avaliação da estabilidade da enzima α -amilase a 75°C , em intervalos de 2 minutos.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Distribuição do amido em variedades de cana-de-açúcar (ppm)	5
Tabela 02. Tipos de açúcares e/ou nomes comerciais e suas especificações ofertados para o mercado externo e interno.	9
Tabela 03. Características das enzimas que pertencem a família das α -amilases... ..	11
Tabela 04. Mercado mundial de vendas de enzima.....	11
Tabela 05. Componentes do bagaço de cana-de-açúcar in natura.	17
Tabela 06. Valores de pH inicial nos três substratos, arroz, milho e trigo.....	22
Tabela 07. Classificação taxonômica de <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Malbranchea pulchella</i> e <i>Chrysosporium zonatum</i>	22
Tabela 08. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para <i>R. oryzae</i>	24
Tabela 09. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para <i>M. pulchella</i>	26
Tabela 10. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para <i>C. zonatum</i>	27
Tabela 11. Influência da suplementação de nitrogênio na atividade enzimática de <i>Rhizopus oryzae</i>	30
Tabela 12. Número médio de atividade enzimática de <i>R. oryzae</i> nos substratos, suplementados com sais, H ₂ O destilada e farelo de soja a 1%.	32
Tabela 13. Número médio de atividade enzimática nos substratos para diferentes porcentagens de umidade em <i>R. oryzae</i>	35
Tabela 14. Atividade enzimática sob diferentes condições de temperatura e de pH em farelo de trigo, com 24 horas de fermentação para <i>R. oryzae</i>	36
Tabela 15. Atividade enzimática U/mL, e atividade residual da enzima em %, em temperaturas de 30-95°C.....	41
Tabela 16. Melhores condições fermentativas para obtenção da α -amilase de <i>R. oryzae</i> e caracterização da enzima.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

FSM	Fermentação Submersa
FES	Fermentação em Estado Sólido
VVHP	Very Very High Polarization
BPF	Boas Práticas de Fabricação
APPCC	Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle

APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES FÚNGICAS: ESTUDO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

RESUMO - A utilização de fermentação em estado sólido a partir de subprodutos agroindustriais possibilita a obtenção de várias biomoléculas de interesse industrial. As amilases são enzimas com grande aplicação nas indústrias têxtil, farmacêuticas, alimentícias e sucroalcooleira, representando aproximadamente 25% do mercado mundial. Neste trabalho foram isoladas três linhagens fúngicas (*Rhizopus oryzae*, *Malbranchea pulchella* e *Chrysosporium zonatum*), que apresentaram potencial amilolítico, quando cultivadas em três resíduos agroindustriais (quirera de arroz e de milho e farelo de trigo). Para a cepa que apresentou maior atividade enzimática, avaliou-se melhor substrato, tempo de cultivo, teores de umidade, fontes suplementares de nitrogênio, pH e temperatura de incubação, objetivando otimizar as condições de cultivo. Observou-se que a maior atividade enzimática foi obtida com a cepa de *R. oryzae* em 24 horas de fermentação, em meio de cultura contendo farelo de trigo como substrato, em temperatura de 35°C, utilizando solução de sais composta de NH_4NO_3 a 0,1% e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% como fonte de nitrogênio. Alterações de pH entre 4,0 e 6,0 não afetaram significativamente a síntese da enzima. As condições ótimas de atuação foram temperatura de 75°C e pH de 4,5. A enzima manteve-se estável a 75°C na ausência de substrato por 25 minutos.

Palavras chaves: alfa-amilase, enzimas, *Chrysosporium zonatum*, *Malbranchea pulchella*, *Rhizopus oryzae*.

UTILIZATION OF AGRO-INDUSTRIAL BYPRODUCTS FOR THE PRODUCTION OF FUNGAL α - AMYLASE: STUDY OF FERMENTATIVE PARAMETERS AND CHARACTERIZATION OF ENZYME

ABSTRACT - The use of fermentation in a solid state from agroindustrial byproducts permits the obtaining of several biomolecules of interest the industry, like the enzymes. The amylases are enzymes with great application on the textile, pharmaceutical and food industries, representing around 25% of the worldwide market. In this work three ungal strains (*Rhizopus oryzae*, *Malbranchea pulchella* and *Chrysosporium zonatum*) were isolated. They presented amylolytic potential when cultivated in three agroindustrial by products (brewers rice, corn grits and wheat bran). To the strain that presented the greatest enzyme activity, it was evaluated the best substrate, cultivation time, moisture content, additional sources of nitrogen, pH and incubation temperature, aiming the optimization of cultivation conditions. I was observed that the greatest enzyme's activity was obtained with 24 hours of fermentation, in *R. oryzae* in a culture medium that contained wheat bran as the substrate, at 35°C, using salt solution made with NH_4NO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% as nitrogen source. pH alterations between 4.0 and 6.0 didn't change significantly the enzyme's activity. The optimum conditions of performance of the enzyme were temperature of 75°C and pH 4.5. The enzyme kept stable in the lack of substrate for 25 minutes in 75°C

Keywords: alpha amylase, enzyme, *Chrysosporium zonatum*, *Malbranchea pulchella*, *Rhizopus oryzae*.

1 INTRODUÇÃO

As amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas, sendo descritas a partir de 1811 em extrato de trigo e (1833) no malte. Foi identificada em saliva (1831) no sangue (1846) e em 1881 pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, et al. 1982). Constitui um grupo de enzimas de ampla aplicação nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica, produção de detergentes, destacando-se atualmente no setor sucroenergético.

A α -amilase é uma exoenzima que atua hidrolisando as ligações α -1,4 do amido liberando glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e α -dextrina. Diversos micro-organismos têm sido estudados para avaliação do potencial de síntese de α -amilase. Entretanto, apenas algumas cepas de fungos e de bactérias atendem aos critérios para produção comercial. (SOUSA & MAGALHÃES, 2010).

Atualmente, a busca por um produto de qualidade que atenda aos mercados nacionais e internacionais, tem levado o setor sucroalcooleiro a utilizar de várias enzimas durante seu processo industrial. A α -amilase tem importante papel no processo produtivo do açúcar. Sua aplicação possibilita a obtenção de um produto de qualidade, com reduzidos teores de amido.

Atualmente a colheita mecanizada tem predominado nas unidades industriais de produção de açúcar e álcool. Verifica-se um aumento significativo de impurezas vegetais quando se utiliza cana no processo industrial oriunda deste sistema de colheita, comprometendo a qualidade da matéria-prima. Segundo Moraes (1992) apud Neves et al. (2006), a cana colhida mecanicamente apresenta índices de impurezas 2,7 vezes maiores em relação a cana cortada manualmente.

As impurezas vegetais presentes no caldo afetam diretamente o processamento industrial, através do comprometimento da capacidade da fábrica de 3 a 15 %; com perda de extração de 1 a 4 %; aumento da quantidade de bagaço produzido, além da incorporação de componentes indesejáveis, tais como, polissacarídeos, amido e ácidos, comprometendo os padrões de qualidade do açúcar (MUTTON, 2008).

Considerando-se que no Brasil existe um movimento do setor sucroenergético para tornar a colheita da cana-de-açúcar mecanizada uma realidade nos próximos anos, a busca por enzimas que apresentem atividade amilolítica, de origem microbiana, que possam ser utilizadas na indústria sucroalcooleira abrirá a

possibilidade de tornar o processo menos oneroso. Atualmente a α - amilase usada é de origem bacteriana, representando alto custo durante o processo industrial. Neste sentido o isolamento de cepas fúngicas com potencial amilolítico, com habilidade para utilizar resíduos agroindustriais como substrato poderia baratear o processo de produção do açúcar.

Recentemente, vários subprodutos agroindustriais têm sido utilizados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representarem fontes alternativas de baixo valor comercial. Assim, sua utilização pode contribuir em muito para a redução dos custos operacionais na produção enzimática (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Para a produção de amilases microbianas, tem sido utilizados sistemas de Fermentação Submersa (FSM). Atualmente o sistema de Fermentação em Estado Sólido (FES) vem despontando como uma tecnologia promissora. Vários subprodutos agroindustriais são utilizados como substratos para a produção de enzimas. Inúmeros fatores favorecem o emprego destes tais como: disponibilidade, fonte alternativa com baixo valor comercial, características físicas e químicas que favorecem o crescimento de inúmeros micro-organismos, dentre outros. Estes contribuem para a redução do custo operacional da produção enzimática (COUTO & SANROMÁN 2005). De acordo com PANDEY et al. (2000), deve se considerar ainda neste tipo de processo o tempo de fermentação, além de fatores físico-químicos como: umidade, pH e temperatura, para obtenção de máxima de metabólicos.

Pelo exposto, conclui-se que o processo de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais pode ser um processo vantajoso, pela conversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado, como as enzimas.

Neste contexto o presente trabalho objetivou estudar a produção de amilases por fungos filamentosos, utilizando subprodutos agroindustriais como substratos, em diferentes condições fermentativas, visando à obtenção de extratos enzimáticos com atividade amilolítica. Para a cepa que apresentou maior atividade enzimática, foram avaliados: melhor substrato, tempo de cultivo, teores de umidade, fontes suplementares de nitrogênio e temperatura de incubação do fungo, visando otimizar as condições de cultivo. Posteriormente foi realizada a caracterização do extrato enzimático bruto quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade, e estabilidade da enzima frente as variações de pH e temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Acúmulo de amido pela cana-de-açúcar

Uma das preocupações da indústria sucroalcooleira é a presença de polissacarídeos no caldo de cana. O amido é uma das biomoléculas que mais causam danos por desencadear uma série de problemas operacionais, acarretando perdas na fábrica de açúcar, além de acarretar queda do rendimento da fermentação alcoólica (GODOY, 2004).

A composição do amido natural da cana-de-açúcar é cerca de 20% amilose e 80% amilopectina. Se o teor de amido no caldo de cana estiver por volta de 400 ppm na matéria seca (Brix), o conteúdo provável de amido em açúcar bruto será de 150 ppm ou superior (NOVOZYMES, 2011).

A presença deste polissacarídeo no caldo de cana é reflexo do metabolismo da planta. A cana-de-açúcar é uma gramínea de clima tropical que tem por característica acumular sacarose em seu colmo. Seu processo de fotossíntese culmina com o acúmulo de carboidratos fotossintetizados, principalmente sacarose, nos colmos. A capacidade de acumular compostos de carbono nas folhas tem característica genética, sendo um importante parâmetro discriminatório do potencial produtivo dos diferentes cultivares. Durante o processo de fotossíntese, parte da sacarose produzida a partir de trioses-fosfatos são transportadas do cloroplasto para o citossol é exportada nas folhas, principalmente nos vacúolos e parte do carbono assimilado na fotossíntese é transformado em amido, no cloroplasto, servindo como material de estocagem. (RODRIGUES, 1995).

Por ser uma planta com metabolismo C4 ou ciclo Hatch-Slack a cana-de-açúcar possui uma adaptação anatômica com células arranjas em forma de coroa (Estrutura Kranz) que favorece o seu metabolismo. Ocorre nestas plantas uma separação espacial entre a fixação do CO₂ e a redução do composto intermediário de três carbonos o que confere vantagens fisiológicas a estas. Apresentam melhor eficiência para fixação do CO₂ e conseqüentemente alta taxa fotossintética sendo mais eficiente em crescimento, uma vez que aproveitarão melhor o CO₂. (CASTRO & KLUGE, 2001)

A presença e a distribuição de amido em cana-de-açúcar tem relação com o cultivar. Porém existe uma forte relação entre a deficiência de fósforo e o aumento

na concentração de amido na cana-de-açúcar, cuja deficiência deste nutriente leva a planta a perder a capacidade de conversão da glicose e frutose em sacarose que é dependente de fósforo, refletindo diretamente no aumento de amido no caldo (STUPIELLO, 2001).

A síntese de sacarose e de amido são dois processos fisiológicos das plantas que ocorrem no citoplasma e no citosol e competem entre si sendo o P_i o agente regulador do processo, assim se a concentração de P_i citosólica é alta a triose fosfato do cloroplasto é exportada para o citosol através de um transportador de P_i em troca de fósforo P_i e a sacarose é sintetizada. Se a concentração citosólica de P_i é baixa, a triose fosfato é retida dentro do cloroplasto ocorrendo a síntese do amido. (Figura 01) (TAIZ et al. 2004).

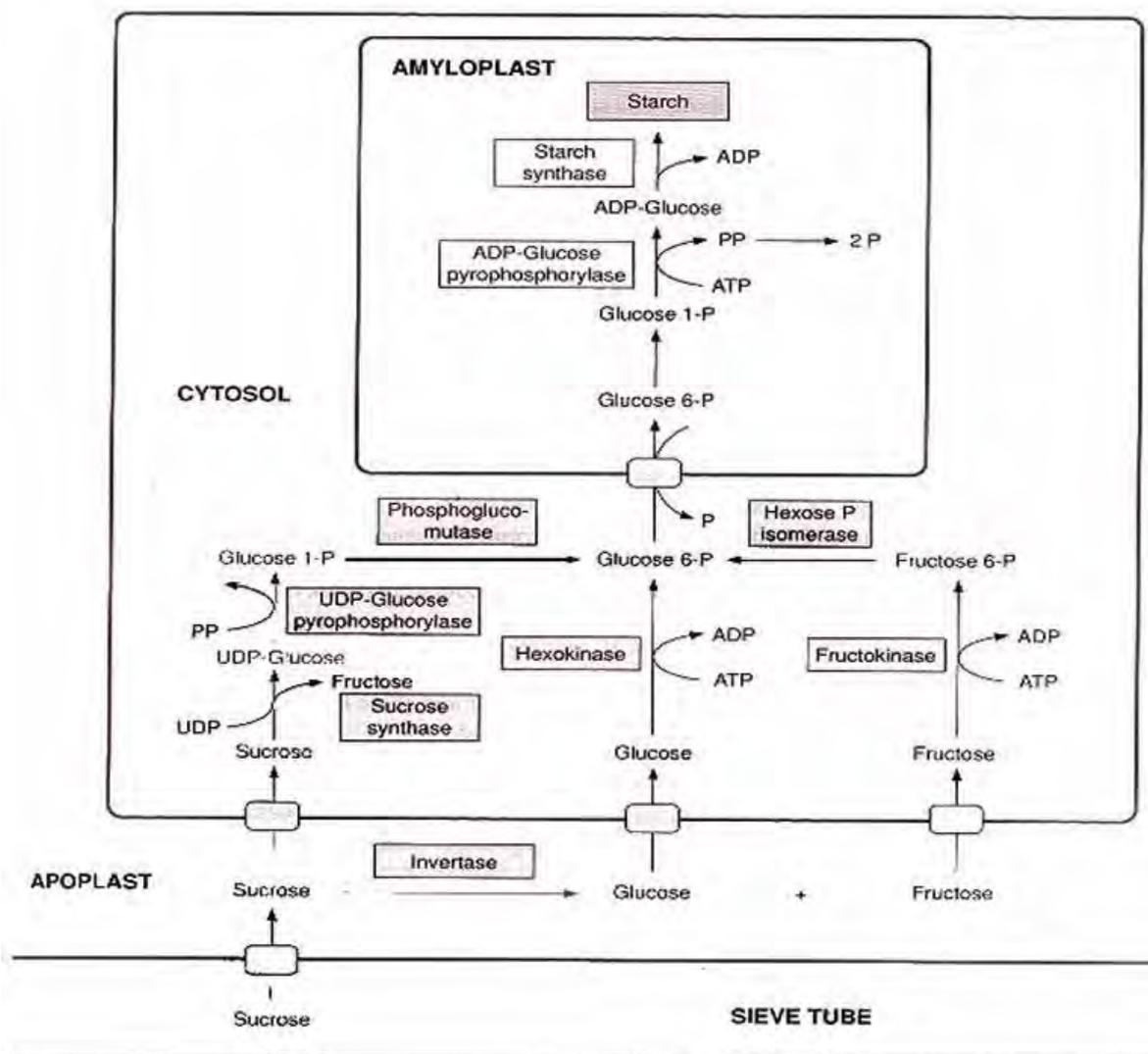


Figura 01. Esquema da síntese de sacarose nas plantas.
Fonte: STUPIELLO (2001).

Várias condições de estresse também refletem diretamente no aumento dos teores de amido pela cana-de-açúcar, por exemplo, irrigação, teor de potássio, geadas, tombamento da planta, estação do ano, variedade, ocorrência de doenças, maturidade da cultura entre outros fatores afetam a concentração de amido. Podendo o amido ser encontrado em todos os produtos da cana, causando perda de qualidade do açúcar bruto e refinado (IMRIE&TILBURY, 1972).

O amido está presente em todas as partes da planta (Tabela 01), sendo que os maiores valores deste polissacarídeo são observados durante o desenvolvimento vegetativo da planta e tende a diminuir com o processo de maturação onde não sofrem mais alteração. Quando colhida mecanicamente qualquer, que seja o sistema de limpeza empregado, estes não possuem grande eficiência e removem apenas 50% da palha da cana aumentando as concentrações de amido no caldo (STUPIELLO, 2011). Segundo PUGLIA (2006) a utilização de matéria-prima com elevado teor de ponta aumenta o teor de amido no caldo consideravelmente.

Tabela 01. Distribuição do amido em variedades de cana-de-açúcar (ppm)

Partes	Variedades				
	NCo310	F-134	F-108	PT51-11	H44-3098
Ponta	754	265	268	-	533
Colmo	175	71	74	69	86
Nós	388	158	117	153	334
Pé	176	34	97	72	148

Fonte: STUPIELLO, 2001.

Diversos são os efeitos da presença de polissacarídeos no caldo para produção de açúcar, que vão desde efeitos melassigênico (viscosidade), dificuldades na formação de cristais (modificações e oclusões), dificuldade de filtrabilidade durante a obtenção de açúcar, aumento da viscosidade dos méis, até inúmeros problemas operacionais (AMORIM & OLIVEIRA, 1982; MAGRO, 2005).

Enzimas que degradam o amido são abundantemente encontradas na natureza em vegetais, animais e micro-organismos. A sacarificação das matérias amiláceas é necessária, para que o amido seja transformado em açúcares fermentescíveis, já que os agentes da fermentação alcoólica não possuem enzimas amilolíticas. Esta sacarificação pode ser realizada por via química, biológica ou pela

ação direta de enzimas. Uma enzima obtida a partir de fungos filamentosos em substratos agroindustriais poderia ser economicamente viável (LIMA et al. 2001).

2.2 Utilização industrial das enzimas

Enzimas representam um grupo específico de “proteínas” que são sintetizadas por células para funcionarem como catalisadores de inúmeras reações químicas responsáveis pela manutenção do metabolismo celular. Apresentam especificidade para um determinado substrato ou podem funcionar com agentes regulatórios de uma determinada via metabólica. Esta característica é que as distingue dos catalisadores químicos (MACEDO, 2005).

Inúmeros processos industriais tais como, fabricação de alimentos, produtos de limpeza, processamento do papel, preparação têxtil, áreas médicas no setor sucroenergético, entre outros utilizam de processos enzimáticos. Nos últimos anos a solubilização e a sacarificação do amido por meio de enzimas tem movimentado um mercado em torno de US\$100 milhões, sendo que as mais utilizadas na área industrial são as α -amilase, β -amilase, glicoamilase, glucanase, pulunase e isoamilase (AQUARONE et al. 2001). Caracterizam-se pela alta especificidade e eficiência e se fazem necessárias em pequenas quantidades. Muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia (MADIGAN et al. 2004; PANDEY et al. 2000).

No setor sucroalcooleiro a aplicação de enzimas tem crescido nos últimos anos uma vez que a não remoção do amido e de outros polissacarídeos do caldo de cana comprometem a qualidade do produto final. Até o momento estes componentes só podem ser removidos com aplicação de enzimas.

Estudos da utilização de enzimas no setor sucroalcooleiro datam da década de 20, porém nenhum processo havia sido utilizado industrialmente devido ao alto custo das mesmas. Com o aumento da disponibilidade das enzimas no mercado, os processos enzimáticos passaram a ser rotina, não apenas para aumentar a recuperação de sacarose na fábrica, como também, com o objetivo de reduzir os efeitos negativos de alguns componentes como o amido e a dextrana. (STUPIELLO, 2010).

A utilização de α -amilase no processo industrial do açúcar possibilita melhor otimização do processo industrial, obtendo-se um produto com alta qualidade, dentro

dos padrões de qualidade dos principais mercados nacionais e internacionais. Em vários países não é aceitável o fornecimento de açúcar com altos teores de amido.

A concentração de amido no açúcar é um importante parâmetro de qualidade do produto. Açúcares com altos teores deste componente acarretam inúmeros problemas para as indústrias de alimentos tanto operacionais como de perda da qualidade sensorial destes produtos além da formação de flocos em bebidas e refrigerantes (STUPIELLO, 2010; ROMERO et al. 2010).

De acordo com STUPIELLO (2010) o teor de amido no caldo varia de 130 a 300 ppm e em relação ao Brix podendo este valor ser até 6 vezes maior. A não utilização da α -amilase no processo de produção açúcar pode comprometer e promover alterações significativas na eficiência dos processos e qualidade final do produto. Porém o uso da α -amilase resulta diretamente na elevação dos custos de produção, encarecendo o produto final. Uma enzima extraída por um fungo através da utilização de subprodutos agroindustriais poderia reduzir os custos do processo.

Vários autores citam a presença de enzimas amilolíticas endógenas no caldo de cana-de-açúcar. A proporção entre as duas enzimas (amilose/amilopectina) que compõem o amido da cana ainda é pouco conhecida, assim como, a proporção destes componentes no amido presente no açúcar, ou seja, o produto final. Faltam estudos para determinar e avaliar o comprometimento destes dois componentes no processo industrial, além de uma metodologia analítica adequada para caracterizar o problema. (OLIVEIRA et al. 2007)

Inúmeros estudos foram realizados a partir da descoberta destas enzimas amilolíticas endógenas presentes no caldo de cana. De acordo com STUPIELLO (2010) a enzima amilolítica "natural" do caldo quando aplicada a pH de 5,5 a 5,7 por 10 a 30 minutos em temperatura de $\pm 70^{\circ}\text{C}$, próxima a de gelificação do amido possibilitou a decomposição da molécula de amido na ordem de 80 a 90 %. O mesmo autor salienta que vários estudos envolvendo o uso de enzimas endógenas foram realizados em diferentes condições de pH, temperaturas e tempos de retenção, sendo que dois fatores dificultam o controle de processos envolvendo este tipo de enzimas. São eles: perda de sacarose por inversão devido a retenção do caldo em temperaturas elevadas e outra desvantagem observada ao aproveitamento destas enzimas naturais está na quantidade de enzima extraída durante os processos de moagem e processamento. Estes fatores dificultam a utilização de enzimas naturais no processo industrial açucareiro.

A utilização de enzimas no setor sucroalcooleiro, em especial na produção de açúcar, vem de encontro aos anseios do setor, que tem buscado nos últimos anos a modernização e o desenvolvimento de produtos cada vez mais diferenciados e de qualidade. A utilização destas novas metodologias no processo, visa principalmente agregar valor ao produto final, promovendo a diferenciação em num mercado que tem se tornado cada vez mais competitivo. Vários países rejeitam açúcares com altos teores de amido. A α -amilase bacteriana termoestável de *Bacillus licheniformis* tem sido muito empregada e com grande eficiência para hidrólise do amido da cana, porém esta enzima pode ser encontrada no açúcar final bruto (FIGUEIRA, 2009).

Inúmeros estudos envolvendo a aplicação de α -amilases termoestáveis comprovam a remoção de amido do caldo reduzindo a viscosidade do caldo e melhorando a qualidade do produto final. STUPIELLO (2010) cita que a aplicação de α -amilase remove de 90, 94 e 87% do amido quando se aquece o caldo misto com pH de 6,5 por 5 minutos quando e se efetua o tratamento com 10 ppm de enzima por 15 min a 60°C, 70°C e 80°C, respectivamente. O mesmo autor recomenda adição de α -amilase no terceiro corpo de um evaporador de quádruplo, devido ao fato de que a ação da α -amilase ser maior em altas temperaturas (75-85°C). Porém em baixo Brix e o amido estando em solução, recentemente tem se observado que amilases termotolerantes, quando aplicadas em outros pontos do processo, conduz a resultados melhores. Um exemplo é a saída do balão de flash.

Nos últimos 25 anos, houve um aumento no consumo de açúcar, devido a melhoria das condições financeira que elevou a demanda por alimentos e bebidas adoçados, em especial os refrigerantes. Tais alimentos para serem fabricados requerem açúcar de alta qualidade, fazendo com que a procura por este produto aumentasse. (CLARKER, 1997)

A qualidade de açúcares brutos especiais Very Very High Polarization (VVHP) e dos açúcares brancos utilizam o amido como parâmetro de qualidade. Os valores máximos aceitáveis para o açúcar branco é de 180mg/Kg, mas estes valores podem ser diferentes de acordo com a exigência dos clientes. Para atender estas especificações do mercado, em muitos casos a única solução para redução do amido é a utilização de amilases no processo industrial (STUPIELLO, 2010).

ROMERO et al. (2010) analisando 77 amostras de açúcar de diferentes safras provenientes das regiões Nordeste e Sudeste, as maiores produtoras de

açúcar do Brasil nas safras de 2006/2007, observaram que em ambas as regiões 40% das amostras de açúcar apresentavam valores de amido acima do limite especificado pela COPERSUCAR. Nas amostras da região Sudeste aproximadamente 70% da produção nacional, nas safras de 1997/1998, 1998/1999, 1999/2000 e 2000/2001 a concentração média de amido foi de 213,3 mg/Kg sendo o valor mínimo 79,1 e o máximo 602,7 mg/Kg, valores superiores aos adotados pela COPERSUCAR para amido, que não devem ser superiores a 180 mg/Kg.

Alguns tipos de açúcares ofertados para o mercado interno e exportação procuram seguir os rigorosos itens de especificação do produto (Tabela. 02) de acordo com as Boas práticas de fabricação (BPF), Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), etc.

Tabela 02. Tipos de açúcares e/ou nomes comerciais e suas especificações ofertados para o mercado externo e interno.

Características	Unidades		Tipos de açúcar					Exportação
			Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2G	Tipo 3	Tipo 4	VVHP
Polarização	°Z	Mín.	99,8	99,7	99,7	99,7	99,5	99,6
Cor ICUMSA	UI	Máx.	100	150	150	200	400	450
Sulfito	mg.Kg ⁻¹	Máx.	15	10	15	15	20	<1
Dextrana	mg.Kg ⁻¹	Máx.	-	100	100	150	-	100
Amido	mg.Kg ⁻¹	Máx.	-	180	180	180	-	100
Insolúveis (comparativo)	1 a 10	Máx.	5	5	4	9	-	-
Part. Magnet.	mg.Kg ⁻¹	Máx.	2	1	1	5	-	-
Granulometria	AM em mm							<0,6
	CV em %							<35

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. 2007.

A utilização de amilases na indústria a base de amido tem sido abundante há décadas e um grande número de fontes microbianas tem sido estudado para produção mais eficiente desta enzima, mas apenas algumas cepas selecionadas de fungos e bactérias satisfazem os critérios para sua produção comercial. A busca por novos micro-organismos que possam produzir esta enzima é um processo contínuo. Recentemente, vários autores têm apresentado bons resultados no desenvolvimento

de técnicas de purificação, que permitem a aplicação industrial das mesmas nas mais variadas áreas inclusive nos setores farmacêuticos e clínicos que requerem amilases de alta pureza (SOUSA & MAGALHÃES, 2010).

O isolamento de micro-organismos produtores de α -amilase, especialmente termoestáveis, abre às perspectivas de se aumentar a disponibilidade comercial de enzimas a baixo custo, o que poderá aumentar a margem de lucros para a indústria sucroalcooleira.

2.3 Amilases

As amilases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais. São responsáveis pela hidrólise da molécula de amido em polímeros de unidades de glicose, sendo amplamente distribuídas na natureza. São aplicadas na produção de maltodextrina, amidos modificados, e xaropes de glicose e frutose. São também aplicadas em um grande número de processos industriais, tais como nas indústrias têxtil, na fabricação de detergentes para lavadeira e louças, indústria farmacêutica e alimentícias e na fabricação de etanol e açúcar. (SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

Podem ser divididas em duas categorias: exoamilases e endoamilases. As do primeiro tipo atuam sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose (ex. as glicoamilase e α -glicosidase). Já as do segundo tipo são capazes de quebrar as ligações glicosídica α -1,4 e α -1,6 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina (ex. α -amilase (E.C.3.2.2.1.1)) (GUPTA et al. 2003).

Vários métodos estão disponíveis para a determinação da atividade das α -amilase, geralmente utiliza-se amido ou amido modificado como substrato. A reação é monitorada por um aumento nos níveis de açúcares redutores ou diminuição da cor do iodo do substrato tratado (MACEDO et al. 2005).

A α -amilase é uma enzima induzível, a indução pode ocorrer tanto pela presença de amido como de seu produto hidrolítico, a maltose. Há relatos na literatura que em algumas cepas de fungos outras fontes de carbono como lactose, trealose, α -metil-D-Glicosideo também agem como indutores. Estas enzimas também estão sujeitas a repressão catabólica pela glicose e outros açúcares, porém há controversas quanto

ao papel repressor da glicose. Xilose e frutose são citadas na literatura como altamente repressivas (GUPTA, et al. 2003).

A classificação das α -amilases é baseando na homologia da sequência de aminoácidos. A família da α -amilase ou família 13 de glicosil hidrolases é classificada de acordo com HERRISSAT (1996) apud SAID & PIETRO, (2005) (Tabela 03).

Tabela 03. Características das enzimas que pertencem a família das α -amilases.

Tipo	Características
A	Hidrolisam ligações α -glicosídicas produzindo mono ou oligossacarídeos α -anoméricos (hidrólise) formando ligações glicosídicas α -1,4 ou 1,6 (transglicosilação), ou uma combinação de ambas as atividades.
B	Os resíduos estão contidos na estrutura em barril $(\beta/\alpha)_8$ ou barril TIM, primeiramente descrito para triose isomerase (TIM)
C	Todas têm quatro regiões altamente conservadas em sua sequência primária contendo sítio catalítico e os mais importantes sítios de ligação ao substrato.
D	Todas possuem resíduos Asp, Glu e Asp no sítio catalítico correspondendo a Asp-206, Glu-230 e Asp-270 da taka-amilase A.

As enzimas mais utilizadas mundialmente são as: α -amilases, glicoamilase, glicoesomerase e várias proteases. A (Tabela 04), trás dados do mercado mundial de enzimas.

Tabela 04. Mercado mundial de vendas de enzima.

Enzima	Vendas em %
Protease de <i>Bacillus</i>	30-35
Amilase de <i>Bacillus</i>	10-12
Renina bovina	10-12
Glicoamilase	8-10
Glicose-isomerase	5-7
Renina microbiana	2-4
Pectinase	4-5
Pancreatina	2-4
Papaína, bromelina	4-6
Lipase	2-3
Outras (β -amilase, amilase fúngica, glicose-oxidase, invertase, lactase, lisozima, penicilina acilase, pululanase).	5-10

Fonte: LIMA et al. (2001).

2.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES é o processo de cultivo de micro-organismos sobre partículas sólidas úmidas que funcionam como suporte físico e fonte de nutrientes na ausência de água livre aparente, os espaços vazios são preenchidos por ar. As maiores dos substratos empregados em FES são resíduos agroindustriais tais como, farelo de soja, farelo de arroz, bagaço de mandioca, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros (PANDEY, 1992). Estes resíduos normalmente possuem diversas substâncias de alto valor nutritivo, fundamentais para o cultivo de micro-organismos, especialmente fungos filamentosos, que apresentam habilidade de transformar estes materiais em outras biomoléculas ou matérias-primas que poderão ser empregadas em processos secundários (GARBOSA & TRINDADE, 2008).

A utilização de FES para a produção de enzimas e outros produtos tem sido amplamente discutida na literatura por apresentar inúmeras vantagens tanto econômicas quanto industriais pode-se citar a solubilidade baixa do substrato, o aproveitamento de subprodutos agroindustriais e a valorização deste subproduto uma vez que os produtos metabólicos obtidos são de grande interesse comercial (GUANDALINI, 2007). BECERA & GONZÁLES (1996) cita também com vantagens a alta concentração dos produtos, baixas quantidade de resíduo aquoso gerado, meio de cultivo simples, menor exigência de água e facilidade no controle de contaminações microbianas.

Uma análise da literatura mostra que a FES oferece várias outras vantagens, entre elas, alta produtividade, boa aeração, baixo custo, tecnologia relativamente simples, escassos problemas operacionais, dentre outros (COUTO & SANRAMÁN, 2005)

Todos esses fatores demonstram a eficiência da FES como uma alternativa muito atraente para obtenção de vários metabólicos de interesse industrial, uma vez que há um grande interesse no setor industrial em especial o de alimentos quanto a utilização de “aditivos” de origem microbiana, sendo estes mais desejáveis que os produzidos por processos químicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento das linhagens

As cepas de fungo foram isoladas de silagem de milho, a coleta do material foi realizada em uma área localizada no município de Frutal/MG, com o uso de equipamentos de proteção individual.

Aproximadamente 1,0 g do material foi coletado e posteriormente transferido para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio nutriente adaptado de Jensen et al. (2002), composto por (p/v): 0,5% glicerol, 2% amido, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,5% CaCO₃, 0,1% K₂SO₄, 0,02% MgCl₂, 0,3% K₂HPO₄ e 0,5% de solução de elementos traços (2,2% de Zn SO₄.7H₂O; 1,1% de H₃BO₃; 0,5% de MnCl₂.4H₂O; 0,16% de CoCl₂.5H₂O; 0,16% e de CuSO₄.5H₂O). Foi adicionado ainda ao meio nutriente os antibióticos ampicilina 30µg/mL e cloranfenicol 25µg/mL.

No laboratório, após 24 horas de incubação a 45°C, as amostras foram transferidas, por meio de estrias, para placas de Petri contendo meio Sabouraud enriquecido com 1% de amido, as quais foram novamente incubadas a 45°C.

Após o surgimento das colônias dos fungos, as mesmas foram separadas com base no aspecto do micélio, cor dos esporos e em outras características do anverso e reverso das colônias. Estas colônias foram reinoculadas, através de estrias, até a obtenção de culturas puras.

3.2 Identificação das cepas fúngicas

Para os testes preliminares de atividade de α -amilase foram utilizadas três linhagens fúngicas isoladas conforme metodologia descrita no item 3.1, que apresentaram crescimento a 45°C. A identificação das cepas foi realizada através de microcultivo, de acordo com as características macro e microscópicas das colônias, utilizando de chaves de identificação. Posteriormente para confirmação da classificação placas de Petri contendo os fungos foram enviadas para Universidade Federal do Recife.

Obtendo-se a seguinte identificação, Cultura 1. *Rhizopus oryzae*, para a Cultura 2. *Malbranchea pulchella* e Cultura 3. *Chrysosporium zonatum*.

3.3 Conservação e manutenção das cepas

As cepas de fungos foram mantidas conservadas em ágar Sabouraud com 1% de amido, sendo repicados mensalmente. O repique foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio de cultura inclinado, os fungos foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina e incubados em estufa, por 120 horas e posteriormente mantidos sobre baixa refrigeração.

3.4 Meios de cultivo para inóculo e substratos para a fermentação e obtenção do extrato enzimático

Os fungos usados para inóculo foram cultivados em Erlenmeyers de 500 mL, contendo meio Sabouraud com amido a 1%. Sendo que a cultura Cultura 1. *Rhizopus oryzae* foi incubada a 35°C e para a Cultura 2. *Malbranchea pulchella* e Cultura 3. *Chrysosporium zonatum* a 45°C, até apresentarem bom crescimento.

Em cada frasco contendo o fungo, foram adicionados 100 mL de solução salina esterilizada, composta por sulfato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e nitrato de amônia (NH_4NO_3), todas a 1%. A superfície do meio foi suavemente raspada com alça de inoculação esterilizada, obtendo-se assim uma suspensão micelial, que foi utilizada para cultivo dos fungos nos substratos agroindustriais.

Utilizou-se como substratos para o cultivo das cepas os substratos agroindustriais de quirera de arroz e milho e farelo de trigo, por apresentarem grande potencial de utilização para produção de amilases, elevada disponibilidade e baixo custo (Figura 02).



Figura 02. Substratos agroindústrias utilizados no processo de Fermentação em Estado Sólido (FES).

Os resíduos de arroz e de milho constituíram-se em grãos quebrados em pedaços muito pequenos, denominados de “quireras”. O farelo de trigo foi obtido a partir do resíduo do beneficiamento do grão de trigo, correspondendo a película externa. Todos os substratos foram peneirados com granulometria de 9 mesh.

De acordo com GENEROSO et al. (2008) a quirera de arroz apresenta a basicamente a seguinte composição (%): 74,45 de amido; 86,96 de matéria seca; 4,40 de proteína bruta; 1,18 de extrato etéreo; 0,42 de fibra bruta; 5,10 de fibra detergente neutra; 8,25 de fibra detergente ácido; 0,80 de matéria mineral; 0,06 de cálcio e 0,17 de fósforo. Segundo o mesmo autor, a constituição do farelo de trigo (%): 23,0 de amido; 87,05 de matéria seca; 15,12 de proteína bruta; 3,54 de extrato etéreo; 80,90 de fibra bruta, 38,38 de fibra detergente neutra; 12,80 de fibra detergente ácido; 4,35 de matéria mineral; 0,12 de cálcio e 0,90 de fósforo.

HERNANDEZ et al. (2002), determinaram para a quirera de milho a composição aproximada (%): 62,25 de amido; 87,61 de matéria seca; 9,81 de proteína bruta; 3,96 de extrato etéreo; 1,16 de fibra bruta; 20,17 de fibra detergente neutra; 4,46 de fibra detergente ácido; 1,06 de matéria mineral; 0,03 de cálcio e 0,23 de fósforo.

Os meios de cultura (resíduos agroindustriais) foram esterilizados a (120°C/40 min) em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5g dos subprodutos mais o suporte de bagaço de cana-de-açúcar a 10%.

3.5 Determinação do pH inicial do substrato

O pH inicial do substrato foi determinado, por método potenciométrico, a partir de suspensão 1:10 do substrato utilizado em água destilada, o material foi homogeneizado e determinado o pH direto do meio. A correção do pH inicial do substrato para otimização das condições fermentativas para a produção enzimática foi realizada utilizando de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH).

3.6 Preparo do suporte

O suporte tem por finalidade melhorar a porosidade e absorção de nutrientes pelo micro-organismo, além de facilitar a oxigenação e o transporte de nutrientes (SPIER, 2005).

O suporte utilizado bagaço de cana-de-açúcar, foi cedido por uma unidade de produção da região de Frutal, MG, que utiliza para extração do caldo da cana o sistema de moendas. O bagaço foi submetido a sucessivas lavagens com água corrente para retirada de impurezas e resíduos de açúcares. Em seguida este bagaço foi seco em estufa a 65°C por 24 horas. Posteriormente foi submetido a conjunto de peneiras com granulometria de 9 mesh, sendo armazenado sob refrigeração em sacos plásticos.

O bagaço de cana-de-açúcar (Figura 03) é um resíduo do processamento industrial da cana-de-açúcar. Sendo composto por celulose, hemicelulose e lignina. Esta matéria-prima apresenta uma série de vantagens, tais como, disponibilidade em grandes quantidades e estar pronta para uso no local (FUGITA, 2010).



Figura 03. Bagaço de cana após processamento para utilização como suporte.

Os componentes do bagaço de cana-de-açúcar in natura são apresentados na (Tabela 05).

Tabela 05. Componentes do bagaço de cana-de-açúcar in natura.

Componentes	%
Celobiose	3,34
Glicose	46,20
Hidroximetilfurfural	0,30
Acido fórmico	0,56
Xilose	24,21
Arabiose	1,70
Furfural	1,25
Ácido glucurônico	1,09
Ácidos acético	2,64
Lignina solúvel	2,61
Lignina insolúvel	23,66
Cinzas	1,61

Fonte: Adaptado de CANILHA (2006).

3.7 Condições fermentativas iniciais para a produção enzimática

Inicialmente os fungos foram cultivados durante 168 horas, em cada substrato citado. Os meios de cultivo para FES foram inoculados com a suspensão micelial (Item 3.4), de modo que a umidade ficasse em torno de 70%, e incubados em estufa a Cultura 1. *Rhizopus oryzae* a 35°C a Cultura 2. *Malbranchea pulchella* e Cultura 3. *Chrysosporium zonatum* a 45°C com taxa de inoculação de esporos de 10⁵ U/mL, sem correção inicial no pH do substrato. A cada 24 horas foram retiradas amostras, das quais foi determinada a atividade enzimática. Posteriormente, foram alteradas estas condições fermentativas, para avaliar as alterações sobre a produção enzimática.

3.8 Obtenção do extrato enzimático

Para a obtenção do extrato enzimático, 40 mL de água destilada foram adicionados em cada Erlenmeyer. Estes foram agitados a 100 rpm em “shaker” durante 30 minutos e posteriormente o seu conteúdo foi filtrado e centrifugado a

1800 g por 20 minutos. O sobrenadante foi o extrato enzimático bruto a ser analisado.

3.9 Determinação da atividade de α -amilase (reação dextrinizante)

A atividade de α -amilase foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação entre o amido e o iodo de uma solução de amido tratada com uma solução enzimática bruta seguindo o método descrito por FUWA (1954), com modificações.

A reação foi constituída de 0,9 mL de solução de amido solúvel a 0,3% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL da solução enzimática bruta. Após incubação a 60°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M, sendo em seguida adicionados 0,5 mL de reativo de Iodo (KI 0,30% + I₂ 0,03%).

O controle foi preparado conforme o processo descrito, porém em duas etapas: o controle do substrato (amido) foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada e o controle da enzima, substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão acetato. Em espectrofotômetro, a absorbância foi determinada a 600 nm contra um branco constituído de água destilada.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições de ensaio, calculada segundo a equação:

$$U/mL = [(C-Abs) \div C] \times Qs \div 10 \times fd \div Ve$$

onde:

U = unidade de enzima;

C = controle (soma da absorbância do controle do amido e do controle da enzima);

Abs = absorbância da amostra;

Qs = quantidade de substrato, em mg, utilizada na reação;

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

fd = fator de diluição;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

3.10 Avaliação de diferentes condições fermentativas para a produção enzimática

Diferentes parâmetros fermentativos foram analisados, visando obter condições em que haja boa produção de amilases. Na cepa de fungo que apresentou maior atividade amilolítica, foi analisada a influência dos seguintes fatores, sobre a produção enzimática: melhor substrato, tempo de cultivo, umidade inicial do substrato, fonte suplementar de nitrogênio, temperatura e pH inicial do substrato.

3.10.1 Fontes de nitrogênio suplementares ao meio de fermentação

Foram avaliadas duas fontes de nitrogênio, sendo uma orgânica e uma inorgânica. (p/v):

-Solução inorgânica: composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, escolhida por ser comumente relatada na literatura como fonte suplementar de nitrogênio e por favorecer e melhorar a produção de α -amilase em fungos filamentosos. A solução foi esterilizada a 121°C por 30 min.

-Solução orgânica: composta por uma suspensão 0,1% de farinha de soja em água. Escolhida por ser comumente citada na literatura como sendo uma fonte orgânica de fácil assimilação de nitrogênio por vários micro-organismos e por apresentar um baixo custo. A solução foi esterilizada a 121°C por 30 min. De acordo com (ZAMBOM et al. 2001) a composição do farelo de soja é: 88,97 de matéria seca sendo: 51,41 de proteína bruta; 3,45 de extrato etéreo; 6,18 de fibra bruta; 12,22 de fibra detergente neutra; 10,13 de fibra detergente ácido; 6,39 de matéria mineral.

-Solução controle: água destilada.

3.10.2 Determinação da melhor Umidade

Foram avaliados três teores de umidade (70%, 60% e 50%), os quais são frequentemente usados para crescimento fúngico. A atividade enzimática foi avaliada a cada 24 h de cultivo.

3.10.3 Temperatura de incubação e pH inicial do substrato

Foram avaliadas as temperaturas de incubação de 30°C, 35°C, 40°C e 45°C e os pH de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0, apenas para a cepa que apresentou melhor atividade enzimática (*R. oryzae* cultivado em substrato de farelo de trigo por 24 h).

3.11 Caracterização dos extratos enzimáticos

O extratos enzimáticos foram caracterizados em relação ao pH e temperatura ótimos para atuação amilolítica, visando otimizar as condições físico-químicas de maior atuação na quebra do amido. Foi avaliado também a estabilidade das enzimas em relação ao pH e à temperatura.

3.11.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática

O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado na faixa de pH de 3,0 a 10,5, incubando a solução enzimática nos seguintes tampões acetato (pH 3,0 -5,5), citrato/NaOH (pH 5,5 – 7,0), Tris/HCl (pH 7,0 – 8,5) e glicina/NaOH (8,5 -10,5). A atividade enzimática foi dosada a 60°C, através do método dextrinizante (Item 3.9).

3.11.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática

Para determinação da temperatura ótima de atividade enzimática, a solução enzimática foi incubada no pH determinado como ótimo em temperaturas de 30°C a 90°C (com variação de 5°C). A atividade enzimática foi dosada através do método dextrinizante (Item 3.9).

3.11.3 Determinação da estabilidade térmica da enzima a 75°C.

A estabilidade da enzima na temperatura ótima de atuação (75°C) foi verificada incubando a solução enzimática bruta em tubos de rosca na temperatura determinada como ótima para atividade da enzima, até que a mesma não

apresentasse mais atividade. As amostras foram retiradas a cada 2 minutos e atividade residual foi medida pelo método dextrinizante (Item 3.9).

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos pelas suas médias, sendo estas submetidas para os ajustes dos modelos dos gráficos utilizando o programa estatístico Microcal Origin 6.1. Estes foram submetidos à análise de variância, avaliando-se as diferenças entre as médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do substrato utilizado

Após a obtenção dos substratos determinou-se o pH inicial, antes de se efetuar a correção dos mesmos nas diferentes soluções. Os resultados obtidos para H₂O (controle), sais (NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O e (NH₄)₂SO₄ todas a 0,1%) e farelo de soja a 1%, estão apresentados na Tabela 06.

Tabela 06. Valores de pH inicial nos três substratos, arroz, milho e trigo.

Substrato	pH		
	Controle (H ₂ O)	Sais	Farelo de soja
Quirera de arroz	6,27	6,38	6,39
Quirera de milho	6,42	6,00	6,23
Farelo de trigo	6,53	6,30	6,42

4.2 Classificação taxonômica das cepas de fungos

Inicialmente realizou-se a classificação taxonômica das cepas fúngicas utilizadas neste estudo, empregando-se as informações constantes da Tabela 07.

Tabela 07. Classificação taxonômica de *Rhizopus oryzae*, *Malbranchea pulchella* e *Chrysosporium zonatum*.

	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Malbranchea pulchella</i>	<i>Chrysosporium zonatum</i>
Reino	Fungi	Fungi	Fungi
Filo	Zygomycota	Ascomycota	Ascomycota
Classe	Zygomycetes	Ascomycetes	Ascomycetes
Ordem	Mucorales	Onygenales	Onygenales
Família	Mucoraceae	Myxotrichaceae	Onygenaceae
Gênero	Rhizopus	<i>Malbranchea</i>	<i>Chrysosporium</i>
Espécie	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Malbranchea pulchella</i>	<i>Chrysosporium zonatum</i>

Fonte: CYBERNOME (2011).

4.3 Seleção da cepa com maior potencial amilolítico

Foram conduzidas fermentações com as três cepas de fungos para avaliar a que apresentava maior potencial para produção de α -amilase. A partir destes resultados foi definida a cepa de fungo a ser utilizada no presente estudo.

4.3.1 *Rhizopus oryzae*

Na literatura as cepas de *R. oryzae* (Figura 04) são descritas como capazes de produzir, ácido láctico (KITPREECHAVANICH et al. (2008), amiloglucosidade SOCCOL et.al (1994) e SPIER (2005), protease KUMAR & TAKAGI (1999) e KUMAR et.al. (2005) , proteína aspártica FARLEY'T; SULLIVAN (1998), xilanase BAKIR et. al., (2001), invertase GOULART et al. (2003), amilase e amiloglucosidade, SPIER (2005), tanase PUROHIT et al. (2006)

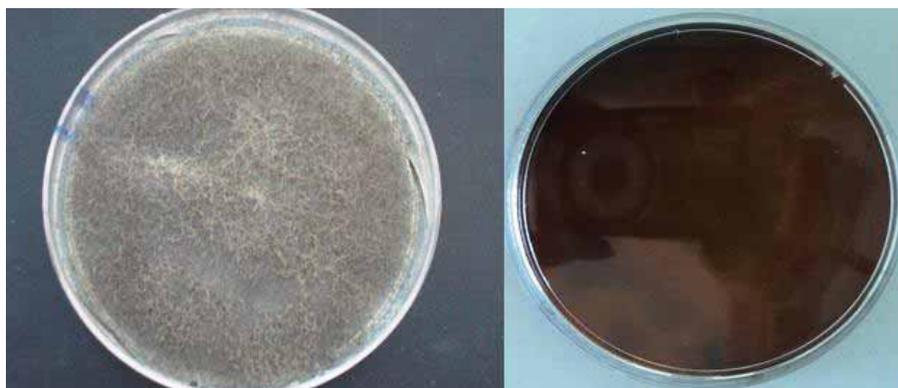


Figura 04. Placa de Petri com cultura de *R. oryzae* em meio Sabouraud com 1% de amido, após 48 h de cultivo, verso e reverso da placa.

A cultura de *R. oryzae*, foi a que melhor produtora de α -amilase e em menor tempo de fermentação. Observou-se que a maior atividade ocorreu após 24 h de fermentação com a produção de 6,350 (U/mL) em meio de cultura usando farelo de trigo (Figura 05). Quando o substrato utilizado foi a quirera de arroz, após 120 e 144 h de fermentação, a atividade enzimática foi da ordem de 2,906 (U/mL) e 2,963 (U/mL) respectivamente. Para a quirera de milho, obteve-se a menor síntese de enzima, sendo que os valores após 96 h foi de 1,502 (U/mL), conforme Figura 05. A produção máxima foi obtida com 120 h (1,835 U/mL).

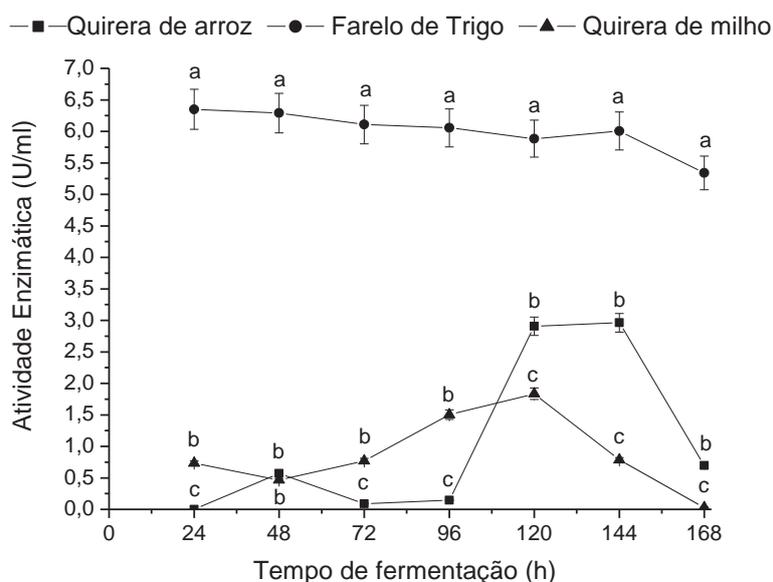


Figura 05. Atividade de α -amilase em *R. oryzae*, em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.

Na Tabela 08 encontram – se os dados relativos ao número médio de atividade enzimática para os três substratos avaliados em tempo de fermentação para *R. oryzae*.

Tabela 08. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para *R. oryzae*.

Fonte de Variação	G L	Quadrado médio							
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas	
Substrato	2	48,279**	44,445**	43,443**	38,311**	17,596**	27,51**	33,459**	
Resíduo	9	0,023	0,051	0,016	0,36	0,116	0,008	0,018	
C.V.		6,37	9,24	5,48	23,60	9,63	2,80	6,68	
DMS		0,297	0,446	0,252	1,197	0,674	0,180	0,266	

**Significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

* Significativo a 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

4.3.2 *Malbranchea pulchella*

A cepa de *M. pulchella* (Figura 06) apresentou um pico de atividade de α -amilase em meio de cultura contendo quirera de arroz como substrato, com 24 h de fermentação (4,464 U/mL). A seguir, verificou-se um pequeno decréscimo com 48 h

de fermentação, observando-se um segundo pico com 72 h (5,032 U/mL) e 96 h (5,336 U/mL), sendo estes os valores máximos e outro pico após 144 h. Posteriormente, a atividade da enzima foi reduzida (Figura 07).



Figura 06. Placa de Petri *M. pulchella* em meio de cultura Sabouraud com 1% de amido, com 120 h de cultivo verso e reverso da placa.

Empregando-se o meio de cultura contendo quirera de milho como substrato as atividades máximas de α -amilase foram obtidas após 72 h (5,032 U/mL) e 96 h (5,336 U/mL), reduzindo a atividade enzimática após 96 h (Figura 07).

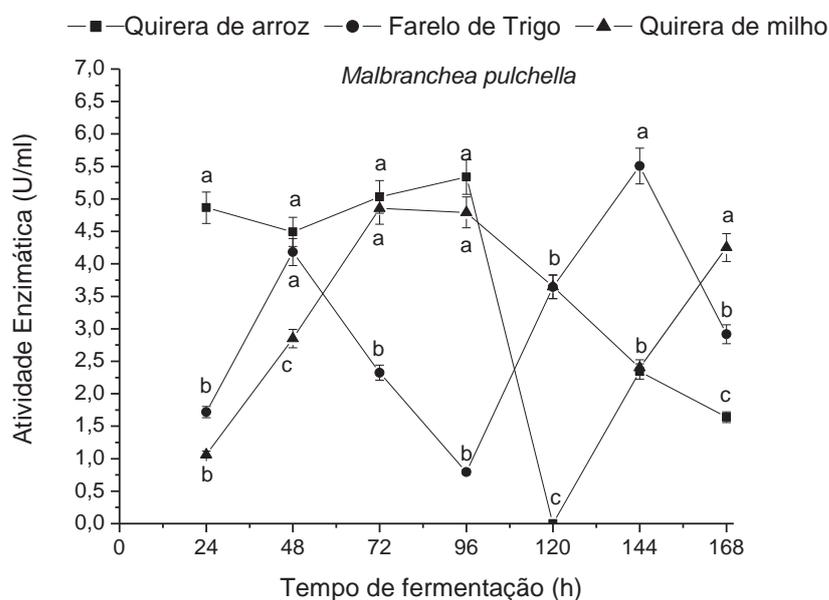


Figura 07. Atividade de α -amilase em *M. pulchella*, em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 45°C , contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.

Quando o substrato utilizado foi o farelo de trigo, observou-se um primeiro pico de atividade enzimática com 48 h de fermentação com a produção de 4,183 (U/mL), e um segundo com 144 h (5,506 U/mL), atingindo a síntese máxima de enzima. (Figura 07

Na Tabela 09 encontram se os dados relativos ao número médio de atividade enzimática nos três substratos avaliados em horas de fermentação para *M. pulchella*.

Tabela 09. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para *M. pulchella*.

Fonte de Variação	G	Quadrado médio						
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
	2	16,519**	3,048**	9,174**	24,612**	17,724**	13,102**	6,824**
Resíduo	9	0,46	0,012	0,320	0,297	0,096	0,238	0,030
C.V.		26,72	2,87	13,90	14,97	12,79	14,29	5,98
DMS		1,345	0,218	1,117	1,077	0,614	0,965	0,347

**Significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

* Significativo a 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

4.3.3 *Chrysosporium zonatum*

Durante o cultivo de *C. zonatum* (Figura 08), verificou-se bom crescimento em placa de Petri contendo meio enriquecido com amido. Entretanto esta cepa demonstrou não ser boa produtora de α -amilase nos três meios de cultura estudados.



Figura 08. Placa de Petri *Chrysosporium zonatum* em meio de cultura Sabouraud com 1% de amido, com 120 h de cultivo, verso e reverso da placa.

Nos três substratos a atividade enzimática foi inferior a 1 U/mL, com exceção do substrato farelo de trigo no qual observou-se o pico máximo de atividade enzimática com 144 horas de fermentação (1,658 m/L) (Figura 09).

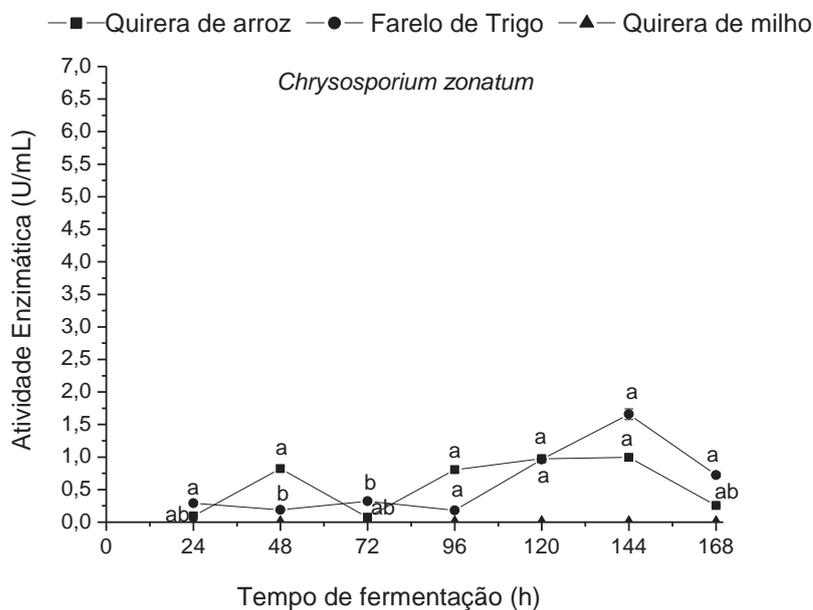


Figura 09. Atividade de α -amilase em *C. zonatum*, em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 45°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.

Na Tabela 10 encontram – se os dados relativos ao número médio das atividade enzimática nos três substratos avaliados em horas de fermentação para *C. zonatum*.

Tabela 10. Número médio de atividade enzimática nos substratos avaliados em horas de fermentação para *C. zonatum*.

Fonte de Variação	de G L	Quadrado médio						
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
	2	0,088*	0,738**	0,115*	0,717 ^{ns}	1,249 ^{ns}	2,784 ^{ns}	0,538*
Resíduo	9	0,020	0,080	0,212	0,222	0,831	1,115	0,130
C.V.		110,31	84,39	109,61	143,43	141,36	119,52	110,83
DMS		0,282	0,560	0,288	0,932	1,802	2,086	0,714

**Significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

* Significativo a 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

Apesar de serem baixos os valores de atividade amilolítica em *C.zonatum* estes são semelhantes aos encontrados na literatura, TÉO (2005), estudando linhagens selvagens de leveduras de fermentação alcoólica em meio de cultura sintético enriquecido com amido conseguiu produção máxima de α -amilase 2,03 U/mL para cepa J07, 1,88 U/mL para cepa J32 e 1,12 U/mL.

Diante dos resultados a cultura de *R. oryzae* foi selecionada para os testes posteriores de fermentação, uma vez que apresentou a maior atividade de α -amilase (6,350 U/mL) em substrato de farelo de trigo, em menor tempo de fermentação (24 h), quando comparada com as outras duas culturas (Anexo 01). Este fato é muito interessante uma vez que é superior aos citados na literatura para outras cepas de fungos filamentosos. Deste modo tem-se que PARIS (2008) usando uma cepa de *A. niger* em soja como substrato e *A. caseiellus* em farelo de soja com 96 horas de fermentação obteve valor de 6,17 U e 6,10 U. Ao mesmo tempo verifica se que BARBERI et al. 2002, obtiveram 5,04 U/totais de enzima após 192 horas de fermentação. RABALHO (2002) estudando o fungo *Mucor sp.* encontrou valores máximos de síntese de α -amilase após 72 horas (6,2 U/mL) em meio de cultura contendo farelo de trigo como substrato, com valores semelhantes aos encontrados neste trabalho com *R. oryzae*, embora o tempo de cultivo tenha sido muito superior a 24 h. Observa-se através do Anexo 01 que a atividade de α -amilase em *R. oryzae*, *C. zonatum* e *C. zonatum nos três substratos estudados*.

Na (Figura 10) pode ser observada a atividade enzimática do extrato bruto de *R.oryzae* medida pelo método dextrinizante, em 24 horas de cultivo.



Figura 10. Visualização da atividade enzimática da α -amilase de *R. oryzae* em 24 horas de fermentação. A esquerda (Controle do amido) tampão com substrato sem extrato enzimático. A direita tampão com substrato e extrato enzimático.

Atualmente a busca por enzimas para utilização na área industrial de alimento leva em consideração vários fatores dentre eles um custo aceitável por unidade de produto final e que os micro-organismos que produzam estas enzimas sejam classificados como GRAS (Generally Re-cognized As Safe) (SOUZA & SOMMER, 2002). O fungo *R. oryzae* se enquadra nesta classificação. Considerando-se que o objetivo deste trabalho era isolar uma cepa fúngica com potencial amilolítico produtor de α -amilase para utilização na produção de açúcar, verifica-se que esta se enquadra como potencialmente favorável.

4.4 Efeito da fonte de nitrogênio sobre a atividade enzimática em *Rhizopus oryzae*

A otimização dos parâmetros fermentativos, tais como teor de umidade inicial, tamanho da partícula, tempo de cultivo, pH, temperatura de incubação e nutrientes adicionais na produção de enzimas tem demonstrado resultados positivos sobre o rendimento bruto de enzimas e suas influências na capacidade dos micro-organismos de sintetizar enzimas. (COUTO & SANROMÁN, 2005)

O nitrogênio é um elemento indispensável para o crescimento microbiano uma vez que é um elemento plástico, imprescindível para o desenvolvimento do micro-organismo, sendo constituinte de aminoácidos, proteínas, produtos básicos além ter função reparadora na célula (MADIGAN et al. 2004).

As fontes de nitrogênio orgânico têm sido relatadas como as preferenciais pelos micro-organismos tais como extrato de levedura, caseína, farinha de soja e extrato de carne. Várias outras fontes de nitrogênio orgânico tem sido testadas para estudo da influência das mesmas na a produção de α -amilase tanto em bactérias quanto em fungos. Além destas fontes citadas, vários sais inorgânicos como sulfato de amônio em *A. oryzae* e *A. nidulans*, nitrato de amônia para *A. oryzae* e sais para *A. fumigatus* têm sido relatados por favorecer e melhorar a produção de α -amilase em fungos (GUPTA et al. 2003).

No presente estudo a suplementação de nitrogênio na forma de sais inorgânica ou farinha de soja, afetou positivamente a síntese de α -amilase por *R. oryzae* em farelo de trigo. Entretanto verificou-se diminuição e inibição da síntese da enzima quando o substrato utilizado foi a quirera de milho e arroz (Tabela 11).

A ausência de fonte de nitrogênio favoreceu a atividade enzimática nos substratos contendo quirela de arroz e milho. Em substrato contendo quirela de arroz a produção da enzima α -amilase foi estimulada nesta condição, sendo que após 24 h de fermentação obteve-se 5,295 (U/mL). O maior valor foi obtido após 72 h de fermentação, sendo 6,100 (U/mL). O substrato a base de milho foi o que menos favoreceu a síntese de enzima, independente da suplementação ou não de sais inorgânicos (Tabela 11).

Tabela 11. Influência da suplementação de nitrogênio na atividade enzimática de *Rhizopus oryzae*.

Atividade enzimática (U/mL) em <i>R. oryzae</i>			
Substratos/Tempo de fermentação (horas)	Quirera de arroz	Farelo de trigo	Quirera de milho
Controle (H₂O)			
24	2,428b	3,425a	1,482c
48	5,295b	5,988a	1,567c
72	6,099a	5,545a	1,041b
96	5,928a	5,760a	1,723b
120	5,609a	4,874b	1,3292c
Farelo de soja a 1%			
24	0,404c	5,289a	0,673b
48	0,500b	4,369a	1,173c
72	1,709b	5,356a	0,434c
96	1,131b	5,206a	0,574b
120	0,977b	5,148a	1,006b
Sais			
24	*	6,349a	0,731b
48	0,569b	6,290a	0,465b
72	0,089c	6,107a	0,771b
96	0,147c	6,055a	1,502b
120	2,906b	5,880a	1,835c

*A atividade enzimática nas condições de ensaio, não foi significativa.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha para cada fonte suplementar de nitrogênio, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quando a fonte de nitrogênio utilizada foi a solução de farelo de soja a 1% nos substratos contendo arroz e milho, observou-se redução da atividade de enzimática. Esses resultados para esta fonte contrariam ao encontrado por GUPTA et. al. (2003), que obtiveram altas taxas de atividade enzimática em farelo de soja e ácido casamino como sendo uma forma econômica e eficiente para produção de α -amilase em *A. oryzae*. Já no meio de cultura contendo trigo como substrato na ausência de suplementação de sais, o fungo *R. oryzae* retardou e reduziu a atividade de α -amilase. O valor máximo de atividade ocorreu após 48 h de fermentação (5,988 U/mL), que se apresentou inferior aos alcançados com suplementação de nitrogênio. (Tabela 11).

De acordo com relatos de BAKIR et al. (2001), *R. oryzae* apresentou maior afinidade por fontes inorgânicas de nitrogênio, para produção de xilanase. Este comportamento também foi observado neste estudo para síntese de α -amilase, reduzindo o tempo de síntese da enzima de 72 h (com suplementação orgânica) para 24 horas (com suplementação inorgânica) (Tabela 11).

A dependência de nitrogênio foi diferente nos três meios de cultura utilizado, na quífera de arroz a presença de nitrogênio afetou a síntese de enzima. O milho é um material rico em zeatina esta fonte de nitrogênio presente neste material apesar de ser considerado na literatura como não muito eficiente. Entretanto parece favorecer a atividade enzimática sem a necessidade de suplementação de nitrogênio, fato este observado neste trabalho, onde as maiores atividades enzimáticas ocorreram na ausência de suplementação de nitrogênio. A farinha de sabugo de milho é citada por BAKIR et al. (2001) que estudando vários subprodutos como fonte de nitrogênio em *R. oryzae*, observou que a melhor atividade enzimática foi observada em sabugo de milho a 2%, como fonte de nitrogênio (nesta condição houve um aumento de 80% na atividade enzimática).

A suplementação de sais foi o tratamento que melhor favoreceu a síntese de α -amilase por *R. oryzae*, em substrato contendo trigo, quando comparado com os outros dois tratamentos. WALDEMARIN (1999), trabalhando com *A. ochraceus*, observou que as fontes de nitrogênio NH_4NO_3 a 0,1% e MgSO_4 , afetavam positivamente a síntese de α -amilase por este fungo. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho.

KUMAR & TAKAGI (1994) e KUMAR, et al. (2005), citam *R. oryzae* como um excelente produtor de protease. Possivelmente a baixa atividade amilolítica no milho

se deve ao fato de substrato apresentar uma grande quantidade de proteína o que poderia favorecer a produção de protease. PARIS (2008) utilizando cepas de *Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus* em soja como fonte de carbono para produção de enzimas observou que este meio favorece primeiro a síntese de protease seguida de amilase e invertase. Quando se utilizou a quirera arroz não foi possível determinar os parâmetros que levaram o fungo a sintetizar maior quantidade de enzima na ausência de fontes de nitrogênio.

Na Tabela 12 encontram-se os dados relativos ao número médio de atividade enzimática nos três substratos, suplementados com sais, H₂O destilada e farelo de soja a 1%, avaliados em horas de fermentação.

Tabela 12. Número médio de atividade enzimática de *R. oryzae* nos substratos, suplementados com sais, H₂O destilada e farelo de soja a 1%.

		Quadrado médio				
		Sais				
Fonte de Variação	GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	48,279**	44,445**	43,443**	38.311**	17.596**
Resíduo	9	0,023	0,051	0,016	0,36	0,116
C.V		6,37	9,24	5,48	23,60	9,63
DMS		0,297	0,446	0,252	1,197	0,674
		Farelo de soja				
Fonte de Variação	GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	30,160**	17,093**	26,106**	25,580**	23,037 *
Resíduo	9	0,010	0,156	0,092	0,375	0,199
C.V.		4,83	19,60	12,12	26,57	18,77
DMS		2,122	2,014	2,499	2,304	2,377
		H ₂ O destilada (controle)				
Fonte de Variação	GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	3,778*	22,614**	30,777**	22,670*	20,948**
Resíduo	9	0,040	0,017	0,242	0,134	0,109
C.V.		8,14	3,07	11,65	8,19	8,41
DMS		0,393	0,259	0,973	0,723	0,654

**Significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

* Significativo a 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

4.5 Umidade

Em substrato contendo farelo de trigo, os teores de umidade não afetaram significativamente a síntese de α -amilase por *R. oryzae*. Este material manteve sua condição de melhor produtor de enzima nas três condições avaliadas para umidade. Embora tenha se observado uma ligeira queda na atividade da enzima quando os teores de umidade decrescem, verifica-se que esta não é estatisticamente significativa.

Para o substrato contendo quirera de arroz a queda de umidade favoreceu a atividade de α -amilase, sendo que as umidades de 50% e 60% não diferiram estatisticamente entre si para este substrato. Para 50 % de umidade, os maiores valores de atividade da enzima foram obtidos após 24 h (3,769 U/mL) e 96 h (3,542b U/mL) de fermentação. Com 60% de umidade os valores máximos de atividade enzimática foram observados com 72 h (3,205 U/mL) e com 96 h (3,861U/mL) (Figura 11).

A umidade de 60% favoreceu a atividade enzimática em substrato contendo quirera de milho sendo que após 120 h foi observada a máxima síntese de enzima (6,279 U/mL), valor comparável a síntese de α -amilase em farelo de trigo (Figura 11). Estes resultados para quirera de arroz e milho, são semelhantes aos observados por RAMACHANDRAM et al. (2004) trabalhando com *A. niger*, que relataram que o melhor valor de umidade para obtenção de amilase foi de 64%. Porém contrastam com TUNGA & TUNGA (2003) que estudando cepas de *A. oryzae* em fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar relataram a necessidade de maiores valores de umidade para produção de amilase. Obtiveram produção máxima desta enzima com 72 h de fermentação com aproximadamente 80% de umidade.

GUANDALINI (2007), estudando o fungo *Metarhizium anisopliae*, utilizando resíduos amiláceos como substrato para produção de amilases, obteve resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho em substratos de quirera de arroz e milho, em onde os valores máximos de atividade enzimática diminuíram com o aumento da umidade. SPIER (2005), estudando diferentes cepas de fungos filamentosos entre eles uma cepa de *R. oryzae*, utilizando fécula de mandioca como substrato e bagaço de cana-de-açúcar como suporte, obteve como resultado que a melhor teor de umidade para produção de α -amilase por *A. niger* foi de 90%.

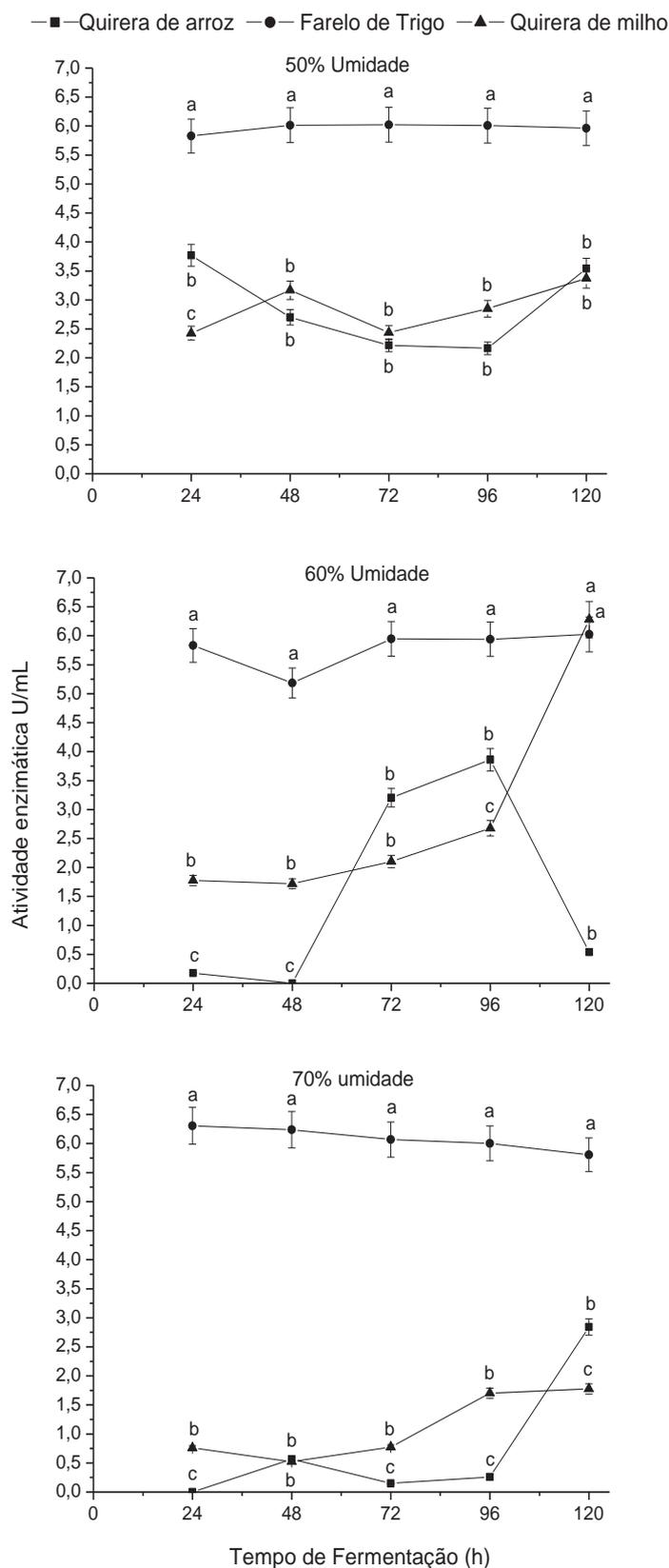


Figura 11. Influência do teor de umidade na atividade de α -amilase em *R. oryzae*, a) 50% de umidade b) 60% de umidade c) 70% de umidade em meio de cultivo contendo farelo de trigo como substrato, em solução nutriente composta por NH_4NO_3 a 0,1% e NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C , contendo bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 120h.

Na Tabela 13 são expressos o número médio de atividade enzimática nos três substratos para as diferentes porcentagens de umidade em *R. oryzae*.

Tabela 13. Número médio de atividade enzimática nos substratos para diferentes porcentagens de umidade em *R. oryzae*

		Quadrado médio				
		50% de Umidade				
Fonte de Variação	de GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	11,731**	12,870**	18,271**	16,816**	8,396**
Resíduo	9	0,197	0,610	0,242	0,526	0,376
C.V.		11,09	19,72	13,83	19,76	14,29
DMS		0,877	1,543	0,972	1,434	0,306
		60% de Umidade				
Fonte de variação	GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	33,997**	27,900**	15,679**	10,901**	41,833**
Resíduo	9	0,324	0,445	0,485	0,250	0,222
C.V.		21,96	29,02	18,57	12,04	11,05
DMS		1,126	1,139	1,376	0,989	0,932
		70% de Umidade				
Fonte de Variação	GL	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
	2	48,279**	44,445**	43,443**	38,311**	17,596**
Resíduo	9	0,023	0,051	0,016	0,36	0,116
C.V.		6,37	9,24	5,48	23,60	9,63
DMS		0,297	0,446	0,252	1,197	0,674

**Significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

* Significativo a 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste de F.

No Anexo 02 encontram-se os dados referentes à atividade enzimática nos três substratos agroindustriais, com diferentes teores de umidade.

4.6 Efeito do pH inicial do substrato e temperatura de incubação do fungo sobre a síntese de α -amilase em farelo de trigo.

Foi estudado o efeito da temperatura de incubação e do pH inicial do substrato em *R. oryzae*. Como a maior taxa de atividade enzimática foi obtida com 24 horas em substrato contendo farelo de soja, com 70% de umidade, em solução nutriente composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 24 horas, esta foi a condição usada na avaliação.

Os resultados obtidos demonstraram que a temperatura de incubação afetou sutilmente a atividade de α -amilase por *R. oryzae*. Relatos de KITPREECHAVANICH et al (2008), estudando cepas termotolerantes de *R. oryzae* relataram que o fungo apresentou capacidade de resistir a temperatura de até 45°C, sendo que o maior crescimento de micélio ocorreu até 34°C. DALSENER (2005), estudando os efeitos dos aumentos de temperatura sobre crescimento e a produção de glucoamilase em *R. oryzae* observou que o fungo resistiu a temperatura de 45°C.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a síntese de α -amilase foi maior sob temperatura de 35°C e na faixa de pH entre 4,0 e 4,5, onde também se observou maior crescimento do fungo. Embora o crescimento de micélio não tenha sido quantificado, a observação visual do mesmo evidenciou um maior crescimento nesta faixa de temperatura e pH. Segundo GUPTA et al. (2003) a temperatura ótima para a síntese da enzima apresenta correlação direta com o crescimento dos micro-organismos, fato também observado neste trabalho (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade enzimática sob diferentes condições de temperatura e de pH em farelo de trigo, com 24 horas de fermentação para *R. oryzae*.

pH	Temperatura			
	30°C	35°C	40°C	45°C
4,0	5,941a	6,057a	5,553ab	5,104b
4,5	5,940a	6,067a	5,484ab	5,271b
5,0	6,013a	5,953a	5,474a	5,515a
5,5	5,962a	5,986a	5,445a	5,518a
6,0	6,053a	5,897a	5,481a	5,488a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

BAKIR et al. (2001), também obteve atividade máxima de enzima a 35°C, para uma cultura de *R. oryzae*. HAN et al. (2002), estudando a formação de biomassa por uma cepa do gênero *Rhizopus* observaram que a temperatura onde se obteve maior quantidade de biomassa foi a 25°C. Quando a temperatura foi aumentada para 40°C, a taxa formação de biomassa ainda era elevada o que vem a ressaltar que cepas deste gênero são capazes de resistir a temperatura, continuando a sintetizar quantidades significantes de seus metabólicos.

O pH do meio de cultivo é um fator importante a ser controlado. Sua alteração durante o crescimento de um micro-organismo afeta diretamente a estabilidade do produto no meio. Em várias espécies de fungos filamentosos, a capacidade tamponante de alguns componentes do meio elimina a necessidade de controle de pH (GUPTA et al. 2003). LIAO et al. (2007) estudando a formação de pellet em *R. oryzae* observaram que não houve diferenças significativas na formação de grânulos com uma faixa de pH de 3,0 a 7,0. A estirpe selecionada neste trabalho apresentou comportamento semelhante, na faixa de pH avaliada (4,0 a 6,0) não comprometendo significativamente a atividade de α -amilase. Este comportamento evidencia que esta estirpe provavelmente não é tão sensível aos efeitos de alteração de pH. Este fato já foi anteriormente observado em outras espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*. (Galbraint & Smith 1969)

A temperatura que mais favoreceu a atividade de α -amilase por *R. oryzae*, neste estudo foi a de 35°C em pH 4,5 apresentando uma produção de 6,067 (U/mL) de enzima. Resultados obtidos (Tabela 14) demonstram que sob aumento de temperatura observa-se um declínio na atividade enzimática.

4.7 Caracterização da α -amilase de *R. oryzae*

4.7.1 Efeito do pH

O pH atua diretamente sobre os grupos ionizáveis envolvidos no sítio ativo das enzimas. Tais grupos estão diretamente ligados na manutenção da conformação do sítio ativo, da ligação entre o substrato e a enzima ou do substrato para produto. É de extrema importância a determinação da faixa de pH de atuação de uma enzima

para manutenção da sua forma ativa durante uma reação enzimática ou para sua inativação quando isso se fizer necessário (MACEDO, 2005).

Analisando-se o gráfico do perfil da enzima frente às variações de pH, é possível sugerir que no extrato enzimático exista mais de um tipo de enzima, já que se observa mais de um pico de atividade enzimática, sendo o primeiro entre valores de pH 4,5 - 6,0 e o segundo próximo de 8,5 (Figura 12).

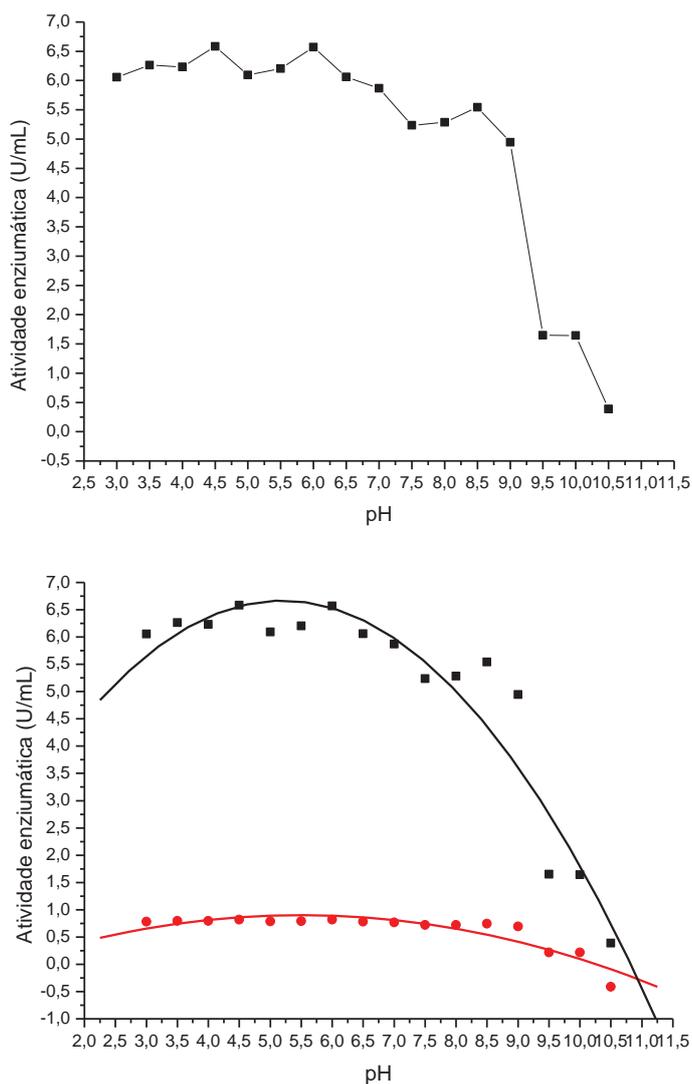


Figura 12. Caracterização físico-química da enzima bruta de *R. oryzae*, avaliação da atividade da enzima frente às variações de pH, nos seguintes tampões: acetato (pH 3,0 -5,5), citrato/NaOH (pH 5,5 – 7,0), Tris/HCl (pH 7,0 – 8,5) e glicina/ NaOH (8,5 – 10,5).

O intervalo entre 4,5 - 6,0 favorece a utilização desta α -amilase para quebra do amido presente no caldo de cana, uma vez que a enzima utilizada atualmente no

setor sucroalcooleiro, quando da produção de açúcar cristal tem sua melhor atividade na faixa de pH entre o ácido e o neutro.

O perfil apresentado pela enzima extraída de *R. oryzae* é desejável uma vez que segundo relatos da literatura o pH, ótimo de atuação da maioria das enzimas encontra-se entre 4,0-5,5. Os resultados obtidos neste trabalho destacam esta cepa pelas características de sintetizar enzimas ativas em pH mais alcalinos. Deve se salientar que existem poucas enzimas com este perfil de pH e estas tem sido muito procuradas.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados por GOULART et al. (2003), purificando parcialmente uma invertase de *Rhizopus sp.* obtiveram perfil semelhante, apresentando duas faixas de pH ótimos distintos entre 6,0 e 9,0.

SOUZA & MAGALHÃES (2010), em uma revisão de α -amilase, das 18 espécies de fungos citadas somente três apresentação pH de atuação entre 7,0 e 9,0, todas as demais eram mais ativas em pH entre 4,75 e 6,0. MICHELIN et al. (2010), relataram que na cultura de *Paecilomyces variotti* que a melhor atividade de α -amilase se deu em pH ácido. KUMAR, et al. (2005), obtiveram atividade ótima de uma protease ácida de *R. oryzae* em pH, 5,5.

4.7.2 Efeito da temperatura

Foi avaliado o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática do fungo para que fosse determinada sua atividade ótima. Para isso a solução enzimática foi incubada no pH definido como ótimo, em faixa de temperatura de 30°C a 90°C (com variação de 5°C), sendo a atividade enzimática foi dosada através do método dextrinizante.

A temperatura é um dos fatores que mais interferem na atividade enzimática, uma vez que regulam as reações catalisadas pela enzima, podendo acelerar ou inibir sua atividade. O uso de temperaturas altas pode acelerar uma reação, reduzindo o tempo de duração de um determinado processo, por outro lado a enzima poderá ser inativada em temperaturas muito elevadas (SAID & PIETRO, 2004). Pode-se observar (Figura 13), que a melhor temperatura para atividade enzimática foi a 75°C, resultado este desejável uma vez que de acordo com dados

da literatura a maioria das cepas de fungos apresenta uma faixa de atuação das α -amilases em temperaturas bem mais restritas (entre 50-60°C).

MICHELIN et al. (2010), avaliando a temperatura ótima da uma α -amilase produzida por *Paecilomyces variotti*, obteve que a melhor temperatura era de 60°C. SOUZA & MAGALAHÃES (2010) em revisão da literatura referente a aplicação de α -amilases na indústria, citam 10 espécies de fungos filamentosos e leveduras, sendo que em nenhuma destas estirpes a temperatura ótima da enzima foi superior a 75°C.

GUPTA et al. (2003), em revisão literária sobre α -amilases, também verificaram que dentre as espécies fúngicas citadas, nenhuma apresentava estabilidade acima de 70°C. HAKI et al. (2003), considerando a evolução industrial e aplicação de enzimas termoestáveis relata que a grande maioria das α -amilases de origem fúngica tem termoestabilidade entre 50-60°C. MOREIRA et al. (1999) caracterizando uma α -amilase de *Aspergillus tamarii*, obteve temperatura ótima entre 50-60 °C.

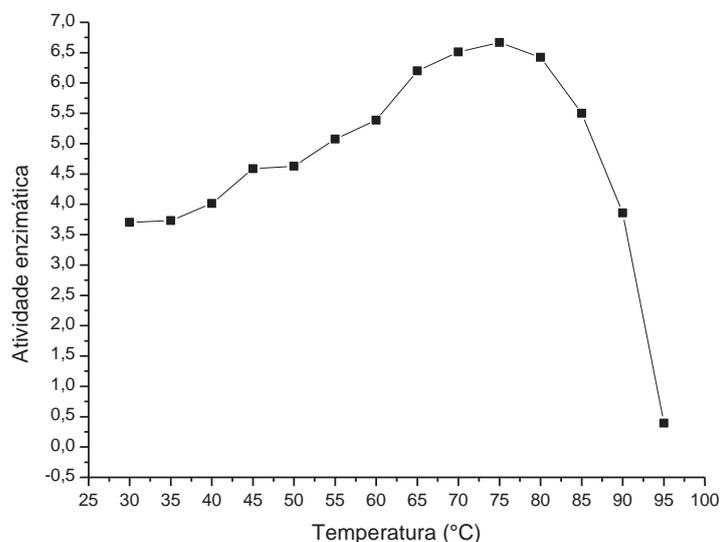


Figura 13. Caracterização físico-química da enzima bruta de *R. oryzae*, avaliação da atividade da enzima frente as variações de temperatura entre 30-95°C.

Esta característica da enzima de apresentar máxima atividade a 75°C, é muito interessante, considerando-se as possibilidades de sua utilização no setor sucroalcooleiro, uma vez que esta temperatura é próxima a da liquefação do amido.

R. oryzae, apresentou ser uma cepa de fungo capaz de sintetizar enzimas com características termoestáveis (Tabela 15).

Tabela 15. Atividade enzimática U/mL, e atividade residual da enzima em %, em temperaturas de 30-95°C.

Temperatura °C	Atividade enzimática U/mL	Atividade enzimática %
30	3,703	55
35	3,731	55
40	4,013	60
45	4,588	68
50	4,628	69
55	5,077	76
60	5,388	80
65	6,200	92
70	6,511	97
75	6,669	100
80	6,421	96
85	5,500	82
90	3,858	57
95	0,391	5,86

BAKIR et al. (2001) estudando uma cepa de *R. oryzae* obteve atividade máxima de uma endo-beta-xilase a 55°C. KUMAR et al. (2004) também em *R. oryzae*, na produção de protease ácida obtiveram máxima atividade enzimática a 60°C.

4.8. Estabilidade da Enzima a 75°C

Vários fatores podem influenciar na estabilidade de uma enzima, afetando as estruturas secundárias, terciária e quaternária da proteína. Dentre eles a temperatura, o pH, presença ou ausência de co-fatores além de outras moléculas de baixo peso molecular. A temperatura e o pH merecem destaque, por serem parâmetros fundamentais para determinação da estabilidade de uma enzima (MACEDO et al. 2005).

Enzimas termoestáveis são desejáveis em vários processos industriais, porém quando sua inativação se faz necessária, este fato pode representar a necessidade de um aumento de temperatura ou uma mudança brusca de pH. Segundo informações da NOVOZYMES (2011), a enzima atualmente utilizada na fabricação de açúcar suporta até 1 hora em temperatura superior a 75°C. Entretanto, considerando-se a dinâmica do processamento industrial pode-se verificar a presença de resíduos de α -amilase no açúcar final. A presença de amido bem como resíduos de α -amilase deprecia a qualidade do açúcar, dificultando sua comercialização.

No presente trabalho a estabilidade da α -amilase produzida por *R. oryzae* apresenta sua meia vida, ou seja 50% da atividade, em 25 minutos, (Figura 14) MOREIRA et al. (1999), observaram que o *A. tamaritii* a 65°C apresentou meia-vida de 30 min. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, porém sob temperaturas mais elevadas, da ordem de 75 °C.



Figura 14. Perda da estabilidade da enzima em função do tempo (min).

Deve-se destacar ainda que a literatura trás relatos de termoestabilidade bem maiores para α -amilase. Neste sentido MICHELLIN et al. (2010), observaram em estudos com *Paecilomyces variotti*, que a enzima foi estável por 60 min em temperatura de 55°C. CORDEIRO et al. (2002) caracterizando uma α -amilase produzida por uma cepa termofílica de *Bacillus sp.* observou que a enzima foi

estável por 2h a 50°C, enquanto que a 60°C, 70°C e 90°C, 4%, 13% e 38% da atividade original foram perdidas, respectivamente.

A enzima com 30 minutos apresenta apenas 18% da atividade enzimática (Figura 15), sendo esta uma característica interessante para o processo de produção de açúcar uma vez que possibilitaria sua remoção majoritária no produto final. A enzima empregada atualmente na indústria é termoestável por mais de 60 min, o que dificulta a remoção da mesma do produto final, inviabilizando seu uso para alguns setores alimentícios e farmacêuticos (NOVOZYMES, 2011). Estudos da interferência dos vestígios de α -amilase em açúcares para produção de alimentos são pouco relatados na literatura, porém é conhecido do setor inúmeros relatos, de reclamação quanto à qualidade do açúcar, tanto por apresentar elevados valores de amido quanto pela presença de resíduos de α -amilase.

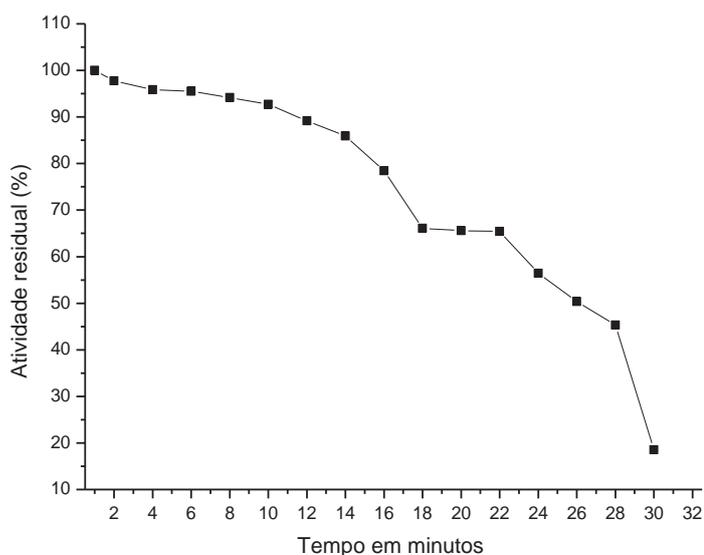


Figura 15. Avaliação da estabilidade da enzima α -amilase a 75°C, em intervalos de 2 minutos.

Pelo exposto, a α -amilase produzida por *R. oryzae* apresenta características interessantes para aplicação na produção de açúcar. Tanto o pH, quanto a temperatura ótima de atuação são semelhantes aos da α -amilase atualmente empregada no setor.

A Tabela 16, resume os parâmetros fermentativos e caracterização da enzima de *R. oryzae*.

Tabela 16. Melhores condições fermentativas para obtenção da α -amilase de *R. oryzae* e caracterização da enzima.

Condições	Resultados
Tempo de cultivo	24
Melhor substrato	Trigo
Melhor fonte de nitrogênio	NH_4NO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1%;
Melhor teor de umidade (%)	70%
pH para síntese de enzima	4-7
Temperatura de incubação	35
pH de atividade ótima	4,5; 6,0 e 8,5
Temperatura ótima de atuação (°C)	75°C
Estabilidade da enzima (Min)	26

5 CONCLUSÕES

- 1- Das três cepas analisadas *Rhizopus oryzae*, *Malbranchea pulchella* e *Chrysosporium zonatum* a de *R. oryzae* foi a que apresentou a maior atividade enzimática para α -amilase a partir de subprodutos agroindustriais, obtendo máxima atividade em farelo de trigo com apenas 24 horas de cultivo.
- 2- A cepa de *R. oryzae*, demonstrou ser dependente de nitrogênio para alcançar os valores máximos da enzima em farelo de trigo. Nos dois outros substratos testados (quirera de arroz e milho), o fungo alcançou maiores atividades enzimáticas na ausência de fonte de nitrogênio.
- 3- A umidade influenciou a atividade enzimática nos substratos, sendo que em farelo de trigo os maiores valores foram alcançados com 70% e para quirera de arroz e milho valores de 60%-50%, demonstraram ser mais eficientes.
- 4- O pH entre 4,0 e 6,0 não trouxe alterações significativas para a atividade da enzima.
- 5- *R. oryzae* demonstrou ser uma cepa de fungo tolerante a temperatura até 45 °C.
- 6- A atividade enzimática da α -amilase produzida por *R. oryzae* apresentou mais de um pico, para as faixas de pH entre 4,0-6,0 e 8,0, sugerindo que o fungo produz mais de uma enzima.
- 7- A enzima α -amilase apresentou máxima atividade a 75°C, com meia vida de 25 min.
- 8- O *R. oryzae* pode ser considerado potencial produtor de α -amilase, com aplicação para produção de açúcar. Uma vez que este micro-organismo é classificado como sendo GRAS, além de apresentar todas as características de temperatura e pH, adequados ao processo industrial do açúcar.

6 REFERÊNCIAS

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.4, 2001.

AMORIM, H.V; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar & Álcool**, n.5, p.32-35, 1982.

BAKIR,U; YAVASCAOGLU, S; GUVENC, F; ERSAYIN, A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29 p. 328–334, 2001

BARBERI K. C, KNOB A.; BRENDA, A. E.; MARESE, A. M.; KADOWAKI M. K. **In XI Encontro Anual de Iniciação Científica**. Resumos ... Maringá – PR, Universidade Estadual de Maringá/Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2002.

BECERRA, M. and GONZÁLEZ SISO, M.I. Yeasts b-galactosidase in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 19, n. 1, p. 39-44, 1996.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, A. **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2001.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, Brasil, 2006.

CLARKE, M.A. Sistemas para a Produção de Açúcar Branco. **STAB**, v.15, n.3, 1997.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2005.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. LEAL, M.L.. Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp.. **Braz. J. Microbiol.** , São Paulo, v. 33, n.1, 2002.

CYBERNOME. *Disponível em:* < <http://www.cybertruffle.org.uk/cgi-bin/nome.pl?organism=30230&glo=por>> Acesso em: 10 de fev.de 2011.

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopusoryzae* em fermentação em estado sólido.** Tese Doutorado (Ciências Bioquímicas) Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005.

FARLEY'T, P.C and SULLIVAN, P.A. The *Rhizopus oryzae* secreted aspartic proteinase gene family: an analysis of gene Expression. **Microbiology**, v. 144, p. 2355-2366, 1998.

FERREIRA, D. F. SISVAR 4.3 (Sistema para análise de variância para dados balanceados). Lavras, UFLA, 2002. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>>. Acesso em 10 abr. 2011.

FIGUEIRA, JOELISE DE ALENCAR. **Determinação e caracterização de amido em cana-de-açúcar e adequação de metodologia para determinação de alfa-amilase em açúcar bruto.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade de Campinas, 2009.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 60f . 2010.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. **Journal of Biochemistry**, v, 41, p. 583-603, 1954.

Galbraith, J.C; Smith, J.E. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. **Journal of General Microbiology**, v. 59, p. 31-45, 1969.

GARBOSA, F.G; TRINDADE, J.L.F. Bioconversão de Resíduos Agroindustriais – uma Revisão, **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente**, v. 2, n. 4 , 2008.

GENEROSO, R.A.R; GOMES P.C; ROSTAGNO H.S; ALBINO L.F.T; BARRETO S.L.T; BRUMANO G. Composição química e energética de alguns alimentos para frangos de corte em duas idades. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v.37, n. 7, p. 1251-1256, 2008.

GODOY, A. Soluções para redução do amido na açúcar, **In: REUNIÃO ANUAL DA FERMENTEC**, 25, 2004, São Pedro. Resumos...Piracicaba: Fermentec, p. 8-9, 2004.

GOULART, A.J; ADALBERTO, P.R; MONTI, R. PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INVERTASE A PARTIR DE *Rhizopus sp* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.2, p. 199-203, 2003.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansiopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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.

HAKI, G.D; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17–34, 2003.

HAN, B-Z; MA, Y; ROMBOUTS, F.M; NOUT, M.J.R. Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* during sufu pehtze preparation. **Food Chemistry**, v. 81, p. 27–34, 2003.

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

HERNÁNDEZ F.I.L; VALADARES FILHO S.C; PAULINO M.F; MANCIO A.B; CECON P.R; LANA R.P; MAGALHÃES K.A; REIS S.L.R. Avaliação da composição de vários alimentos e determinação da cinética ruminal da proteína utilizando o método de produção de gás e amônia “In vitro”. **Rev. Bras. de Zootecnia** v.31, n. 1, p. 243-255, 2002.

IMRIE, F.K.E, TILBURY, R.H. **Polyssacarides in sugar cane and its products**. Amsterdam: Elsevier, 1972.

JENSEN B; P. NEBELONG; J. OLSEN AND M. REESLEV, (2002) Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*, **Biotechnology Letters** 1.

KITPREECHAVANICH, V; MANEEBOON,T; KAYANO,Y and SAKAI K. Comparative Characterization of L-Lactic Acid-Producing Thermotolerant *Rhizopus* Fungi. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, The Society for Biotechnology**, Japan. v. 106, n. 6, p. 541–546, 2008.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, 2005.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial alkaline proteases: from a industrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LIAO, W; LIU,Y; FREAR, C; CHEN, S. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology** , v. 98, p. 3415–3423, 2007

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHMIDELL, W. Produção de Etanol. In: **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.3, 2001.

MACEDO, G. A; PASTORE, G.M; SATO, H H; YON, G; PARK, K. **Bioquímica experimental de alimentos**. 1° ed. Editora Varela, 2005.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MICHELIN, M; SILVA, T. M.; BENASSI, V.M; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MORAES, L. A. B.; LEÃO, J.M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F. POLIZELI, M.L.T.M. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2348-2353, 2010.

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*. **Rev. Microbiol.**, v.30, n.2, p.157-162, 1999.

MUTTON, M. J. R. **Workshop sobre “PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA” Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas** Painel 2:“Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica”. UNESP – Campus Jaboticabal, 2008.

NEVES, J. L. M; MAGALHÃES, PAULO S. G; MORAES, E. E; ARAÚJO, F. V. M. Avaliação de perdas na colheita mecanizada em dois fluxos de massa de cana-de-açúcar. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.787-794, 2006.

NOVOZYMES. Disponível em: < www.novozymes.com > Acesso em jan.2011.

OLIVEIRA, D.T; ESQUIAVETO, M.M.M., JUNIOR SILVA, J,F. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia . **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, p. 99-102, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p.109-117, 1992.

PARIS, L.D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná.115f .2008.

PUGLIA, A.L. **Desempenho de leveduras com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 42f . 2006

PUROHIT, J.S; DUTTA, J.R; NANDA, R. K; BANERJEE, R. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology** v.97, p. 795–801, 2006.

RABALHO, A.A. **Isolamento de linhagens microbianas termófilas amilolíticas, produção caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.183f .2002.

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.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 100p. (Apostila).

ROMERO, T.H. AQUINO, F.W.B. FRANCO, D.W. Perfil da concentração de amido no açúcar brasileiro. Simpósio internacional de Iniciação Científica. 2010, São Paulo. **Resumo dos trabalhos**. São Paulo: [s.n.], 2010

SAID, S; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. 178f, 2005.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em relação com a produção de Ácido Fumárico. Biotransformação de resíduo Sólido de mandioca por *Rhizopus* e *Basideomacromicetos* do Gênero *Pleurotus***. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Parana Curitiba, 228f. 1994.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial amylase in industry – a review. **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v.41, n.4, p. 850-861, 2010.

SOUZA, H.L; SOMMER, P.S-M. As enzimas industriais na produção de alimentos: passado, presente e perspectivas futuras. **Associação Brasileira de Biossegurança**. Ano 2, nº2, julho de 2002. Disponível em:< <http://www.anbio.org.br/jornais/jornal7/pag6e7.htm>>. Acesso em: 20 de jan. de 2011.

STUPIELLO, J.P. **Cursos de Boas Práticas** Laboratoriais. Palestra realizada na Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil – STAB em fev. de 2011.

STUPIELLO, J.P. O uso de processos enzimáticos. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**. Piracicaba, v.29, n.1, p. 07, 2010.

STUPIELLO, J.P. **A Fisiologia da Cana-de-Açúcar dentro da Fábrica**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FISILOGIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, STAB, 2001 1 CD-ROM.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; SANTARÉM, E. R. **Fisiologia vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TÉO, D. **Produção e caracterização de amilases de levedura isoladas da fermentação etanólica.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 70f . 2005.

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

ZAMBOM, M.A; SANTOS G.T; MODESTO E.C; ALCALDE C.R; GONÇALVEZ G.D; SILVA D.C; SILVA K.T; FAUSTINO J.O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v.23, n. 4, p.937-943, 2001.

WALDEMARIN, M. M. **Atividade amilolítica de *Aspergillus ochraceus*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.80f .1999.

7 APÊNDICE

Anexo 01. Atividade de α -amilase em *R. oryzae*, *C. zonatum* e *C. zonatum* em meio de cultivo contendo quirera de arroz, farelo de trigo e quirera de Milho como substrato, umidade inicial de 70%, com solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, a 35°C, contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar como suporte, durante 168 horas.

Substratos/Tempo de fermentação (horas)	Atividade enzimática (U/mL)		
	Quirera de arroz	Farelo de trigo	Quirera de milho
<i>R. oryzae</i>			
24	*	6,349a	0,731b
48	0,569b	6,290a	0,465b
72	0,089c	6,107a	0,771b
96	0,147c	6,055a	1,502b
120	2,906b	5,880a	1,835c
144	2,963b	6,006a	0,784c
168	0,695b	5,339a	0,030c
<i>M. pulchella</i>			
24	4,864a	1,719b	1,062b
48	4,492a	4,183b	2,849c
72	5,032a	2,324b	4,853a
96	5,336a	0,794b	4,793a
120	*	3,643a	3,649a
144	2,3417b	5,506a	2,402b
168	1,638c	2,917b	4,251a
<i>C. zonatum</i>			
24	0,096ab	0,292a	*
48	0,820a	0,188b	*
72	0,075ab	0,324a	*
96	0,807a	0,180a	*
120	0,974a	0,962a	*
144	0,993a	1,658a	*
168	0,255ab	0,723a	*

* A atividade enzimática nas condições de ensaio, não foi insignificante. Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 02. Atividade enzimática nos três substratos avaliados em horas de fermentação para diferentes porcentagens de umidade em *R. oryzae*

Substratos/Tempo de fermentação (horas)	Atividade enzimática (U/mL) em <i>R. oryzae</i>		
	Quirera de arroz	Farelo de trigo	Quirera de milho
50% Umidade			
24	3,769b	5,827a	2,427c
48	2,700b	6,014a	3,167b
72	2,216b	6,023a	2,436b
96	2,165b	6,008a	2,847b
120	3,542b	5,963a	3,374b
60% Umidade			
24	0,178c	5,833a	1,776b
48	*	5,185a	1,7192b
72	3,205b	5,947a	2,102b
96	3,861b	5,9392a	2,678c
120	0,539b	6,024a	6,279 ^a
70% Umidade			
24	*	6,349a	0,731b
48	0,569b	6,290a	0,465b
72	0,089c	6,107a	0,771b
96	0,147c	6,055a	1,502b
120	2,906b	5,880a	1,835c

* A atividade enzimática nas condições de ensaio, foi insignificante.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.