

Tony Márcio da Silva

“Produção de Amilases termoestáveis pelo fungo filamentoso termofílico *Rhizomucor pusillus* A 13.36 e aplicação das enzimas na hidrólise de amido de milho e mandioca para a produção de xarope”



1910001435



Tony Márcio da Silva

“Produção de amilases termoestáveis pelo fungo filamentoso termofílico *Rhizomucor pusillus* A 13.36 e aplicação das enzimas na hidrólise do amido de milho e mandioca para a produção de xarope”.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto – SP, para a obtenção do título de
mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos (Área
de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Elton Gomes

São José do Rio Preto-SP
2003

Tony Márcio da Silva

“Produção de amilases termoestáveis pelo fungo filamentoso termofílico *Rhizomucor pusillus* A 13.36 e aplicação das enzimas na hidrólise do amido de milho e mandioca para a produção de xarope”.



T 1435/05

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, câmpus de São José do Rio Preto – SP, para a obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

São José do Rio Preto-SP

2005



663.1
5586p

07/10/2005

Doação

R\$ 28,00

Autor(a)

Silva, Tony Márcio da.

Produção de amilases termoestáveis pelo fungo filamentoso termofílico *Rhizomucor pusillus* A13.36 e aplicação das enzimas na hidrólise do amido de milho e mandioca para a produção de xarope / Tony Márcio da Silva – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005
145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Fermentação. 4. Enzimas de fungos. 5. Enzimas - Aplicações industriais. 6. Diastase. 7. Proteínas. 8. Amilases. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.1



BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes - Orientadora
(IBILCE/UNESP)

Prof. Dr. Jonas Contiero
(IB/UNESP/Rio Claro)

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Zangirolami
(UFSCAR)

MEMBROS SUPLENTES

Prof. Dr. Maurício Boscolo
(IBILCE/UNESP)

Prof^a. Dr^a. Rosani Peralta
(Universidade Estadual de Maringá)



AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

A Prof.ª Maria Gomes, pela orientação pessoal, pela confiança depositada, pelos ensinamentos que facilitaram muito na minha formação e pela dedicação para com todo trabalho.

Ao Prof. Roberto de Souza, pelas orientações durante o desenvolvimento do trabalho e pelas várias sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Dedico:

Aos meus pais, Saulo e Lazara, que tanto batalharam para minha formação, e que sempre serão meus exemplos de vida.

Aos meus irmãos, Paulo Sergio, João Ismael, José Carlos, Aluísio e Elbia, pelo apoio sempre prestado.

Aos meus queridos sobrinhos: Saulo, Talhes, Kaique, Paulo Vitor, Carol, Giovana, Lais, Carlos Henrique e Sarah, por cada dia mais me fazerem acreditar que a paciência pode ser mais que uma mera virtude.

A Anna Christina, pela compreensão e companheirismo.



AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À Prof^a Eleni Gomes, pela orientação prestada, pela confiança depositada, pelos ensinamentos que contribuíram muito na minha formação e pela dedicação para com deste trabalho.

Ao Prof. Roberto da Silva, pelas inúmeras dúvidas esclarecidas, pelos momentos agradáveis e pelas valiosas sugestões que contribuíram para enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Maurício Boscolo, pelo uso do laboratório e equipamentos, além da atenção prestada.

A todos os amigos do laboratório, pela valiosa colaboração e pelos momentos agradáveis: Alessandra, Alexandre, Ana Flávia, Aline, Andréia, Ana Paula, Caio, Carla, Carolina, Daniela, Dênis, Édio, Eduardo, Ellen, Érika, Fabiana, Flávia, Gisele, Heloisa, Kívia, Marcelo, Márcia Maria, Márcia Rizatto, Mariana, Maricy, Natália, Paula, Patrícia, Rodrigo, Solange, Viviane, Tatiane e Claudinei.

A todos os funcionários do IBILCE, que de alguma forma contribuíram.

A todos os meus amigos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPS pelo apoio financeiro.



SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	V
	LISTA DE TABELAS.....	VII
	RESUMO.....	VIII
	ABSTRACT.....	X
I	INTRODUÇÃO.....	1
II	REVISÃO DA LITERATURA	3
1	Amido	3
2	Enzimas amilolíticas	8
3	Amilases fúngicas	14
4	Produção e características de amilases fúngicas	18
5	Microrganismos termofílicos	26
6	Enzimas termofílicas	28
7	Amilases termofílicas	30
III	OBJETIVOS	33
IV	MATERIAL E MÉTODOS	34
1	Microrganismo	34
2	Meios de cultivo	34
2.1	Meios para manutenção da cultura selecionada	34
2.2	Meios para a produção das enzimas	34
2.2.1	Meios para a avaliação dos efeitos de parâmetros físico-químicos sobre a produção das enzimas	34
2.2.2	Meios alternativos para a produção das enzimas	34
2.2.2.1	Processamento da mandioca	35
2.2.2.2	Resíduos de milho	35
3	Substratos alternativos para medida de atividade enzimática	36

4	Processo fermentativo	36
5	Extração da enzima bruta	37
6	Métodos de determinação da atividade enzimática	37
6.1	Medida da atividade amilolítica pelo método dextrinizante (α -amilase)	37
6.2	Medida da atividade de amilase sacarificante pela quantificação do açúcar redutor liberado (atividade amilolítica geral)	38
6.3	Medida da atividade através da liberação de glicose (atividade de glucoamilase)	39
7	Dosagem de açúcares redutores re proteínas totais dos meios de cultivo	40
8	Avaliação do crescimento fúngico	41
8.1	Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo em meio sólido	41
8.2	Avaliação do crescimento microbiano durante o processo fermentativo em meio líquido	41
9	Avaliação dos efeitos de parâmetros físico-químicos e da fonte de carbono sobre a produção das amilases	42
9.1	Efeitos do pH, temperatura e tempo de cultivos sobre a produção das enzimas	42
9.2	Efeito do uso de resíduos sólido de processamento de mandioca e farelo de milho como fonte de carbono sobre a produção das enzimas	42
10	Caracterização das enzimas	43
10.1	Efeito do pH sobre a atividade das enzimas	43
10.2	Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas	43

	Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência	73
10.3	de substrato	44
	Efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em	73
10.4	ausência de substrato	44
10.5	Estabilidade a 60°C	44
10.6	Efeito das condições e tempo de armazenamento do extrato	
	enzimático sobre a estabilidade das enzimas	45
10.7	Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade enzimática	45
10.7.1	Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade	
	das amilases	45
10.7.2	Efeito da adição de outros íons à mistura de reação, sobre a	
	atividade das amilases	46
10.8	Atividade enzimática sobre diferentes substratos amiláceos,	
	derivados do amido e sacarose	46
10.9	Identificação dos produtos de hidrólise enzimática do amido a 1%	48
11	Hidrólise do amido de milho e mandioca para produção de xarope	48
12	Determinação da atividade amilolítica em gel de poliacrilamida ...	49
V	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
1	Avaliação do crescimento, em placa de petri, sob diferentes	
	temperaturas	50
2	Estudo do efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção	
	das amilases	52
3	Efeito da temperatura de incubação sobre a produção das amilases	58
4	Avaliação do farelo de milho e mandioca como fontes de carbono	
	para a produção das amilases.....	63
5	Caracterização das amilases.....	69
5.1	Efeito do pH sobre a atividade das amilases.....	70

5.2	Efeito da temperatura sobre a atividade das amilases.....	73
5.3	Estabilidade das amilases frente a variações de pH em ausência de substrato	76
5.4	Estabilidade das amilases frente a variações de temperatura em ausência de substrato	79
5.6	Efeito do tempo de armazenamento sobre a estabilidade das enzimas	81
5.7	Estabilidade a 60°C	86
	Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade amilolítica.....	90
5.7.1	Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases	90
5.7.2	Efeito da adição de outros íons à mistura de reação, sobre a atividade das amilases	94
5.8	Avaliação da atividade enzimática em diferentes substratos.....	102
5.9	Identificação dos produtos de hidrólise enzimática do amido solúvel a 1% ao longo do tempo	108
6	Hidrólise do amido de milho e mandioca a 25% para a produção de xarope	113
6.1	Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise do amido a 25%	119
7	Atividade amilolítica em gel de poliacrilamida.....	123
VI	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO PROJETO	125
VII	CONCLUSÕES	126
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Estrutura da amilose.....	5
Figura 2	Estrutura da amilopectina.....	6
Figura 3	Representação esquemática da estrutura da amilopectina e modelo de ação de algumas amilases.....	9
Figura 5	Avaliação da temperatura de crescimento de <i>Rhizomucor pusillus</i> A13.36 em placa de petri.....	50
Figura 6	Produção de amilases por <i>Rhizomucor pusillus</i> A13.36 em fermentação submersa sob diferentes pHs.....	53
Figura 7	Produção de amilases por <i>Rhizomucor pusillus</i> A13.36 em fermentação submersa em pH 6,0, sob diferentes temperaturas.....	62
Figura 8	Produção de amilases por <i>Rhizomucor pusillus</i> A13.36 em fermentação submersa tendo farelo de mandioca e farelo de milho como fonte de carbono em pH 6,0 a 45°C.....	67
Figura 9	Efeito do pH na atividade das amilases.....	72
Figura 10	Efeito da temperatura na atividade das amilases.....	74
Figura 11	Efeito do pH sobre a estabilidade das amilases.....	78
Figura 12	Efeito da temperatura sobre a estabilidade das amilases.....	80
Figura 13	Efeito do tempo de armazenamento sob a estabilidade das enzimas	85
Figura 14	Estabilidade de α -amilase e amilase sacarificante a 60°C	87
Figura 15	Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases.....	92
Figura 16	Efeito da adição de diferentes íons à mistura de reação, sobre a atividade das amilases.....	95
Figura 17	Efeito de diferentes substratos sobre a atividade das amilases	107



LISTA DE TABELAS

Figura 18	Cromatografia descendente em papel whatman dos produtos de hidrólise do amido solúvel a 1%	109
Figura 19	Cromatografia descendente em papel whatman dos produtos de hidrólise do amido de milho a 25%	121
Figura 20	Cromatografia descendente em papel whatman dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 25%	122
Figura 21	Atividade em gel de poliacrilamida	124

Tabela 4	Análise de variância da hidrólise do amido de milho a 25% a 50°C por 1 e duas horas	114
-----------------	---	-----

Tabela 5	Teste de Tukey para as análises dos fatores temperatura, tempo de hidrólise e amido	115
-----------------	---	-----

Tabela 6	Teste de Tukey para as análises dos fatores temperatura e tempo de hidrólise	116
-----------------	--	-----

Tabela 7	Análise de variância da hidrólise do amido de mandioca a 50°C por 1 e duas horas	117
-----------------	--	-----

Tabela 8	Análise de variância da hidrólise do amido de mandioca a 50°C por 1 e duas horas	117
-----------------	--	-----

Tabela 9	Teste de Tukey para análises dos fatores temperatura e tempo de hidrólise, dentro dos blocos amido de milho e mandioca	119
-----------------	--	-----



LISTA DE TABELAS

		Páginas
Tabela 1	Características físico-químicas de amilases produzidas por algumas espécies fúngicas.....	24
Tabela 2	Efeito de íons sobre a atividade de algumas amilases fúngicas.....	99
Tabela 3	Cromatografia líquida dos produtos de hidrólise do amido a 1%.....	111
Tabela 4	Análise de variância da hidrólise do amido de milho e mandioca a 80 e 90°C por 1 e duas horas.....	114
Tabela 5	Teste de Tukey para as médias dos fatores substrato, temperatura e tempo.....	115
Tabela 6	Teste de Tukey para as médias dos fatores temperatura e tempo de hidrólise.....	116
Tabela 7	Análise de variância da hidrólise do amido de milho a 80 e 90°C por 1 e duas horas.....	117
Tabela 8	Análise de variância da hidrólise do amido de mandioca a 80 e 90°C por 1 e duas horas.....	117
Tabela 9	Teste de Tukey para as médias dos fatores temperatura e tempo de hidrólise, dentro dos blocos amido de milho e mandioca.....	119



RESUMO

O amido é, depois da celulose, o polissacarídeo mais sintetizado pelas plantas através da energia solar e constitui a mais importante reserva de carbono das plantas superiores. As amilases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas da molécula de amido, e são divididas em endoamilases, que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula de amido, e as exoamilases, que hidrolisam sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula. As amilases tem sido utilizadas com maior freqüência na indústria alimentícia, no processamento do amido, na etapa de liquefação (α -amilase) e para a produção de xaropes de glicose (glucoamilase). A utilização de amilases termoestáveis na indústria alimentícia é bastante interessante, tendo em vista que a maioria dos processos ocorre à temperaturas elevadas, o que diminui o risco de contaminação por mesófilos e também a viscosidade do meio, dentre outros fatores. Neste trabalho foi avaliada a produção de amilases (α -amilase, amilase sacarificante e glucoamilase) pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus* em fermentação submersa, assim como o efeito do pH inicial de meio de cultivo (4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5), da temperatura (40, 45 e 48°C), do tempo de cultivo do fungo (48 a 144 horas) e do tipo de amido usado (milho e mandioca), na produção das enzimas. Os meios livres de micélio (solução enzimática bruta) foram utilizados para a determinação da atividade das enzimas. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótima de atividade, estabilidade frente às variações de pH e temperatura e tempo de estabilidade a 60°C, além do efeito da adição de diferentes íons sobre a atividade das enzimas. A utilização das enzimas contidas no extrato enzimático bruto, na hidrólise do amido de milho e mandioca a 25%, também foram analisadas. Os resultados mostraram que as maiores taxas de produção das enzimas ocorreram em meio de cultivo com pH inicial 6,0, em temperatura de 45°C. Tanto farelo de milho, quanto farelo de mandioca demonstraram boa capacidade de indução da síntese das enzimas. O pH ótimo de atividade apresentado para atividade dextrinizante de α -amilase foi 4,5, enquanto



que o pH ótimo para a atividade sacarificante foi 5,0. A temperatura ótima para as atividades dextrinizante e sacarificante foi de 75°C, enquanto que a temperatura ótima para a atividade de glucoamilase foi de 70°C. A α -amilase dextrinizante permaneceu estável entre os pHs 3,0 e 4,0, e a amilase sacarificante entre os pHs 5,0 e 6,0. A glucoamilase foi estável entre os pHs 4,0 e 5,0. Quanto à temperatura de estabilidade, a α -amilase e a glucoamilase foram estáveis entre 45 e 60°C, já a amilase sacarificante somente foi estável em 45 e 50°C. A adição de concentrações crescentes de íons Ca^{+2} ao meio de reação, não proporcionou nenhuma mudança na atividade dextrinizante de α -amilase, porém acarretou na perda drástica da atividade de amilase sacarificante e glucoamilase. A análise dos produtos de hidrólise do amido a 1% mostraram que, 96% do amido inicial foi hidrolisado depois de 1 hora sob a ação das enzimas amilolíticas presentes no extrato enzimático, e que o hidrolisado foi composto por glicose, maltose e maltotriose. As enzimas atuaram de forma eficiente na produção de xarope, tanto em amido de milho quanto em amido de mandioca. Altos valores de açúcares redutores foram alcançados utilizando-se o equivalente a 10 U de atividade sacarificante por grama de amido.



ABSTRACT

Starch is, after cellulose, the most synthesized polysaccharide by plants through solar energy and it constitutes the most important carbon reserve of higher plants. The amylases are enzymes capable to hydrolyse the glucosidic linkages from the starch's molecule, and they are divided into endoamylases, that hydrolyse the glucosidic linkages by chance into the starch's molecule, and the exoamylases, that hydrolyse successively the glucosidic linkages by the extremity not reduced of the molecule. The amylases have been used more frequently in the food industry, into starch's processing, at the liquefaction phase (α -amylase) and for the production of glucose syrups (glucoamylase). The using of thermostable amylases in the food industry is very high, because most of the processes occur into high temperatures, which diminishes the risk of contamination by mesophilic and also diminishes the medium culture's viscosity, and other factors. At this work the production of amylases was evaluated (α -amylase, saccharifying and glucoamylase) by the thermophilic fungi *Rhizomucor pusillus* into depthless fermentation, as the medium culture's effect of the initial pH (4,5, 5,0, 5,5, 6,0 and 6,5), the temperature (40, 45 and 48°C), the fungi's cultivation time (from 48 to 144 hours) and the type of starch used (corn and cassava), at the enzymes' production. The medium cultures' free of mycelium (raw enzymatic solution) were used for the determination of the enzymes' activity. The enzymes were characterized into pH and excellent temperature of activity, stability facing pH variations, temperature and stability time at 60°C, and besides the effect of adding different ions at the enzyme's activity. The use of enzymes contained at the raw extract enzymatic, at the hydrolysis of corn and cassava's starch at 25% were also analyzed. The results demonstrated that the biggest taxes of enzymes production occurred at a medium culture with an initial pH of 6,0, at 45°C. Both corn and cassava's brans demonstrated a good capacity of enzymes synthesis' induction. The excellent pH of activity presented for a α -amylase dextrinizing activity was 4,5, while the excellent pH of activity



saccharifying was 5,0. The excellent temperature for the dextrinizing activities was 75°C, while the excellent temperature for the glucoamylase activity was 70°C. The dextrinizing α -amylase remained stable between a pH of 3,0 and 4,0, and the saccharifying amylase between a pH of 5,0 and 6,0. The glucoamylase was stable between a pH of 4,0 and 5,0. About the stability temperature, the α -amylase and the glucoamylase were stable between 45 and 60°C, while the saccharifying amylase was just stable at 45 and 50°C. The adding of elevated concentrations of ions Ca^{+2} at the medium culture of reaction didn't result in any modification at the α -amylase's dextrinizing activity, but also entailed the drastic losing of saccharifying amylase and glucoamylase's activity. The analysis of products of starch's hydrolysis at 1% demonstrated that 96% of the initial starch was hydrolyzed after one hour under the action of amylolytic enzymes presenting at the enzymatic extract, and that the hydrolyzed was composed by glucose, maltose and maltotriose. The enzymes actuated efficiently at the production of syrup, as in corn's starch as in cassava's starch. High contents of reducing sugars were reached using the equivalent of 10U of saccharifying activity by gram of starch.



I - INTRODUÇÃO

O amido é, depois da celulose, o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas através da energia solar. É uma substância composta inteiramente de β -D-glicose e constitui uma fonte de energia essencial para a maioria dos organismos.

As enzimas envolvidas no processo de degradação do amido são chamadas amilases ou enzimas amilolíticas. As amilases podem ser divididas em duas categorias de acordo com seu modo de ação: as endoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula e as exoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPEZ, 1995).

As amilases são responsáveis pela reciclagem do carbono contido nos amiláceos em geral e, além disso, têm exercido um importante papel na indústria de alimentos. Segundo Glazer; Nikaido (1995), além da indústria de alimentos as amilases podem atuar na indústria têxtil, removendo a pasta de amido aplicada ao fio com o objetivo de aumentar a resistência do mesmo a fricção durante o processamento.

As amilases podem atuar também na indústria de papel e também fazer parte da formulação de detergentes. Elas têm sido aplicadas na indústria de papel com o propósito de diminuir a viscosidade da goma de amido aplicada durante o processamento do mesmo, e nas formulações de detergentes para conter em parte a agressividade do mesmo sobre madeiras e porcelanas (GUPTA et al., 2003).



As amilases são derivadas de várias fontes, mas aquelas oriundas de microrganismos têm recebido atenção especial em função de uma série de características que são desejáveis. Microrganismos como fungos, bactérias, leveduras e actinomicetos são potenciais produtores de amilases; porém, as produzidas por fungos e bactérias têm dominado a maioria dos setores da indústria (PANDEY et al., 2000).

Organismos termofílicos crescem otimamente em temperaturas entre 50 e 80°C e produzem enzimas que são ativas em temperaturas entre 60 e 80°C chamadas termozimas e que, em geral, são mais termoestáveis que aquelas produzidas por organismos mesófilos (LEGIN et al., 1997). A atuação dessas enzimas em temperaturas elevadas reduz a viscosidade do meio, permite a hidrólise enzimática em altas concentrações de substratos e diminui os riscos de contaminação por mesófilos (VIEILLE, ZEIKUS, 2001).

Atualmente o mercado mundial de enzimas tem exigido enzimas com características mais adequadas para aplicação na indústria. Dentre essas características, atividade elevada e termoestabilidade estão entre as mais requeridas.

Tendo em vista a importância econômica da obtenção de amilases mais ativas, termoestáveis e com características mais adequadas às indústrias, foi desenvolvido um projeto de pesquisa no qual estudo-se a produção de amilases por uma cepa de *Rhizomucor pusillus* recém isolada em nosso laboratório, buscando-se conhecer as melhores condições de cultivo do fungo para a produção das enzimas,



além do conhecimento das características bioquímicas e das condições ótimas de atuação das enzimas.

II - REVISÃO DA LITERATURA

1- Amido

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza e depois da celulose, é o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas. É uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores, compostas inteiramente de β -D-glicose e constitui também uma fonte de energia essencial para muitos organismos, inclusive o homem. Esse polissacarídeo é facilmente assimilado na dieta humana e representa uma das principais fontes de energia alimentar em todo o mundo, já que é encontrado em grande quantidade no milho, batata, trigo e arroz, que constituem a base da alimentação da maioria das populações.

O amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado, gerando glicose, maltose, e xaropes de oligossacarídeos de menores pesos moleculares, que por sua vez podem ser utilizados para a produção de outros compostos químicos e também como substratos em fermentações (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

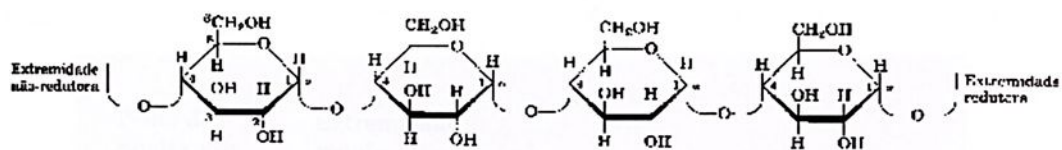
Em função de suas características físico-químicas e tecnológicas esse polímero tem sido usado extensivamente como matéria prima para a formulação de espessantes, estabilizantes, agentes geleificantes, dentre outros, para a melhoria das propriedades de muitos alimentos (DERGAL, 1981).



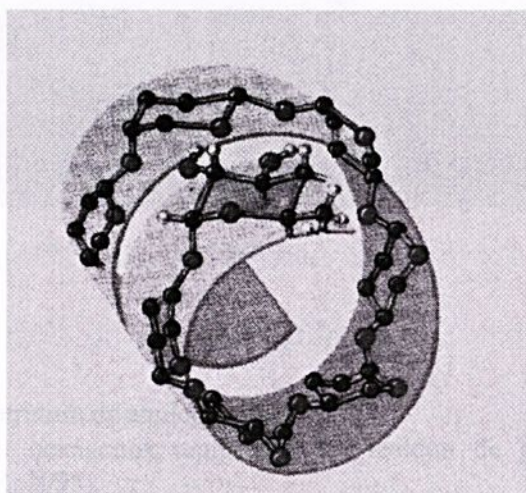
Modificações químicas, físicas e enzimáticas do amido, juntamente com modernos métodos de extração, têm aumentado sua utilização na indústria de alimentos e também em outros setores da indústria; principalmente têxtil, petroquímica, papel e bebidas.

O amido é acumulado nos vegetais na forma de grânulos insolúveis, o quais são compostos basicamente de dois polímeros quimicamente muito semelhantes: a amilose e a amilopectina o que aparecem na proporção média de 25 e 75%, respectivamente.

A amilose (Fig. 1) é essencialmente formada por cadeias lineares helicoidais constituídas de unidades de glicose unidas por ligação glicosídica α -1,4 enquanto que a amilopectina (Fig. 2) é formada por estrutura altamente ramificada, possuindo cadeias de resíduos de glicose em ligação glicosídica α -1,4 das quais partem ramificações com ligações α -1,6 a cada série de 25 resíduos de glicose (LASZLO et al., 1986).



(A)



(B)

Figura 1: Estrutura da amilose

A cadeia linear é composta por D-glicose ligadas por ligações (α 1 $\rightarrow$ 4).

(A) Estrutura da amilose (B) Estrutura helicoidal estreitamente compacta (LEHNINGER, 1995).

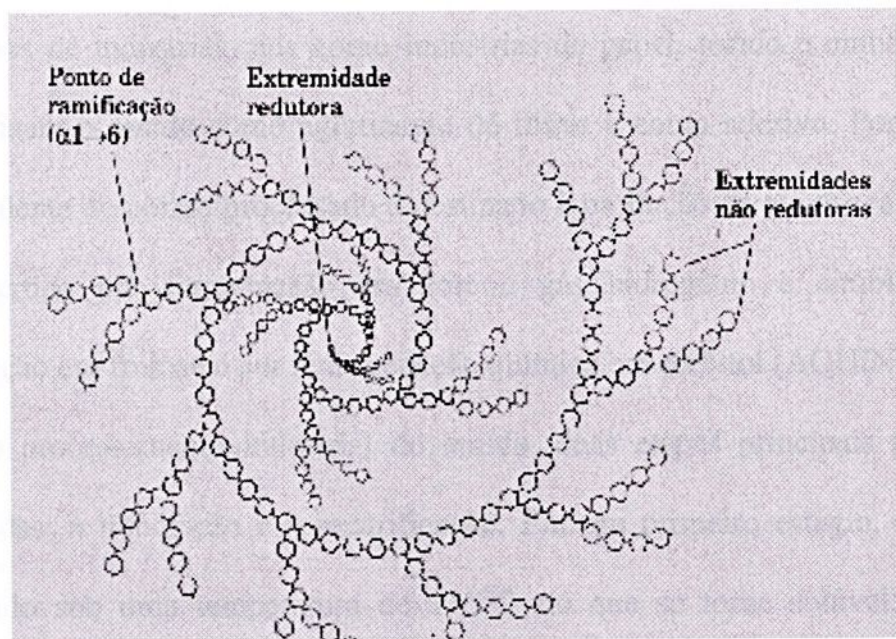


Figura 2: Estrutura da amilopectina.

Cada um dos hexágonos representa um resíduo de glicose.
(LEHNINGER, 1995).

Grande parte do amido produzido é destinada às indústrias de alimentos. Geralmente o amido ajuda na melhoria das propriedades funcionais dos alimentos e suprem a falta de oligossacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPEZ, 1995).

Nas indústrias de alimentos, o amido tem sido empregado na produção de hidrolisados que irão funcionar como adoçantes em refrigerantes e doces, e como espessantes em alimentos semi-sólidos. Parte da produção de amido é utilizada em outros tipos de indústrias, tais como indústrias de papel, tecido e embalagens, as quais utilizam o amido como aglutinante de fibras e como adesivo. Porém, o uso mais freqüente do amido processado é destinado à produção de glicose, a qual pode ser convertida por fermentação em etanol, gás hidrogênio e antibiótico; por isomerização em frutose e por hidrogenação química em sorbitol (AQUINO, 2000).

No processamento industrial do amido, duas etapas principais podem ser identificadas; a liquefação e a sacarificação. Em um primeiro estágio, o amido é gelatinizado sob uma temperatura de 110°C até que se torne solúvel. O amido gelatinizado é submetido ao processo de liquefação que é realizado pela ação de α -amilase termoestável obtida de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, que liberam maltodextrinas com baixo DE (equivalente em dextrose) como produto final (VIHINEM; MÄNTSÄLÄ, 1989). Após a completa liquefação, o material é resfriado a aproximadamente a 60°C para o passo da sacarificação, que consiste na completa transformação do amido liquefeito em glicose que, por isomerização, pode ser convertida em frutose. Nesse processo geralmente utiliza-se glucoamilases de *Aspergillus niger*.

Outras enzimas amilolíticas como β -amilase e pululanases, também podem ser empregadas na sacarificação. Nesse caso o produto final vai consistir em xarope de maltose (GLAZER, NIKAIDO, 1995; HAKI et al., 2003).



2- Enzimas amilolíticas

Amilases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula de amido. São enzimas utilizadas pelas plantas para assimilar o amido que é acumulado em alguns tipos de raízes, por animais para a digestão do amido contido na maioria dos alimentos e por muitos microrganismos procariotos e eucariotos que usam o amido como fonte de carbono (PEIXOTO et al., 2003).

As amilases podem ser divididas em duas categorias quanto ao seu modelo de ação: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula de amido liberando oligossacarídeos e as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula liberando glicose ou maltose (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPEZ, 1995). Um modelo de ação conjunta de algumas amilases sobre o complexo amilolítico é descrito resumidamente na figura 4.



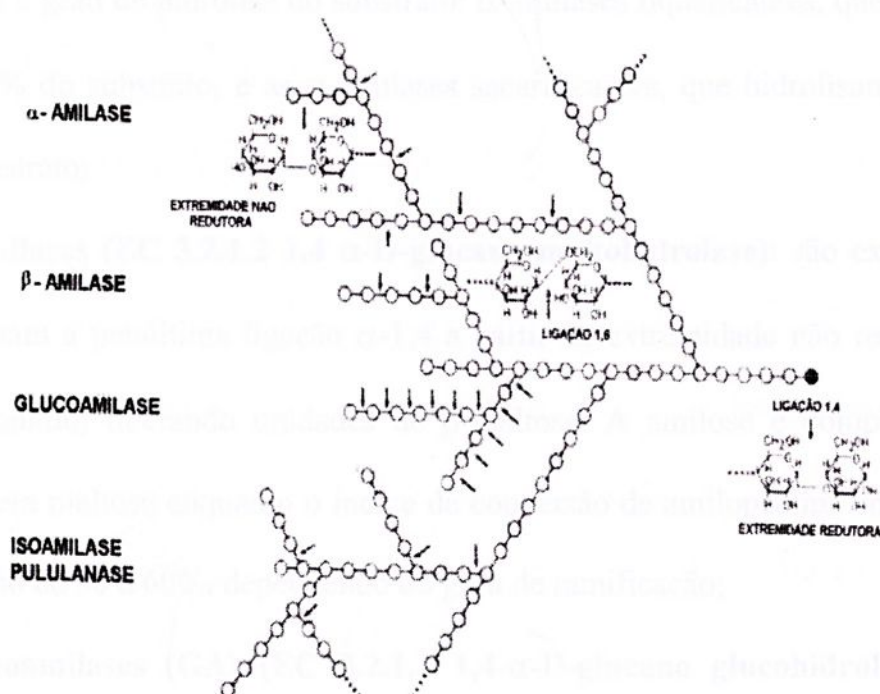


Figura 3: Representação esquemática da estrutura da amilopectina e modelo de ação de algumas amilases (VININHEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

A seguir, são descritas as amilases que atuam na conversão do amido em compostos de baixo peso molecular (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; ANTRANIKIAN et al., 1995):

α -amilases (EC 3.2.1.1 1,4- α -glucano glucanohidrolase): são endoenzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 internas da amilose e amilopectina, liberando oligossacarídeos de cadeias com comprimentos variáveis. São também chamadas de enzimas dextrinizantes e podem ser divididas em duas categorias de

acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases liqueficientes, que quebram de 30 a 40% do substrato, e as α -amilases sacarificantes, que hidrolisam de 50 a 60% do substrato;

β -amilases (EC 3.2.1.2 1,4 α -D-glucano maltohidrolase): são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da cadeia de amido, liberando unidades de β -maltose. A amilose é completamente convertida em maltose enquanto o índice de conversão de amilopectina em maltose gira em torno de 50 a 60%, dependendo do grau de ramificação;

Glucoamilases (GA) (EC 3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glucohidrolase): são exoenzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da molécula de amido. Elas liberam unidades de β -D-glicose a partir da extremidade não redutora do substrato. As glucoamilases são também chamadas de enzimas de sacarificação, pois são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubação por longo tempo;

α -D-glucosidases (EC 3.2.31.20 α -D-glucosídeo glucohidrolase): são enzimas de origem microbiana e hidrolisam as ligações α -1,4 e α -1,6 de oligossacarídeos de cadeia curta, os quais são formados pela ação de outras amilases, liberando unidades de α -D-glicose a partir da extremidade não redutora;

Exo-(1,4)- α -D-glucanases (EC 3.2.1.60 / 3.2.1.98): são exoamilases que ao invés de liberar sucessivas unidades de maltose, como ocorre com a β -amilase,



liberam, por exemplo, maltotetraose e maltohexaose como os maiores produtos da ação da enzima sobre o amido;

Pululanases (EC 3.2.1.41 α -dextrina-6-glucanohidrolase): são enzimas que hidrolisam as ligações α -1,6 do pululano e de outros oligossacarídeos. O produto dessa hidrólise corresponde as maltotrioses;

Isopululanases (EC 3.2.1.57 pululano-4-glucanohidrolase): são enzimas que hidrolisam também as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, mas que não tem nenhuma atividade sobre o amido. O produto final da ação dessas enzimas é a isopanose;

Isoamilases (EC 3.2.1.68 glicogênio-6-glucanohidrolase): hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos, mas não hidrolisam a ligação α -1,6 do pululano;

Ciclomaltodextrina D-glucotransferase (CGTase) (EC 2.4.1.19 1,4- α -D-(1,4-D-Glucano) transferase): são exoenzimas que hidrolisam o amido por meio de reações complexas formando oligossacarídeos cíclicos não redutores, conhecidos como ciclodextrinas.

As amilases encontram-se bem distribuídas na natureza. São responsáveis pela ciclagem do carbono contido nos amiláceos em geral e, além disso, têm exercido, ultimamente, um papel importante na indústria de alimentos, na qual atua nas seguintes conversões:



- 1- Na conversão do amido em dextrinas, que são utilizadas em formulações clínicas, como material para sacarificação enzimática, estabilizadores e espessantes;
- 2- Na conversão do amido em maltose, que é utilizada em confeitarias, na fabricação de refrigerantes, cervejas, geléias e sorvetes;
- 3- Na conversão do amido em glicose, utilizada em refrigerantes, panificação, cervejarias e como subsídio para a produção de etanol e outros bioprodutos;
- 4- Na conversão em frutose, utilizada em refrigerantes, geléias e iogurtes.

A utilização dessas enzimas no processamento de alimentos tem sido muito vantajosa, pois além do rendimento ser semelhante ou maior do que o do processamento químico, não há formação de compostos não desejados. Além disso, as enzimas amilolíticas têm a vantagem de catalisar reações sob condições moderadas, além de serem naturais e não tóxicas. Essas capacidades as tornam imprescindíveis para a indústria de alimentos, além de que, as maiores das enzimas são ativas em baixas concentrações (FENNEMA, 1985).

Além da indústria alimentícia, as amilases podem ser usadas na indústria têxtil para remover a pasta de amido aplicada ao fio com o objetivo de aumentar a resistência do mesmo à fricção durante o processamento (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

As amilases têm ganhado um papel importante na conversão do amido em álcool utilizando-se simultaneamente a sacarificação e a fermentação (SINGH et al. 1995; KOBAYASHI et al. 1998). A aplicação das amilases na produção de álcool etanol tem solucionado em parte os problemas que alguns países apresentam em



função da escassez de reservas de combustível. Nesse processo, glucoamilases e α -amilases de *A. niger* são adicionadas em meio fermentativo contendo células de *Saccharomyces cerevisiae*. O amido presente no meio fermentativo é convertido, através da ação conjunta das amilases, em glicose que posteriormente é convertida por fermentação em etanol (RAJOKA et al., 2004).

As amilases, mais especificamente a α -amilase, têm sido usada na indústria papelreira com o propósito de diminuir a viscosidade da goma de amido que é empregada sobre o papel durante o processamento do mesmo. Ação da α -amilase sobre a camada de amido utilizada no revestimento do papel também contribui para a sua qualidade final (GUPTA et al., 2003).

Atualmente, as α -amilases têm sido utilizadas nas formulações de detergentes líquidos para reduzir em parte, a agressividade dos detergentes sobre madeiras e porcelanas (GUPTA et al. 2003). Segundo Kottwitz e outros (1995), 90% dos detergentes líquidos contêm α -amilase em suas formulações. Algumas limitações do uso de α -amilases na composição dos detergentes consistem no fato de que, a maioria dessas enzimas demonstra sensibilidade ao cálcio e sua estabilidade pode ser severamente comprometida em baixas concentrações desse íon, e também na presença de alguns agentes oxidantes (GUPTA et al., 2003).



3- Amilases fúngicas

A utilização de fungos em processos cujos produtos são comercialmente importantes tem aumentado com o passar das décadas. A utilização desses microrganismos pelo homem não é um fenômeno recente, pois se sabe, que desde a época dos antigos egípcios já se fazia o uso desses organismos em processos fermentativos para a produção de bebidas alcoólicas (PAPAGIANNI, 2004).

Os fungos em geral podem ocupar muitos diferentes ambientes como solos, materiais orgânicos em decomposição, plantas, dentre outros. Essa diversidade de ambientes, evolutivamente garantiu a esses organismos a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características, possibilitando-lhes o uso da matéria orgânica do meio como fonte de carbono (GOUKA et al., 1997).

Nas últimas décadas, a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de inúmeras enzimas com características físico-químicas variadas e com excelentes potenciais para a aplicação industrial. A capacidade de síntese em grande escala, bem como a facilidade com que são excretadas para o meio externo constituem algumas dessas características (IWASHITA, 2002). Dentre essas inúmeras enzimas, as amilases aparecem como uma das mais importantes.

As amilases são derivadas de várias fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos. Microrganismos como fungos, bactérias, leveduras e actinomicetos são potenciais produtores de amilases; porém as produzidas por fungos e bactérias têm dominado a maioria do setor industrial (PANDEY et al., 2000).



Tradicionalmente, as amilases são produzidas por fermentação líquida, mas nos últimos anos, o processo de fermentação em estado sólido tem sido utilizado com maior frequência visando um maior volume de produção e diminuição de custos (LONSANE et al., 1990; PANDEY, 1992; ELLAIAH et al., 2002).

Dentre as amilases sintetizadas por fungos, as α -amilases e as glucoamilases são as que aparecem com maiores frequências. A α -amilase é produzida por muitos gêneros de fungos filamentosos e leveduras. As α -amilases produzidas por algumas bactérias; *Bacillus* sp, *B. amyloliquefaciens* e *B. liqueniformes*, com aplicação comercial, são hoje preferidas em relação àquelas produzidas por fungos e leveduras, por apresentar algumas características desejáveis, tais como a termoatividade e a termoestabilidade, podendo assim ser aplicada em processos que ocorrem em altas temperaturas (PANDEY, 2000). Entretanto, α -amilases bacterianas não apresentam a capacidade sacarificante de algumas α -amilases fúngicas. Assim, parece ser necessária a produção de enzimas fúngicas que apresentem termoestabilidade semelhante àquelas das bactérias.

As glucoamilases são caracterizadas como exoenzimas que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio pela hidrólise de ligações do tipo α -1,4 por meio da remoção de sucessivas unidades de glicose. Estas enzimas são oriundas de várias fontes como plantas, animais e microrganismos em geral e catalisam eficientemente a reação de sacarificação do amido dentro de um limite estreito de temperatura, isto porque a



conformação cataliticamente ativa das glucoamilases hoje usadas na indústria é alterada com o aumento da temperatura o que afeta seu uso no processo industrial, onde a conservação prolongada em altas temperaturas é necessária.

As glucoamilases comercialmente disponíveis são, em sua maior parte, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*. As glucoamilases de *Aspergillus* são mais termoestáveis, com atividade máxima em temperaturas entre 50 e 55°C, sendo elas rapidamente inativadas em temperaturas próximas de 60°C (ZAHA e ZEIKUS, 1989).

Além da capacidade de produção em alta escala, algumas espécies de *Aspergillus* podem sintetizar mais de uma forma da mesma enzima com características desejáveis diferenciadas, comparadas com aquelas sintetizadas por bactérias com características e propriedades únicas (KUMAR, 2004).

Espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* secretam consideráveis quantidades dessas enzimas, no entanto, as glucoamilases produzidas por *A. niger* e *A. oryzae*, têm recebido muita atenção em função de alta produtividade, constituindo assim as mais importantes fontes comerciais de dessas enzimas (GOTO et al., 1998).

Além de espécies do gênero *Aspergillus*, outras espécies de outros gêneros como *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* e *Thermomyces*, dentre outros aparecem na literatura como potenciais produtores de amilases, com destaque para a produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* DAR 2710, *R. microsporus*, *Rhizopus* sp, *Mucor pusillus*, *Thermomucor*, *Humicola grisea*, *Thermomyces lanuginosus* e *T.*



lanuginosus ATCC 34626 (JIN et al., 1999; PEIXOTO et al., 2003; CRUZ et al., 1997; SOMKUTI & STEINBERG, 1980; KAUR & SATYANARAYANA, 2004; TOSI et al., 1993, MISHRA & MAHESHWARI, 1996 e NGUYEN et al., 2000, respectivamente).

Os fungos unicelulares, mais conhecidos por leveduras, assim como os fungos filamentosos, estão espalhados pelos mais diversos ecossistemas. Essa diversidade de ambientes habitados por esses microrganismos tem possibilitado aos pesquisadores o isolamento de espécies com características desejáveis para a indústria (SKORUPA et al., 2002). A capacidade de degradação do amido por algumas espécies de leveduras tem sido determinante para sua aplicação em processos biotecnológicos como fontes de enzimas hidrolíticas para a produção de etanol (DE MOT, 1984).

A produção de enzimas amilolíticas por leveduras, não tem recebido muito destaque em função do pequeno volume em que são excretadas, embora se saiba que estas enzimas são produzidas pela maioria das espécies. Dentre aquelas conhecidas como produtoras de amilases ganham destaque; *Schwanniomyces alluvius*, *Lipomyces kononenkoae*, e *Cryptococcus flavus* (WILSON et al., 1982; PRIETO et al., 1995 e SKORUPA et al., 2002, respectivamente).

A deficiência de produção em alta escala tem sido suprida nos últimos anos através do amplo conhecimento em biologia molecular, juntamente com a elaboração e aplicação de novas técnicas de DNA recombinante em algumas espécies de levedura (SHIRAGA et al., 2004; MOLLER et al., 2004).



4- Produção e características de amilases fúngicas

Com o intuito de viabilizar economicamente a hidrólise do amido, vários fungos com excelente potencial para produção de amilases tem sido isolados nos últimos anos. Alguns trabalhos têm reportado a produção de diferentes tipos de amilases fúngicas termoestáveis e termotolerantes, com características físico-químicas variadas e viáveis para a aplicação em bioprocessos.

Somkuti e Steinberg (1980) estudaram as características físico-químicas de uma α -amilase extracelular produzida por *M. pusillus*, em fermentação líquida, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono a 34°C. A enzima apresentou um pH ótimo de atividade entre 3,5 e 4,0, uma atividade ótima em 70°C. A mesma enzima foi inibida na presença de 10 mM de íons Mg^{+2} , Ca^{+2} e Cu^{+2} .

Uma glucoamilase produzida por um mutante de *A. terreus* (NA170) foi purificada e caracterizada por Ghosh e colaboradores (1991). A enzima apresentou um pH ótimo de atividade de 5,0 e permaneceu estável em pHs que variaram de 3,0 a 7,0. A temperatura ótima para a atividade da enzima foi de 60°C. Essa mesma enzima foi estável em temperaturas entre 30 e 75°C.

Ali e Hossain (1991) purificaram e caracterizaram uma glucoamilase de *A. terreus*. A enzima foi otimamente ativa em pH 4,0 e estável em pHs de 3,0 a 7,0. A temperatura ótima de atividade da enzima foi de 60°C, permanecendo estável em temperaturas entre 40 e 60°C. Os íons Ag^{+} e Hg^{+2} inibiram a atividade da enzima,



por outro lado, a presença de íons Mg^{+2} e Ca^{+2} estimularam a atividade da enzima em 15 e 7%, respectivamente.

Uma α -amilase de *A. oryzae* produzida em fermentação submersa, em meio contendo glicose como fonte de carbono, a 30°C, foi caracterizada por Carlsen e outros (1996). O pH ótimo para a atividade da enzima foi 6,0, e esta permaneceu estável dentro de uma faixa de pH entre 5,0 e 7,0. A temperatura ótima, bem como a temperatura de estabilidade não foram mencionadas.

A relação entre fontes de carbono, produção e ação de α -amilase de *Rhizopus* sp foram analisadas por Cruz e outros (1997). A enzima foi produzida por fermentação submersa, em meio de cultivo com pH inicial 5,0. A temperatura de cultivo foi de 30°C. Foram utilizados como substratos; amido solúvel, amilose de milho, amilose de batata, amilopectina de milho, amilopectina de batata e maltose. Foi obtida a seguinte ordem decrescente na produção da enzima: amilose de milho > amilose de batata > amilopectina de milho > amilopectina de batata > amido solúvel > maltose.

Mohapatra e colaboradores (1998) caracterizaram uma α -amilase de *Mucor* sp. A enzima foi produzida em fermentação submersa, com a melhor produção ocorrendo em pH inicial de meio de cultivo 5,0, a 30°C. A enzima foi otimamente ativa em pH 5,0 e em temperatura de 60°C. A enzima parcialmente purificada apresentou, depois de incubada a 60°C durante 50 minutos, 50% de atividade



residual. A atividade da enzima não foi alterada na presença de 10 mM de Ca^{+2} e 25 mM de Mg^{+2} .

Goto e colaboradores (1998) analisaram a produção de amilases por *A. fumigatus*, em fermentação submersa. Neste trabalho foram avaliados os efeitos de diferentes valores de pH inicial de meio de cultivo e temperatura de cultivo sobre a produção das enzimas. Meios de cultivos com pHs acima de 4,0 e abaixo de 10 foram considerados viáveis para a produção das enzimas. A melhor temperatura de cultivo foi de 45°C.

Uma elevada produção de α -amilase (55,0 U/mL) foi obtida em 14 horas de cultivo por Jin e outros (1998), cultivando o fungo filamentoso *A. oryzae* em fermentação submersa. O pH inicial de meio de cultivo mais adequado para a produção da enzima foi 5,0 e a melhor temperatura de cultivo foi 35°C.

Em outro trabalho, Jin e colaboradores (1999) analisaram a produção de glucoamilase por *A. oryzae* em fermentação submersa. Um pH inicial de 4,5 foi considerado ideal para a produção de glucoamilase por esta linhagem. A melhor temperatura para a produção da enzima foi 35°C.

Moreira e outros (1999) avaliaram a produção e as características de α -amilase e glucoamilase de *A. tamari*. Neste trabalho foram avaliadas as melhores condições para a produção das enzimas, tais como fontes de carbono, pH inicial de meio de cultivo, temperatura e também foram determinadas as características físico-químicas de cada enzima. Foram utilizadas como fontes de carbono: sacarose, celobiose, glicose, maltose, glicogênio, amido, amilopectina e amilose. Glicogênio,



maltose, amido, amilose e amilopectina foram as fontes de carbono que melhor induziram a síntese das enzimas. Valores de pHs iniciais de meio de cultivo entre 4,0 e 10,0 foram considerados ideais tanto para crescimento quanto para produção das enzimas e a melhor temperatura de crescimento e produção foi 30°C. Ambas enzimas apresentaram atividade máxima em pHs entre 4,5 e 6,0 e foram estáveis em pHs entre 4,0 e 7,0. As enzimas exibiram ótima atividade em temperaturas entre 50 e 60°C e permaneceram estáveis por mais de 10 horas a 55°C.

Em um trabalho de isolamento de linhagens fúngicas amilolíticas, Ronaszek e colaboradores (2000) isolaram 18 espécies de *T. lanuginosus* com grande potencial para a produção de α -amilase e glucoamilase. Três dessas linhagens foram selecionadas para um estudo mais detalhado de produção e de algumas propriedades dessas enzimas. A maior atividade de α -amilase foi de 46 U/mL e a melhor produção de glucoamilase foi de 1,0 U/mL. O melhor pH de atividade para α -amilase foi 5,0 e o melhor pH para atividade de glucoamilase foi 4,6. A temperatura ótima de atividade para as duas enzimas foi de 70°C. O efeito da adição de íons Ca^{+2} sobre a atividade de α -amilase foi investigado, e os resultados mostraram um aumento na atividade da enzima de quase 100%, quando 75 mM do íon foi acrescentado ao meio de reação.

Nguyen e colaboradores (2002) purificaram e caracterizaram uma α -amilase e uma glucoamilase de *T. lanuginosus* ATCC 34626. As enzimas foram produzidas em fermentação submersa em 48 horas a 47°C. A α -amilase apresentou um pH



ótimo de atividade de 5,5, enquanto que o pH ótimo de atividade para a glucoamilase foi de 5,0. A temperatura ótima para a atividade de ambas as enzimas foi de 70°C. A presença de íons Zn^{+2} inibiu fortemente a atividade de ambas as enzimas, e por outro lado, a presença de íons (Mn^{+2} , $Fé^{+2}$) e (Ca^{+2} , Ba^{+2}) ocasionaram um aumento na atividade de glucoamilase e α -amilase, respectivamente.

Ellaiah e colaboradores (2002) otimizaram a produção de glucoamilase por *Aspergillus* sp A3, em fermentação sólida. Fatores como; quantidade de substrato, temperatura de cultivo, pH inicial de meio de cultivo, e tempo de cultivo foram analisados neste trabalho. A maior produção enzimática ocorreu em meio de cultivo com pH inicial 5,0 em temperatura de 30°C, em 120 horas de cultivo.

Peixoto e colaboradores (2003) avaliaram a produção de amilases por *R. microsporus* var. em fermentação líquida. Várias fontes de carbonos foram testadas e dentre elas, glicose, maltose, amido solúvel, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar demonstraram excelente capacidade para indução da síntese da enzima. A enzima caracterizada apresentou pH ótimo de atividade 5,0 e temperatura ótima de 60°C. Os produtos de hidrólise enzimática do amido solúvel sugerem a presença de glucoamilase no extrato enzimático.

Soni e colaboradores (2003) avaliaram a produção de glucoamilase por *Aspergillus* sp AS-2 em fermentação sólida. A enzima caracterizada apresentou um pH ótimo de 6,0 e uma temperatura ótima de atividade de 50°C. Neste trabalho



também foi avaliado o efeito da ação dessa enzima na hidrólise do amido a 15%. Essa enzima apresentou uma eficiência de 87% na sacarificação do amido.

Wanderley e colaboradores (2004) caracterizaram uma α -amilase de *Cryptococcus flavus*. A enzima produzida em fermentação submersa a 25°C apresentou pH ótimo de atividade em 5,5 e temperatura ótima em 50°C. A enzima permaneceu estável por 60 minutos a 50°C, e foi inibida na presença dos íons Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} e Cu^{+2} .

A produção de glucoamilase pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae*, em fermentação submersa foi avaliada por Kaur e Satyanarayana (2004). O melhor pH inicial de meio de cultivo para a produção da enzima foi 7,0 e a melhor temperatura de meio de cultivo foi 40°C. A enzima foi capaz de hidrolisar 65% do amido depois de um período de incubação de 48 horas. A atividade enzimática foi inibida pelos íons Ni^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} e Mg^{+2} , mas por outro lado foi constatado um aumento de atividade na presença dos íons Ca^{+2} , Ag^{+} , Cu^{+2} , Co^{+2} e Fe^{+2} .

Na tabela 1, é feita uma síntese de alguns tipos de amilases fúngicas e suas respectivas características.



Tabela 1- Características físico-químicas de amilases produzidas por algumas espécies fúngicas

Fungo	T (°C) Crescimento	pH ótimo	pH Estabilidade	T (°C) ótima	T (°C) Estabilidade	Tipo Amilase	Referência
<i>Mucor pusillis</i>	34	3,5-4,0	ND	70	60-65	α-amilase	SOMKUTI & STEINBERG (1980)
<i>Aspergillus terreus</i> (CTC 826)	ND	4,0	3,0-7,0	60	40-60	Glucoamilase	ALI & HOSSAIN, (1991)
<i>Aspergillus terreus</i> (NA 170)	45	5,0	3,0-7,0	60	30-75	Glucoamilase	GHOSH et al., (1991)
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	6,0	5,0-7,0	ND	ND	α-amilase	CARLSEN et al., (1996)
<i>Mucor sp</i>	30	5,0	ND	60	55-60	α-amilase	MOHAPATRA et al., (1998)
<i>Aspergillus tamaraii</i>	30	4,5-6,0	4,0-7,0	50-60	50-65	Glucoamilase α-amilase	MOREIRA et al., (1999)

Continuação da tabela 1

Fungo	T (°C) Crescimento	pH ótimo	pH Estabilidade	T (°C) ótima	T (°C) Estabilidade	Tipo Amilase	Referência
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	ND	4,6 5,0	ND	70	ND	Glucoamilase α -amilase	RONASZEK et al., (2000)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (ATCC 34626)	47	5,0 5,5	5,0-7,5 5,5-9,0	70	45-55	Glucoamilase α -amilase	NGUYEN et al., (2002)
<i>Rhizopus microsporus</i> var.	45	5,0	2,5-7,0	60	ND	Glucoamilase	PEIXOTO et al., (2003)
<i>Aspergillus</i> sp. AS-2	32	6,0	ND	50	ND	Glucoamilase	SONI et al., (2003)
<i>Cryptococcus flavus</i>	25	5,5	ND	50	50	α -amilase	WANDERLEY et al., (2004)

5- Microrganismos termofilicos

Os microrganismos apresentam uma surpreendente capacidade de adaptar-se a ambientes extremos, onde fatores como temperatura, pH, pressão e concentração de sal ultrapassam valores considerados padrão para a grande maioria dos organismos (LASA; BERENGUER, 1993). Dentre esses fatores, a temperatura exerce grande influência no funcionamento das moléculas e demais estruturas biológicas.

Os microrganismos apresentam uma temperatura mínima de crescimento, abaixo da qual não ocorre o seu crescimento, uma temperatura ótima, na qual o crescimento é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual o crescimento não é possível e ocorre morte celular por colapso da membrana citoplasmática e desnaturação de proteínas e DNA. Cada microrganismo apresenta uma temperatura de crescimento característica, mas essa não é completamente fixada, uma vez que estas temperaturas podem ser alteradas por diversos fatores ambientais, como a composição do meio de crescimento (BROCK et al., 1998).

Sabe-se que a maioria dos microrganismos cresce dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, existem microrganismos que são capazes de proliferar em ambientes que são caracterizados como extremos de temperatura, que em princípio inviabilizaria qualquer existência de forma de vida. São conhecidos vários microrganismos que não só resistem a ambientes geotérmicos estáveis, mas que dependem de altas temperaturas para sua sobrevivência. Esses microrganismos são chamados de termofilicos ou termófilos (BROCK, 1985).



Segundo Brock (1985), os microrganismos termofilicos foram arbitrariamente divididos em três classes: *moderadamente termofilicos*, com crescimento ótimo entre 45 e 60°C; *extremamente termofilicos*, com crescimento entre 60-95°C; e *hipertermofilicos*, cujo crescimento ótimo está acima de 90°C.

Dentre os eucariotos, apenas algumas espécies de fungos são capazes de crescerem em temperaturas entre 45 e 55°C. A termofilia em eucariotos não é tão extrema quanto aquela observada em alguns grupos de procariotos, como por exemplo, as eubactérias e a maioria das archaeobactérias, as quais podem crescer em temperaturas que ultrapassa os 100°C (MAHESHWARI et al., 2000).

Microrganismos termofilicos são encontrados na natureza somente em alguns poucos ambientes cujas temperaturas são elevadas, como solos completamente expostos à luz solar, nos quais a temperatura pode chegar a 50°C e em pilhas de material vegetal em decomposição, onde a temperatura geralmente atinge 60-65°C. Por outro lado, os microrganismos hipertermofilicos somente podem ser encontrados em ambientes em que as temperaturas sejam ainda mais elevadas, como ocorrem em ambientes relacionados a fenômenos vulcânicos e fontes termais (VIEILLE e ZEIKUS, 2001). A condição de hipertermofilia não é aplicada aos fungos, visto que os mesmos, por serem organismos eucariotos, são menos resistentes às elevadas temperaturas em função do sistema de membranas que compõe suas organelas, serem susceptíveis ao desarranjo provocado pelo calor (BROCK, 1998).

Os organismos termofilicos e hipertermofilicos apresentam algumas adaptações que permitem o seu crescimento sob altas temperaturas. Suas enzimas e



outras proteínas são muito mais estáveis ao calor que aquelas presentes nos organismos mesofílicos e atuam otimamente sob altas temperaturas (PELCZAR et al., 1996).

As adaptações desses organismos a condições ambientais extremas os obrigaram a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para tais condições. Assim, hoje é geralmente aceito que esses microrganismos constituem um precioso reservatório de moléculas de interesse industrial, e um excelente recurso para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas, que venha revolucionar o nosso cotidiano e também contribuir para o avanço do conhecimento da sociedade científica (SANTOS et al, 2001).

Vários microrganismos termofílicos tem sido isolados de diferentes ambientes exóticos em todo o planeta, com subsequente extração de suas enzimas (ANTRANIKIAN et al., 1987; GROBOILLOT, 1994; BHARAT; HOOONDAL, 1998; KOHILU et al., 2001).

As enzimas provenientes de microrganismos termofílicos têm sido estudadas com grande frequência, visto que suas aplicações em bioprocessos são extremamente vantajosas, além atuarem como modelos para muitos estudos bioquímicos.

6- Enzimas termofílicas

As enzimas que possuem a capacidade de catálise em altas temperaturas são denominadas termozimas ou enzimas termofílicas e são produzidas por microrganismos termofílicos e hipertermofílicos (VIEILLE & ZEIKUS, 1996).



A maioria das enzimas utilizadas como catalisadores em processos envolvendo a biotransformação são oriundas de organismos mesófilos e, apesar das inúmeras vantagens apresentadas, a aplicação dessas enzimas tem sido limitada devido ao seu limite de estabilidade a temperaturas, pH e forças iônicas extremas (HOUGH e DANSON, 1989). Muitas pesquisas indicam que poucas enzimas estáveis são produzidas por mesófilos e que enzimas produzidas por microrganismos termofílicos são mais estáveis do que aquelas produzidas por mesofílicos (LEGIN et al., 1997).

Enzimas sintetizadas por termofílicos e hipertermofílicos são termoestáveis, exibem desnaturação proteica irreversível somente em altas temperaturas, além de atuarem otimamente em temperaturas elevadas (BRUINS et al., 2001). Essas características as possibilitam para utilização em vários processos industriais em substituição àquelas de mesofílicos e, além disso, essas enzimas, particularmente aquelas que são ativas e estáveis em torno de 100°C, são usadas para estudos em adaptação proteica a altas temperaturas, contribuindo assim para um melhor entendimento de termoestabilidade das proteínas em geral (D'AURIA et al., 1998).

Além da estabilidade, as termozimas, quando utilizadas em processos a altas temperaturas, são mais resistentes a desnaturantes químicos como solventes e a altas concentrações de sais. A utilização dessas enzimas em altas temperaturas reduz a viscosidade dos substratos fluídos, facilitando o bombeamento, filtração e centrifugação além de permitir o uso de menor quantidade de água, o que por consequência reduziria custos de produção em um bioprocessos.



Muitos estudos têm sido desenvolvidos para o entendimento da termoestabilidade e alguns deles mostraram que várias enzimas termoestáveis apresentam algumas diferenças na seqüência de aminoácidos, quando comparadas a uma enzima que catalisa a mesma reação em um mesófilo e que essas diferenças foram determinantes para o processo de adaptação de termófilos a altas temperaturas (HANEY et al., 1999; GROMIHA, 2001; ZAVALA et al., 2002).

A termoestabilidade de proteínas de hipertermófilos é também aumentada em função de um maior número de pares iônicos (ligações iônicas entre cargas negativas e positivas de vários aminoácidos) e pelo empacotamento dos interiores hidrofóbicos das proteínas, que normalmente resistem à desnaturação no meio aquoso (MADIGAN, 2003).

A termoestabilização enzimática também está relacionada com o número de interações de estabilização nas dobras da proteína. Pontes de hidrogênio e pontes dissulfetos podem estabilizar proteínas, aumentando a rigidez de sua conformação (BRUINS et al., 2001).

7- Amilases termofílicas

As amilases termofílicas são enzimas sintetizadas em sua maioria por microrganismos termofílicos e apresentam as características diferenciadas, típicas das termozimas.

Dentre todas as amilases aquelas produzidas por procariotos, em particular alguns grupos de archaeobacterias, estão entre as que apresentam temperaturas de



atividade e estabilidade mais elevadas, com destaque para as amilases produzidas por *Pyrococcus furiosus*, *P. woesei* e *Thermococcus aggregans* com atividades ótimas em temperaturas por volta dos 100°C (LADERMAN et al, 1993; KOCH et al, 1991 e CANGANELLA et al., 1994, respectivamente).

As amilases termofílicas sintetizadas por fungos apresentam temperaturas de atividades e estabilidades inferiores às aquelas termofílicas sintetizadas por alguns grupos de bactérias, mas com excelente potencial para aplicação industrial. Dentre as amilases termofílicas que atuam no complexo amilolítico, as α -amilases e glucoamilases são produzidas por uma imensa variedade desses microrganismos (JENSON et al., 1988; RAMASESH et al., 1982; CEREIA et al., 2000; NGUYEN et al., 2002; KAUR & SATYANARAYANA, 2004;).

As amilases produzidas por *T. lanuginosus* e *T. lanuginosus* ATCC 34626 apresentaram temperatura ótima de atividade a 70°C (RONASZEK et al., 2000; NGUYEN et al., 2002). Essa mesma temperatura foi caracterizada para a atividade de glucoamilase de *T. lanuginosus* (BASAVESWARA et al., 1981; LI et al., 1998). Ali e Hossain (1991) determinaram a atividade ótima de glucoamilase de *A. terreus* em 60°C. A mesma temperatura de atividade foi determinada para atividade de α -amilase de *T. lanuginosus* (JENSON e OLSEN, 1988). Uma enzima amilolítica produzida por *R. microsporus* var. apresentou máxima atividade em 65°C (PEIXOTO et al., 2003). A mesma temperatura foi caracterizada para uma enzima amilolítica produzida por *T. lanuginosus* (MISHRA e MAHESHWARI, 1996).



As amilases termofílicas mais utilizadas industrialmente são aquelas envolvidas no processamento do amido, o qual envolve temperaturas elevadas e a maioria dos produtos obtidos a partir dele são destinados à indústria alimentícia, que tem se expandido substancialmente nos últimos anos, em função da exigência do mercado consumidor emergente.



III – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Estudar a produção de amilases pelo fungo filamentoso *Rhizomucor pusillus* A13.36, por fermentação submersa, utilizando meio semi-sintético;
- 2) Avaliar os efeitos do pH inicial dos meios de cultivos, da temperatura e do tempo de incubação sobre a produção das amilases;
- 3) Avaliar a produção das enzimas em meio à base de resíduo de processamento de mandioca e milho
- 4) Estudar as características bioquímicas das enzimas produzidas
- 5) Estudar o efeito das enzimas quando aplicadas na hidrólise do amido para a produção de xarope de glicose



IV - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microrganismo

Foi utilizado o fungo *Rhizomucor pusillus* A13.36 da coleção do laboratório de Bioquímica e Microbiologia do IBILCE/UNESP, o qual foi isolado a partir de amostra de solo de plantação de mandioca (RABALHO, 2002). A preservação da cultura está sendo feita por manutenção em óleo mineral, sob refrigeração.

2- Meios de cultivo

2.1- Meios para manutenção da cultura selecionada

A cultura do fungo foi mantida em meio de PDA (potato dextrose agar) acrescido de 0,5% de amido solúvel.

2.2- Meios para a produção das enzimas

2.2.1- Meios para avaliação dos efeitos de parâmetros físico-químicos sobre a produção das enzimas

Para os estudos dos efeitos do pH, temperatura e tempo de cultivo, foi utilizado o meio de cultivo composto por 0,1% de KH_2PO_4 , 0,7% de K_2HPO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,14% de $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$, 0,2% de extrato de carne, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de peptona, 0,05% de solução de micronutrientes (5 mg/L de FeSO_4 , 1,6 mg/mL de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg/L de CoCl_2) e 1% de amido solúvel.



2.2.2- Meios alternativos para produção das enzimas

Para esses ensaios foi utilizado o meio (item 2.2.1) substituindo-se o amido solúvel comercial por 1% de farelo de mandioca e farelo de milho, obtidos do processamento de mandioca e do resíduo da extração de gérmen, respectivamente, cujos procedimentos são descritos a seguir.

2.2.2.1- Processamento da mandioca

O processamento da mandioca foi realizado com o intuito de se obter substrato para uso nas fermentações como fonte alternativa de carbono.

A mandioca utilizada no processamento foi adquirida no comércio local. No laboratório, as raízes foram lavadas, descascadas, picadas e trituradas em liquidificador doméstico. A polpa obtida foi lavada por várias vezes com água destilada até a completa remoção do caldo (leite de amido). Uma prensa e um tecido de algodão poroso foram usados para separar a parte sólida da água de lavagem (manipueira).

A polpa sólida restante foi submetida a secagem em estufa a 50°C, durante 4 horas. Em seguida, a polpa seca foi triturada e peneirada (malha granulométrica de 2,5 mm), separando-se o farelo (granulometria $\geq 2,5$ mm) da farinha (granulometria $< 2,5$ mm). O farelo foi então utilizado nas fermentações como fonte de carbono alternativa.

2.2.2.2- Resíduos de milho



Foi considerado resíduo de milho toda a fração disponível após o processamento dos grãos após a maceração e retirada do gérmen. O material foi fornecido pelo departamento de Engenharia de Alimentos do IBILCE/UNESP. É importante ressaltar que o material em questão não constitui um resíduo descartado pelas indústrias de processamento de amido, pois trata-se de um material rico em amido, fibras e proteínas.

O resíduo foi filtrado e a fração sólida foi submetida à secagem em estufa a 50°C, trituração em liquidificador e peneiramento (peneira com malha granulométrica de 2,5 mm), separando-se o farelo (granulometria $\geq 2,5$ mm) da farinha (granulometria $< 2,5$ mm). O farelo foi então utilizado nas fermentações como fonte alternativa de carbono.

3- Substratos alternativos para medida de atividade enzimática

Os amidos de batata e mandioca usados como substratos alternativos para medida de atividades enzimáticas foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia de Alimentos do IBILCE/UNESP, já o amido de milho, que também foi utilizado como substrato alternativo, foi doado pela CARGIL. Os derivados

4- Processo fermentativo

Os meios (item 2.2), num volume de 25 mL, contidos em erlenmeyers de 125 mL, foram inoculados com suspensões de esporos, numa proporção de 10^7 esporos



por mL. Após a inoculação, os meios foram mantidos em *shaker* com temperatura controlada e agitação de 100 rpm.

5- Extração da enzima bruta

A cada 24 horas, num intervalo entre 48 e 144 horas, foi tomado o conteúdo de um dos erlenmeyers como amostra. O material fermentado foi filtrado a vácuo em papel de filtro e os meios livres de células utilizados como solução enzimática bruta.

6- Métodos de Determinação da Atividade Enzimática

6.1- Medida da atividade amilolítica pelo método dextrinizante (α -amilase)

A atividade de α -amilase foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação amido-iodo de uma solução de amido tratada com solução enzimática bruta. A mistura para a reação foi constituída de 0,7 mL de solução de amido solúvel a 0,3%, em tampão acetato de sódio 0,25 M, pH 5,0 e 0,3 mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída. Após a incubação a 60°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de HCl 0,2 M. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de reativo de Iodo (KI 0,30% + I₂ 0,03%). Após homogeneização, a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada.

O controle foi preparado conforme o processo descrito, em duas formas: controle 1- substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada; controle 2- substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão



acetato de sódio. A absorbância após a reação enzimática foi determinada a 600 nm em espectrofotômetro 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, e calculada segundo a equação a seguir (RABALHO, 2002).

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

Onde: U = unidade de enzima;

C = controle (soma das absorbâncias dos controles 1 e 2);

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 da enzima;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

6.2- Medida da atividade de amilase sacarificante pela quantificação do açúcar redutor liberado (atividade amilolítica sacarificante)

O método do ácido dinitrosalicílico foi utilizado para determinar a atividade amilolítica da enzima, através da dosagem dos açúcares redutores liberados. A mistura de reação foi constituída por 0,9 mL de solução de amido solúvel a 0,5%



(p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída.

Após a incubação da mistura de reação a 60°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de reagente DNS ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Em seguida, a reação foi incubada por 8 minutos em banho fervente, e após resfriamento em banho gelado, 10 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo. O controle foi preparado, conforme descrito no item 5.1, e a leitura da absorbância foi realizada em 540 nm contra um branco, obtido pela mistura do reagente DNS com água.

Uma unidade de atividade amilásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando reta padrão obtida a partir da glicose.

6.3- Medida da atividade enzimática através da liberação de glicose

(atividade de glucoamilase)

A determinação da atividade de glucoamilase foi realizada através do método da peroxidase-glicose oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974), utilizando kit comercial Glicose-Enz-(Color da Biodiagnóstico).

A mistura de reação foi constituída de 0,4 mL de solução de amido solúvel a 05% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída. Após incubação da mistura de reação a 60°C, por 10



minutos, as amostras foram submetidas a resfriamento em banho de gelo. Foi adicionado 1,0 mL do reagente da glicose oxidase em cada tubo de ensaio, sendo estes incubados a 37°C por 30 minutos.

O controle foi preparado conforme descrito no item 5.1, e a leitura da absorbância foi realizada em 500 nm contra um branco preparado substituindo a enzima e o substrato pelo volume equivalente de água destilada.

Uma unidade de atividade de glucoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando reta padrão de glicose.

7- Dosagem de açúcares redutores e proteínas totais dos meios de cultivo

Os teores de açúcares redutores totais do meio de cultivo foram determinados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) proposto por Miller (1959), com modificações. A mistura de reação foi constituída de 1,0 mL da amostra devidamente diluída e 1,0 mL do reagente DNS. Após homogeneização e incubação durante 8 minutos em banho de ebulição a mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e diluída em 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 540 nm contra um branco, preparado por substituição do volume de amostra por água destilada. A conversão dos valores de absorbância em μg foi feita através da equação de regressão obtida pela curva padrão de glicose (100 a 900 μg).

A determinação das proteínas totais foi realizada pelo método de LORWY (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.



8- Avaliação do crescimento fúngico

8.1- Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo em meio sólido

O efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento do fungo foi avaliado de acordo com o seguinte procedimento: no centro de uma placa de petri foi inoculado, através de “picada”, a cultura do fungo. As placas foram incubadas em estufas com temperaturas de 40, 45, 48, 50, 52 e 55°C, medindo-se, a cada 12 horas, o diâmetro da colônia. Para evitar dessecação, as placas foram colocadas em bandejas, mantidas com filme de água.

8.2- Avaliação do crescimento microbiano durante o processo fermentativo em meio líquido

O crescimento fúngico foi avaliado através da quantificação da biomassa seca produzida. Após a filtragem para extração do extrato enzimático bruto a biomassa retida no papel de filtro foi mantida em estufa a 80°C até peso constante.



9- Avaliação dos efeitos de parâmetros físico-químicos e da fonte de carbono sobre a produção das amilases

9.1-Efeitos do pH inicial, temperatura e tempo de cultivos sobre a produção das enzimas

Para os estudos do efeito do pH, o meio descrito no item 2.2.1 teve seu pH corrigido para 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5. Os processos de inoculação e fermentação seguiram o descrito no item 3. As fermentações foram conduzidas por um período de 144 horas, com amostragens a cada 24 horas, a partir de 48 horas de cultivo, para cada valor de pH. Depois de definido o melhor pH inicial dos meios, os cultivos foram realizados em temperaturas de 45, 48 e 50°C, também por períodos de 144 horas. Em todas as etapas foram avaliadas as atividades enzimáticas através do três métodos descritos no item 6.

9.2- Efeito do uso de resíduo sólido de processamento de mandioca e farelo de milho como fonte de carbono sobre a produção das enzimas

Resíduo sólido de processamento de mandioca e farelo de milho foram utilizados como fonte de carbono para a produção das enzimas. Os meios foram preparados como descrito no item 2.2.1, substituindo-se o amido solúvel por farelo de amido e farelo de mandioca. O processo fermentativo ocorreu em pH e temperatura ótimos, definidos anteriormente.



10- Caracterização das enzimas

Depois de definidas as melhores condições para a produção das enzimas, essas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade, quanto à estabilidade às variações de pH e temperatura, em ausência de substrato e estudo da termoestabilidade das enzimas.

10.1- Efeito do pH sobre a atividade das enzimas

Para esses ensaios foram utilizadas soluções tampão a 0,25 M: tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 5,0), tampão citrato-fosfato (pH 5,0 a 7,0), tampão tris-HCL (pH 7,0 a 8,5) e tampão glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,0). As reações enzimáticas seguiram o descrito nos itens 6.1 e 6.2.

10.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas

As misturas de reação foram incubadas em temperaturas de 55 a 85°C. Os ensaios foram aplicados para os três métodos de determinação das atividades enzimáticas, conforme citado no item 6.



10.3- Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato

Para este estudo foram utilizados tampões McIlvaine na faixa de pH de 3,0 a 8,0, e Glicina-NaOH para pH de 8,0 a 10,0, a 0,25 M. Uma alíquota de 0,5 mL da solução enzimática bruta foi misturada a 0,5 mL das diferentes soluções tampão, com diferentes pH. A mistura foi incubada, em tubos de rosca, em estufa B.O.D., por 24 horas, a 25°C. Após esse período, as atividades residuais foram determinadas nos pHs e temperaturas ótimas das enzimas.

10.4- Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato

Para verificar a estabilidade frente a variação de temperatura, o extrato enzimático foi submetido à incubação, em tubos de rosca, em temperaturas de 45 a 90°C, com intervalos de 5°C. Mediu-se a atividade enzimática residual pelos três métodos de determinação (item 6), em pH e temperatura ótimos de cada enzima.

10.5- Estabilidade a 60°C

Para avaliar a estabilidade das enzimas a 60°C, em ausência de substrato, o extrato enzimático bruto obtido em 48 horas de cultivo em meio contendo farelo de mandioca como fonte de carbono, foi mantido durante 8 horas a 60°C. Para esses ensaios utilizou-se de extrato enzimático dialisado, não dialisado, dialisado com Ca^{+2}



e não dialisado com Ca^{+2} . A cada 1 hora, alíquotas foram retiradas para a medida da atividade enzimática, como descrito no item 6.1 e 6.2.

10.6- Efeito do tempo de armazenamento sobre a estabilidade das enzimas

Para verificar o efeito das condições e tempo de armazenamento sobre a estabilidade das enzimas, o extrato enzimático bruto obtido em 48 horas de cultivo, sob condições ideais de pH inicial e temperatura de cultivo, em meio contendo farelo de mandioca como fonte de carbono foi mantido congelado em freezer, sob temperatura de aproximadamente (-20°C), em geladeira em temperatura de 7°C e a temperatura ambiente, durante 12 semanas. A cada semana mediu-se a atividade enzimática para os três métodos de determinação enzimática, como descrito no item 6. Foi tomada como referencia, a atividade determinada antes do armazenamento. Para evitar a contaminação do extrato enzimático foi acrescentado ao mesmo $10\mu\text{L}$ Azida sódica a 0,2% para cada 1 mL de extrato enzimático.

10.7- Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade enzimática

10.7.1- Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases

Para o estudo do efeito da adição de íons Ca^{+2} na atividade enzimática, da enzima bruta obtida (como descrito no item 2.2), as reações enzimáticas foram conduzidas em mistura de reação descrita anteriormente, acrescentado de $10\mu\text{L}$ de



solução de cloreto de cálcio, em concentrações suficientes para que se obtivesse concentrações de 2, 5, 10, 20, 40 e 60 Mm de Ca^{+2} na mistura de reação. O mesmo procedimento foi seguido utilizando-se a solução enzimática bruta dialisada contra tampão acetato 10 Mm, pH 5,5, contendo EDTA sódico a 1%.

10.7.2- Efeito da adição de outros íons à mistura de reação, sobre atividade das amilases

Para o estudo do efeito de outros íons sobre a atividade das amilases, foi seguido o processo descrito anteriormente (item 10.7.1), porém utilizando-se soluções de MgCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 , AgCl_2 , KCl , AlCl_3 , BaCl_2 , CrCl_3 , FeCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 e de EDTA, de modo a se obter concentrações de 10 mM do cátion correspondente na mistura de reação.

10.8- Atividade enzimática sobre diferentes substratos amiláceos, derivados do amido e sacarose

Para o estudo da atividade enzimática sobre diferentes substratos, o extrato enzimático bruto foi incubado durante 10 minutos em temperaturas ótimas, anteriormente determinadas para cada enzima com amidos de milho, de mandioca, batata extraídos no laboratório de Tecnologia de Cereais, DETA, IBILCE/UNESP e amido solúvel comercial (SIGMA). Foram feitas as medidas de atividade enzimática como descrito no item 6. Também foram feitos testes de atividade enzimática em substratos derivados de amido, como maltose, maltotriose, maltotetraose,



maltohexaose, maltoheptaose (SIGMA) e sacarose. Para estes ensaios mediu-se a atividade enzimática pelo método de quantificação do açúcar redutor liberado e pelo método de quantificação de glicose liberada (glucoamilase), como descrito no item 6.2 e 6.3, respectivamente.

Além desses também foi avaliada a capacidade de ação das enzimas sobre substratos sintéticos. Para esse fim foram utilizados os substratos: ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (α -PNPG), ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (β -PNPG) e p -nitrofenil- α -D-maltosídeo.

As misturas de reações para os substratos sintéticos foram compostas por 0,2 mL de tampão acetato de sódio a 0,1 M, pH 5,0, 0,05 mL de soluções de ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e p -nitrofenil- β -D-maltosídeo a 2,0 Mm e 0,1 mL de extrato enzimático bruto em cada meio reativo. Após incubação das misturas de reações em temperaturas ótima para cada enzima, por 10 minutos, estas foram interrompidas com a adição de 1,0 mL de Na_2CO_3 a 2,0 M. O controle da enzima foi preparado conforme descrito no item 6.1, e a leitura da absorbância foi realizada em 410 nm contra um branco constituído de água destilada.

Para a medida de atividade sobre a sacarose foram utilizados o método de quantificação de açúcares redutores liberados e glucoamilase como descrito no item 6.2 e 6.3, respectivamente.



10.9- Identificação dos produtos de hidrólise enzimática do amido a 1%

Para analisar o perfil de açúcares redutores liberados ao longo do tempo de hidrólise, a solução enzimática bruta foi incubada em pH e temperatura ótimos com uma solução de amido solúvel a 1%, por um período de 240 minutos. Alíquotas foram retiradas com 10, 30, 60 e 240 minutos de hidrólise.

Os produtos de hidrólise enzimática do amido foram estudados por cromatografia de papel (Whatman n°1) descendente, usando como solvente a mistura acetato de etila, isopropanol e água, na proporção 6:3:1. A revelação foi feita por mergulho do cromatograma seco em mistura de acetona e nitrato de prata (saturada), seguida de lavagem com hidróxido de sódio alcoólico 0,5 N e tiosulfato de sódio a 10%. Foram utilizados glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoehaxaose como padrão.

Além da cromatografia de papel, os produtos de hidrólise do amido a 1% foram analisados por cromatografia líquida utilizando HPLC (Jasco, PU-980). O HPLC foi equipado com uma coluna Aminex HPX- 42 da Bio Rad e um detector de índice de refração (Shodex RI-72). As amostras foram eluídas com água a um fluxo de 0,7 mL/min. Foram utilizados glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltoehaxaose como padrão.

11- Hidrólise do amido de milho e mandioca para a produção de xarope

Para o estudo da hidrólise do amido utilizando solução enzimática bruta foram utilizadas suspensões de amido de milho e de mandioca (item 3), a 25% (p/p), base



seca. O extrato enzimático utilizado na hidrólise foi obtido a partir de cultivo do fungo, em meio contendo farelo de mandioca como fonte de carbono, em condições ideais de pH inicial e temperatura de cultivo, definidos anteriormente.

Os ensaios ocorreram em pH 5,0 (definido como ótimo para a atividade sacarificante), em temperaturas de 80 e 90°C, por períodos de 1 e 2 horas. A solução de amido foi incubada em tubos de ensaios com rosca, com um volume de solução enzimática bruta equivalente a 10 U de atividade enzimática sacarificante por grama de amido, totalizando um peso final de 2 g (aproximadamente 2 mL). Os experimentos foram feitos com três repetições e as médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usando software Estat (free).

Os hidrolisados foram avaliados quanto aos teores de açúcares redutores liberados, e expressos como porcentagem em relação ao amido inicial. Foram também realizadas cromatografias de papel para a identificação dos produtos de hidrólise (item 10.9).

12- Determinação da atividade amilolítica em Gel de poliacrilamida

Para determinação da atividade em gel de poliacrilamida foi utilizado, 30% de Bis/Acrilamida, tris 1,0 M (pH 8,8), persulfato de amônia 10% e TEMED. O gel concentrador foi preparado na mesma concentração de Bis/Acrilamida, mas em pH 6,8. A corrida foi realizada a 4°C e após a corrida o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 m M, pH 5,0 por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de amido a 0,5% durante 24 horas a 4°C e em



seguida incubado por meia hora a 50°C. A revelação foi feita utilizando uma solução de iodo 0,1% de I² + 1 5%de KI.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Avaliação do crescimento em placa de petri, sob diferentes temperaturas

Com o intuito de avaliar a temperatura ideal para o crescimento do fungo, a cultura miceliada ainda não esporulada foi inoculada através de uma “picada” no centro de uma placa de petri em meio PDA acrescido de 0,5% de amido e incubada em temperaturas que variaram de 40 a 55°C. O crescimento da cultura foi avaliado medindo-se o diâmetro da colônia em intervalos de 12 horas. Os resultados são mostrados na Figura 5.

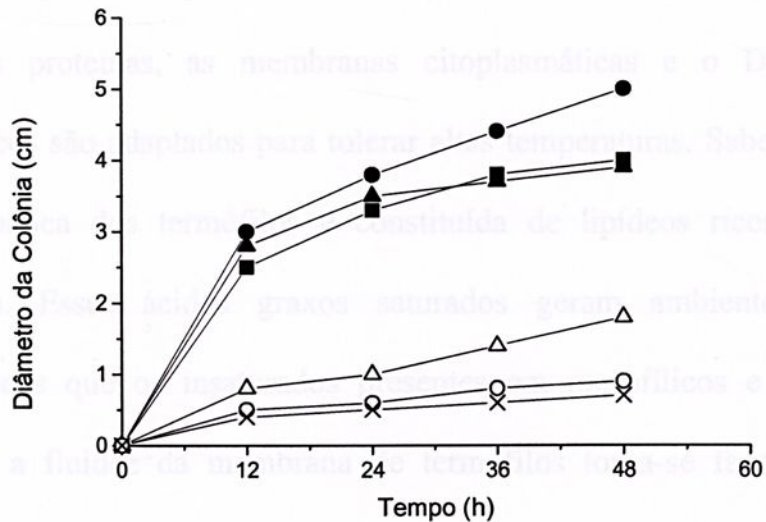


Figura 5: Avaliação da temperatura de crescimento de *Rhizomucor pusillus* A13.36 em placa de petri. Utilizou-se meio PDA acrescido de 0,5% de amido. —■— 40°C; —●— 45°C; —▲— 48°C; —△— 50°C; —○— 52°C; —×— 55°C

Analisando os dados da figura 1 pode-se observar que a temperatura ideal de

Os dados da Figura 5 mostram que a melhor temperatura para o crescimento do fungo foi 45°C, na qual a colônia atingiu 5,0 cm de diâmetro, em 48 horas. Nota-se no entanto que o fungo apresentou crescimento muito semelhante em temperaturas entre 40 e 48°C. Temperaturas acima de 48°C reduzem drasticamente o crescimento do fungo. Esses dados mostram que a linhagem em questão pode ser considerada termofílica (BROCK, 1985).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Cada organismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual é incapaz de crescer, e uma temperatura máxima, acima da qual ocorre a morte da célula microbiana. A temperatura ótima de crescimento de um organismo sempre encontra-se mais próxima da temperatura máxima do que da temperatura mínima (MADGAN et al., 2003).

As proteínas, as membranas citoplasmáticas e o DNA de organismos termofílicos são adaptados para tolerar altas temperaturas. Sabe-se que a membrana citoplasmática dos termófilos é constituída de lipídeos ricos em ácidos graxos saturados. Esses ácidos graxos saturados geram ambientes mais fortemente hidrofóbicos que os insaturados presentes em mesofílicos e psicofílicos. Dessa maneira, a fluidez da membrana de termófilos torna-se favorável aos processos fisiológicos em temperaturas elevadas, garantindo assim a vida desses organismos sob esta condição.



Quanto às proteínas termoeestáveis, em geral, sabe-se que as mesmas tendem a apresentar regiões internas altamente hidrofóbicas, dentre outras características, que provavelmente diminui sua tendência ao desdobramento e conseqüentemente sua desnaturação. Quanto ao DNA acredita-se que vários mecanismos distintos atuam simultaneamente auxiliando a molécula em sua estabilização. Uma possível relação entre a composição de pares de bases A+T e C+G e a estabilidade de moléculas de DNA de termofilicos foram sugeridas em alguns trabalhos. Segundo Zaha e outros (2003), os pareamentos entre as bases no DNA não apresentam a mesma estabilidade em relação aos agentes desnaturantes, devido à presença de duas pontes de hidrogênio entre os pares A=T e três pontes de hidrogênio entre os pares C=G. Portanto, para o rompimento de um par C=G, são necessários temperaturas mais elevadas.

2- Estudo do efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção das amilases

Para o estudo do efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção das amilases, os meios de cultivo tiveram seus pHs iniciais corrigidos para 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5. As amostras foram tomadas a cada 24 horas, a partir de 48 horas de cultivo, uma vez que, em experimentos prévios, não se obteve produção enzimática significativa nas primeiras 24 horas. A Figura 6 ilustra a produção de amilases, em fermentação submersa, por *R. pusillus* A13.36, nos diferentes valores de pH.

Figura 6 - Produção de amilases por *R. pusillus* A13.36 em fermentação submersa sob diferentes pHs a 45°C: (A) atividade enzimática dextrinazante (α -amilase) (B) atividade enzimática pelo método DNS (acarificante) (C) atividade enzimática glucoamilase (D) amilazante (E) proteínas totais (F) açúcares redutores totais (G) pH final de meio de cultivo. —●— pH 4,5; —■— pH 5,0; —▲— pH 5,5; —△— pH 6,0; —○— pH 6,5



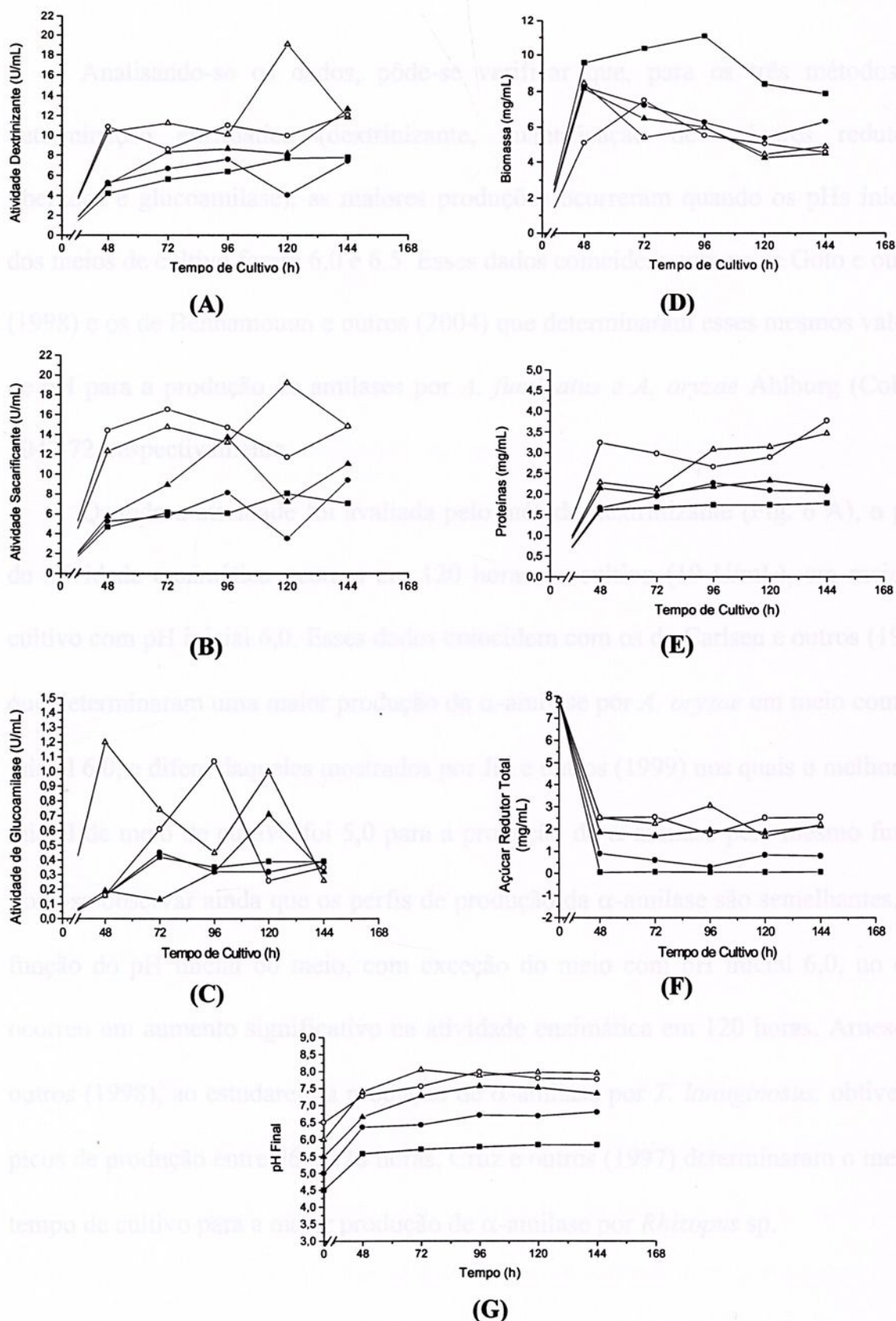


Figura 6 – Produção de amilases por *R. pusillus*A13.36 em fermentação submersa sob diferentes pHs a 45°C: (A) atividade enzimática dextrinizante (α -amilase) (B) atividade enzimática pelo método DNS (sacarificante) (C) atividade enzimática glucoamilase (D) biomassa (E) proteínas totais (F) açúcares redutores totais (G) pH final de meio de cultivo. —■— pH 4,5; —●— pH 5,0; —▲— pH 5,5; —△— pH 6,0; —○— pH 6,5

Analisando-se os dados, pôde-se verificar que, para os três métodos de determinação enzimática (dextrinizante, quantificação de açúcares redutores liberados e glucoamilase), as maiores produções ocorreram quando os pHs iniciais dos meios de cultivo foram 6,0 e 6,5. Esses dados coincidem com os de Goto e outros (1998) e os de Bennamouun e outros (2004) que determinaram esses mesmos valores de pH para a produção de amilases por *A. fumigatus* e *A. oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72, respectivamente.

Quando a atividade foi avaliada pelo método dextrinizante (Fig. 6 A), o pico de atividade enzimática ocorreu em 120 horas de cultivo (19 U/mL), em meio de cultivo com pH inicial 6,0. Esses dados coincidem com os de Carlsen e outros (1996) que determinaram uma maior produção de α -amilase por *A. oryzae* em meio com pH inicial 6,0, e difere daqueles mostrados por Jin e outros (1999) nos quais o melhor pH inicial de meio de cultivo foi 5,0 para a produção de α -amilase pelo mesmo fungo. Pode-se observar ainda que os perfis de produção da α -amilase são semelhantes, em função do pH inicial do meio, com exceção do meio com pH inicial 6,0, no qual ocorreu um aumento significativo na atividade enzimática em 120 horas. Arnesen e outros (1998), ao estudarem a produção de α -amilase por *T. lanuginosus*, obtiveram picos de produção entre 96 e 120 horas. Cruz e outros (1997) determinaram o mesmo tempo de cultivo para a maior produção de α -amilase por *Rhizopus* sp.



Pelo método de quantificação do açúcar redutor liberado (Fig. 6 B), observa-se que o perfil de produção enzimática é o mesmo para os meios com pHs iniciais de 6,0 e 6,5 e que a maior produção ocorreu em 120 horas de cultivo no meio com pH 6,0 (19 U/mL).

Quanto à glucoamilase (Fig. 6 C), nota-se que as maiores atividades foram detectadas em 48 horas de cultivo em meio com pH inicial 6,0 (1,20 U/mL), dados estes que corroboram os da literatura, nos quais são demonstrados picos de atividade enzimática nas primeiras horas de cultivo (JIN et al, 1999; KILIKIAN, 1996). A maior produção de glucoamilase por *Aspergillus* sp. A3 ocorreu em meio de cultivo com pH inicial 5,0, em 120 horas de cultivo (ELLAIAH, 2002).

De um modo geral, os meios com pHs iniciais 6,0 e 6,5 propiciaram valores de atividades para α -amilase e atividade de amilase sacarificante, numericamente semelhantes em quase todo o processo fermentativo, diferenciando-se apenas após 120 horas de cultivo, quando as maiores atividades foram detectadas em meios com pHs iniciais de meio de cultivo 6,0.

Para a glucoamilase, não houve diferença significativa quanto a produção máxima obtida entre os meios de cultivo com pH 6,0 e 6,5. Entretanto, em meio com pH 6,0 o pico de atividade foi observado em período fermentativo de (48 horas), o que é vantajoso para o processo, visto a economia de tempo e equipamento. Dessa forma, conclui-se que o pH inicial dos meios de cultivo mais adequados para a produção das amilases, nas condições do ensaio realizado, foi 6,0.



Os resultados (Fig. 6 D) mostram um maior crescimento do fungo em meio com pH inicial 4,5, entretanto a maior produção enzimática ocorreu em meio de cultivo com pH inicial 6,0 (Fig. 6 A-C).

Dados da literatura mostram que nem sempre o pH ótimo para o crescimento do microrganismo coincide com aquele em que se verifica uma maior secreção das enzimas. Muitos microrganismos podem crescer em uma ampla faixa de pH e alguns chegam a tolerar uma variação entre 4 e 9, mas somente crescem e esporulam otimamente em faixas mais estritas de pHs (COCHRANE, 1958). Em muitos casos, o pH de meio para cultivo e produção das enzimas, não excede a faixa de (3,2 a 4,2) para *A. oryzae* DAE, (7,0 a 8,0) e *A. oryzae* EI 212 (JIN et al, 1999 e KUNDU et al, 1973, respectivamente).

A linhagem fúngica de *R. pusillus* A 13.36 mostrou capacidade de crescimento e produção das enzimas de interesse em todos os pHs testados (Fig. 6 D) com um maior crescimento em pH 4,5 e maior produtividade em pHs próximos a neutralidade. Esses contrastes podem estar relacionados com um possível efeito do pH de meio de cultivo no processamento pós-tradução das proteínas com atividades amilolíticas. Diversas proteínas sofrem modificações pós-tradução, modificações essas que incluem a remoção e ou modificação de resíduos específicos (VOET, 2002).

Alguns trabalhos têm mostrado o efeito do pH na síntese de algumas enzimas (O' DONNELL et al., 2001; ROYER e NAKAS, 1989). Sabe-se que algumas enzimas, tais como glucoamilase sintetizadas, por eucariotos, requerem uma série de



modificações pós-traducionais e que a participação de proteases tem sido extremamente importante nesse processo, tendo em vista um efeito limitante sobre a secreção dessas enzimas.

Além disso, as proteases do meio poderiam atuar degradando as enzimas de interesse. O' Donnell e colaboradores (2001) avaliaram a relação entre pH de meio de cultivo e síntese de proteases por uma linhagem de *A. niger*. Eles observaram que a atividade proteolítica foi maior em pHs baixos, e que essa atividade caia substancialmente à medida que o pH aproximava-se da neutralidade.

Ainda com relação ao pH de meio de cultura, observa-se, através da Figura 6 G, que no decorrer do processo fermentativo os valores de pHs foram superiores aqueles iniciais de meio de cultivo. Segundo Rimbault (1998), os valores de pH durante o processo fermentativo podem aumentar ou diminuir em função dos produtos do metabolismo do microrganismo durante a fermentação. A secreção de ácidos orgânicos como ácido acético, ácido lático e ácido cítrico proporciona um decréscimo nos valores de pH e por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos, juntamente com a hidrólise de algumas substâncias como a uréia e proteínas, geralmente causam um aumento no pH do meio de cultivo.

Os valores de pH flutuantes durante o processo fermentativo tem efeito sobre o transporte de nutrientes, bem como a solubilidade dos mesmos além de influenciar decisivamente na atividade das enzimas (PAPAGIANNI, 2004), daí a importância da avaliação desse parâmetro ao longo do percurso fermentativo.



Quanto ao perfil de produção de proteínas totais (Fig. 6 E) nota-se uma semelhança entre os meios com diferentes pHs, porém, as maiores taxas de secreção de proteínas totais foram detectadas em pHs próximos da neutralidade. Esses dados coincidem com aqueles obtidos para a produção enzimática, o que sugere que esses níveis superiores de proteínas determinados em pHs 6,0 e 6,5 possam corresponder às proteínas com atividade amilolíticas.

Os níveis de açúcares redutores ao longo do processo fermentativo são mostrados na Figura 6 F. Observa-se um perfil semelhante dos teores de açúcares redutores ao longo da fermentação em todos os pHs, entretanto, o maior consumo desses açúcares ocorreu em pHs mais ácidos (4,5 e 5,0), sendo que nesses pHs foram observadas concentrações de zero e 1,0 mg/mL, respectivamente, em quase todo período fermentativo. Esse maior consumo é consistente com o maior crescimento do microrganismo em pH 4,5.

Ainda com relação aos níveis de açúcares redutores, durante o processo fermentativo, observa-se também, que as maiores quantidades de açúcares foram detectadas em meios onde se obteve uma maior atividade enzimática determinadas nos três métodos. As maiores atividades amilolíticas determinadas em meios com pHs inicial 6,0 e 6,5 poderiam liberar açúcares redutores, os quais atingiriam valores superiores àqueles apresentados em meios com pHs iniciais inferiores.

3- Efeito da temperatura de incubação sobre a produção das amilases



Depois de realizados os estudos dos efeitos do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção das amilases, a linhagem fúngica *R. pusilus* A 13.36 foi cultivada em pH inicial de meio de cultivo 6,0, definido anteriormente como o mais apropriado para a produção de amilases em temperaturas de 40, 45 e 48°C, as quais proporcionaram maior crescimento do fungo em meio sólido (Figura 5).

Assim como o pH, a aeração e a fonte de carbono, a temperatura tem importante influência sobre crescimento e secreção das enzimas pelos microrganismos. Dessa forma, se faz importante o conhecimento da temperatura mais apropriada para a síntese e secreção das enzimas pelo microrganismo.

Os resultados da Figura 7 mostram que as temperaturas de cultivo testadas, não influenciaram significativamente os perfis de produção das amilases determinados através dos três métodos (dextrinizante, quantificação de açúcares redutores liberados) e glucoamilase, bem como não proporcionaram uma diferença numérica significativa de atividade durante o percurso fermentativo.

O perfil de produção de α -amilase foi muito similar nas três temperaturas, porém, com uma atividade um pouco maior em 120 horas de cultivo, em temperatura de 45°C, alcançando 14,0 U/mL (Fig. 7 A).

Para a atividade sacarificante, medida pela liberação de açúcar redutor (Fig. 7 B), o pico de produção também ocorreu em 120 horas de cultivo quando o meio de cultivo foi incubado a 45°C (13,65 U/ml). A maior parte das amilases fúngicas descritas são produzidas por organismos mesofílicos cujas temperaturas de



crescimento variam de 25 a 37°C (GUPTA et al., 2003). A temperatura ótima para a produção de amilases pelas linhagens mesofílicas de *A. oryzae*, *A. tamaraii*, *Rhizopus oligosporus*, *A. oryzae*, *Aspergillus* sp e *Cryptococcus flavus* foram de 30, 30, 35, 30, 35 e 25°C, respectivamente (CARLSEN et al., 1996; MOREIRA et al., 1999; JIN et al., 1999; ELLAIAH et al., 2002; FRANCIS et al., 2003 e WANDERLEY et al., 2004).

Dentre os termofílicos descritos como amilolíticos destacam-se *Thermonospora fusca* e *T. lanuginosus* os quais produzem α -amilase a 55°C e 50°C, respectivamente (BUSCH; STUTZENBERGER 1997; JENSON et al., 1988). A temperatura ótima para a produção de amilases pelas linhagens de *A. terreus* (NA170), *Rhizopus microsporus* var e *T. lanuginosus* (ATCC 34626) foram de 45, 45 e 47°C (HOST et al., 1991; PEIXOTO et al., 2003; NGUYEN et al., 2002), respectivamente.

As atividades de glucoamilase (Fig 7 C) foi a que mais apresentou variações em função da temperatura de incubação. O pico de atividade foi detectado em 96 horas de cultivo em temperatura de 45°C (1,56 U/mL).

Ao contrário da produção enzimática, o crescimento do fungo foi influenciado pela temperatura de cultivo. Através da Figura 7 D verifica-se que nas temperaturas de 40 e 45°C, o fungo atinge seu crescimento máximo já nas primeiras 48 horas de cultivo enquanto que seu crescimento máximo em 48°C foi observado em 96 horas



de cultivo, embora a produção máxima de biomassa (14 mg/mL) tenha sido as mesmas nas três temperaturas.

O maior crescimento do fungo já nas primeiras 48 horas em meios com temperaturas de 40 e 45°C reflete no consumo de açúcares redutores presentes nos meios de cultivos (Fig. 7 F). Observa-se ainda que em meio com temperatura de 45°C o consumo desses açúcares continua até 72 horas, e que a partir daí os níveis manteve-se constante até o fim do processo fermentativo.

A comparação entre os dados de produção de biomassa e de enzima (Fig. 7 A, B, C e D) indica que os picos de atividade enzimática nos meios foram atingidos após a fase de crescimento logarítmico. Pode-se inferir ainda, por esses dados, que o aumento da enzima no meio correspondeu à redução da massa micelial, o que poderia indicar que enzimas estariam sendo liberadas em maior quantidade após a lise das hifas.



Figura 7 – Produção de amilases por *R. pusillus* A13.36 em fermentação submersa em pH 6,0, sob diferentes temperaturas.

(A) atividade enzimática destrinizante (α -amilase); (B) atividade enzimática pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados (sacarificase); (C) atividade de glucoamilase (D) biomassa (E) Proteínas totais (F) açúcares redutores totais. —■— 40°C; —●— 45°C; —▲— 48°C

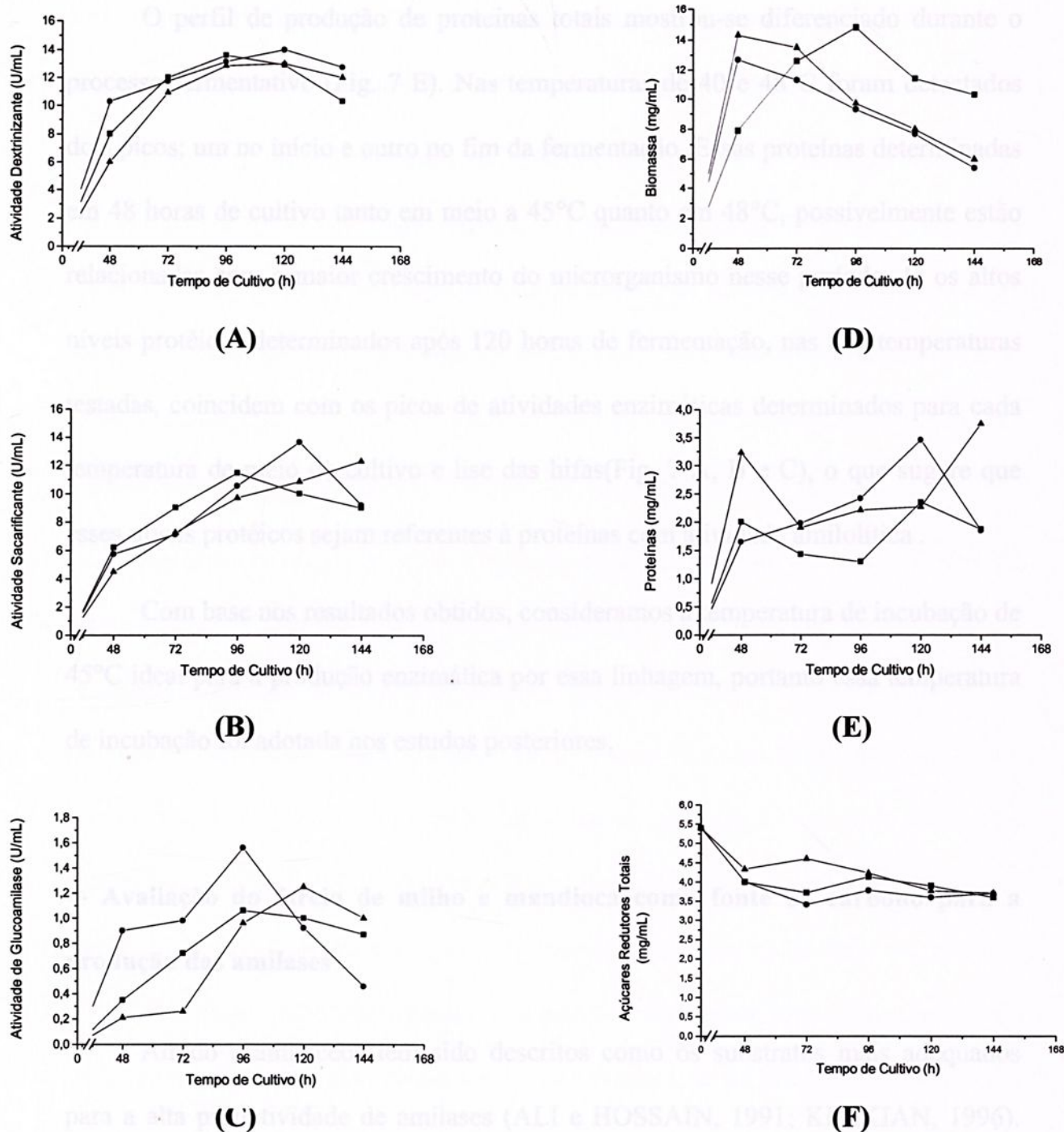


Figura 7 – Produção de amilases por *R. pusillus* A13.36 em fermentação submersa em pH 6,0, sob diferentes temperaturas.

(A) atividade enzimática dextrinizante (α -amilase); (B) atividade enzimática pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados (sacarificante) (C) atividade de glucoamilase (D) biomassa (E) Proteínas totais (F) açúcares redutores totais. —■— 40°C; —●— 45°C; —▲— 48°C

O perfil de produção de proteínas totais mostrou-se diferenciado durante o processo fermentativo (Fig. 7 E). Nas temperaturas de 40 e 48°C foram detectados dois picos; um no início e outro no fim da fermentação. Essas proteínas determinadas em 48 horas de cultivo tanto em meio a 45°C quanto em 48°C, possivelmente estão relacionadas com o maior crescimento do microrganismo nesse período. Já os altos níveis protéicos determinados após 120 horas de fermentação, nas três temperaturas testadas, coincidem com os picos de atividades enzimáticas determinados para cada temperatura de meio de cultivo e lise das hifas (Fig. 7 A, B e C), o que sugere que esses níveis protéicos sejam referentes à proteínas com atividade amilolítica.

Com base nos resultados obtidos, consideramos a temperatura de incubação de 45°C ideal para a produção enzimática por essa linhagem, portanto essa temperatura de incubação foi adotada nos estudos posteriores.

4- Avaliação do farelo de milho e mandioca como fonte de carbono para a produção das amilases

Amido e amiláceos têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases (ALI e HOSSAIN, 1991; KILIKIAN, 1996). Nesse caso, o aproveitamento de resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim, constitui uma das alternativas mais viáveis. O uso de resíduos agro-industriais para a produção



enzimática, por um lado fornece substratos alternativos, por outro ajuda a solucionar os problemas de poluição que seu descarte no ambiente pode causar.

Essa etapa do presente trabalho consistiu na avaliação da produção enzimática por *R. pusillus* A13.36 quando cultivada em meio com farelo de milho e farelo de mandioca como fonte de carbono. A temperatura de incubação foi de 45°C e o pH inicial do meio em 6,0, conforme definidos nos experimentos anteriores. Amido solúvel comercial foi utilizado como fonte de carbono referência, nas mesmas condições de pH e temperatura. Os resultados são mostrados na Figura 8.

Analizando os gráficos da Figura 8, nota-se que para os três métodos de determinação enzimática, os perfis de produção das enzimas foram bastante semelhantes quando os farelos de milho e mandioca foram as fontes de carbono, cujos picos de atividade foram obtidos nas primeiras 48 horas de cultivo. Nos meios contendo amido solúvel comercial como fonte de carbono, os picos de atividades apareceram em 72 horas de cultivo. Observa-se ainda que o teor de biomassa foi maior em 48 horas em todos os meios de cultivo e diminuiu no decorrer do processo (Fig. 8 D). Esses dados confirmam que a fase de crescimento logarítmico ocorre até 48 horas e que a partir daí, começa a ocorrer diminuição na produção de biomassa, possivelmente em função de lise das hifas.

As diferenças no tempo de sínteses das enzimas em função do tipo de amido usado podem ser justificadas pela maior quantidade de açúcares redutores presente no amido solúvel no início do processo fermentativo, quando comparados aos meios



constituídos por farelos (Fig. 8 F). O elevado teor de açúcar redutor poderia exercer repressão catabólica sobre a síntese das enzimas. Carlsen e colaboradores (1996) estudando a produção de α -amilase por *A. oryzae* verificaram que uma pequena concentração de glicose no meio de cultivo era o suficiente para causar uma repressão na síntese dessa enzima. Uma situação semelhante foi observada por Konsula e Kyriakides (2003) com a produção de α -amilase por *B. subtilis* em meio contendo glicose, maltose e lactose e por Ramachandran e outros (2004) com a produção de α -amilase por *A. oryzae* em presença de maltose.

Para o método dextrinizante (α -amilase) (Fig 8 A), os picos de produção enzimática, em meios contendo farelo de milho e farelo de mandioca como fontes de carbono, foram de 12,0 e 13,6 U/mL em 48 horas de cultivo, respectivamente. A atividade máxima de α -amilase em meio contendo amido solúvel comercial ocorreu em 120 horas de cultivo (13,5 U/mL).

Pelo método da quantificação do açúcar redutor liberado (DNS) (Fig. 8, B), a maior atividade foi observada em 144 horas de cultivo em meio contendo amido solúvel comercial (13,0 U/mL). Para os meios contendo farelo de milho e farelo de mandioca como fonte de carbono as maiores atividades foram determinadas em 48 horas de cultivo, sendo 8,46 e 11,6 U/mL, respectivamente.

Os níveis de açúcares redutores presentes no meio de cultivo são mostrados na figura 8 F. Observa-se que ocorre um aumento desses açúcares nos meios contendo farelo de milho e farelo de mandioca, logo após a fase de crescimento logarítmico.



Esses aumentos nos teores de açúcares redutores estão diretamente relacionados com o pico de produção enzimática determinadas nos três métodos no final do período de crescimento.

Ainda nota-se que o aumento nos teores de açúcares redutores nos meios contendo amido solúvel só é evidenciado a partir de 96 horas de cultivo, uma vez que um pico de atividade enzimática aparece em 72 horas de cultivo.



Figura 8. Produção de amilases por *R. pusillus* 13.36 em fermentação submersa tendo farelo de mandioca e farelo milho como fonte de carbono em pH 6,0 a 45 °C. (A) atividade enzimática destrinizante (α -amilase) (B) atividade enzimática pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados (sacarificante) (C) atividade enzimática glucoamilase (D) biomassa (E) proteínas totais (F) açúcares redutores totais. —●— Amido Solúvel; —♦— Farelo de Mandioca; —▲— farelo de milho

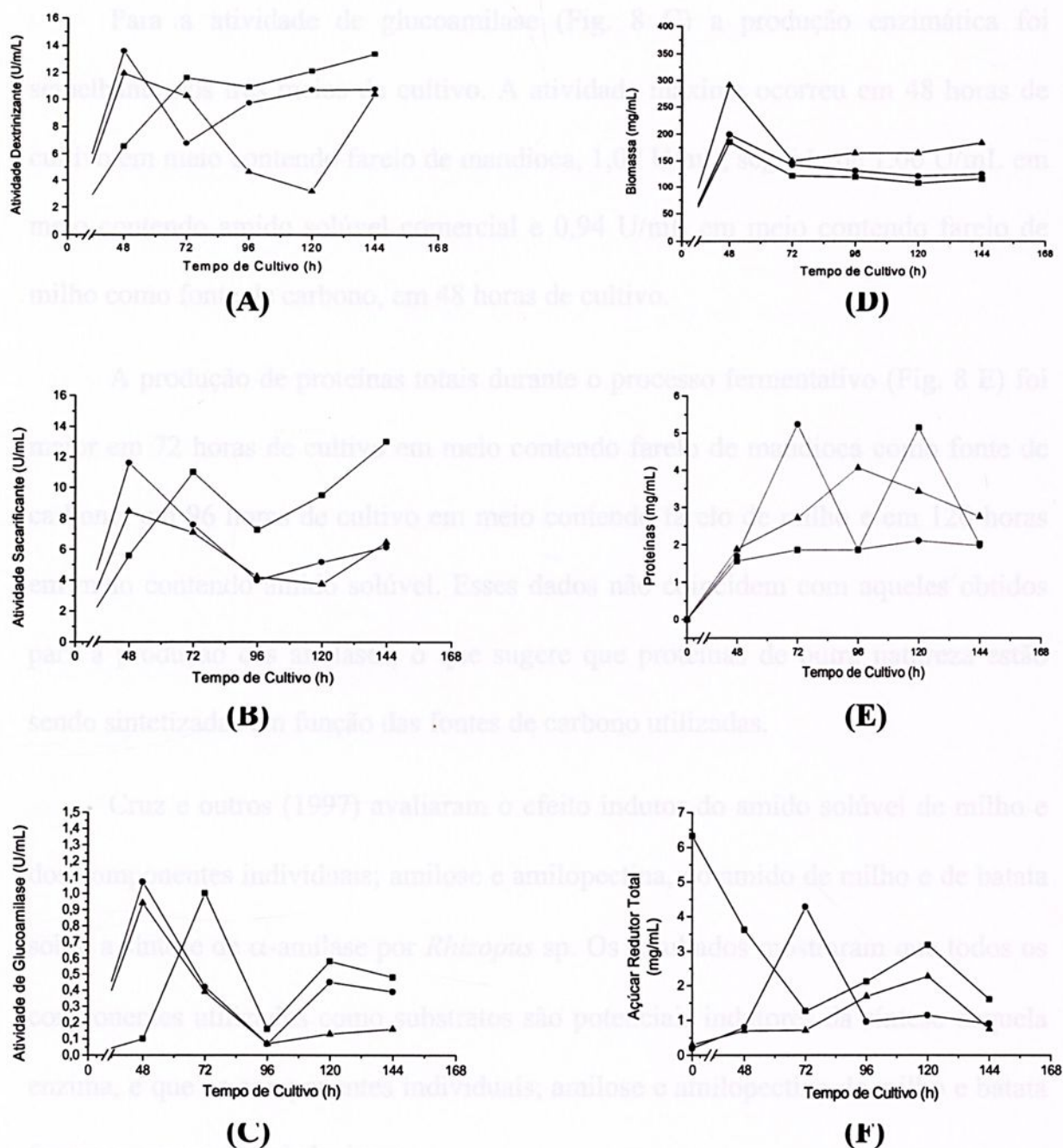


Figura 8: Produção de amilases por *R. pusillus* 13.36 em fermentação submersa tendo farelo de mandioca e farelo milho como fonte de carbono em pH 6,0 a 45 °C.

(A) atividade enzimática dextrinizante (α -amilase) (B) atividade enzimática pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados (sacarificante) (C) atividade enzimática glucoamilase (D) biomassa (E) proteínas totais (F) açúcares redutores totais. —■— Amido Solúvel; —●— Farelo de Mandioca; —▲— farelo de milho

Para a atividade de glucoamilase (Fig. 8 C) a produção enzimática foi semelhante nos três meios de cultivo. A atividade máxima ocorreu em 48 horas de cultivo em meio contendo farelo de mandioca, 1,07 U/mL, seguida de 1,00 U/mL em meio contendo amido solúvel comercial e 0,94 U/mL em meio contendo farelo de milho como fonte de carbono, em 48 horas de cultivo.

A produção de proteínas totais durante o processo fermentativo (Fig. 8 E) foi maior em 72 horas de cultivo em meio contendo farelo de mandioca como fonte de carbono, em 96 horas de cultivo em meio contendo farelo de milho e em 120 horas em meio contendo amido solúvel. Esses dados não coincidem com aqueles obtidos para a produção das amilases, o que sugere que proteínas de outra natureza estão sendo sintetizadas em função das fontes de carbono utilizadas.

Cruz e outros (1997) avaliaram o efeito indutor do amido solúvel de milho e dos componentes individuais; amilose e amilopectina, do amido de milho e de batata sobre a síntese de α -amilase por *Rhizopus* sp. Os resultados mostraram que todos os componentes utilizados como substratos são potenciais indutores da síntese daquela enzima, e que os componentes individuais; amilose e amilopectina de milho e batata foram os que melhor induziram.

Goto e outros (1998) avaliaram o efeito de algumas fontes de carbono, tais como amido solúvel, amido de mandioca e de trigo, na síntese de α -amilase e glucoamilase por *A. fumigatus*. Os resultados obtidos foram satisfatórios para as três fontes de carbono em questão, o que mostra que as fontes naturais de carbono como



trigo e mandioca, assim como outras, constituem uma excelente alternativa para a produção enzimática.

Deve-se destacar, que o farelo de milho e o farelo de mandioca em questão são subprodutos do processamento do milho e da mandioca para produção de amido, e, portanto, têm custo muito menor do que o amido de milho já processado. A substituição do amido solúvel por um subproduto da agroindústria na produção de amilases, reduziria custo de processo, ao mesmo tempo em que agregaria valor a um produto que muitas vezes é descartado, causando prejuízos ao meio ambiente.

5- Caracterização das amilases

Os ensaios para a caracterização das enzimas foram realizados a partir da solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *R. pusillus* A13.36 em fermentação submersa, utilizando farelo de mandioca como fonte de carbono em condições ideais de pH, temperatura e tempo de cultivo. Foram avaliados pH e temperatura ótima das três enzimas; α -amilase dextrinizante, amilase sacarificante e glucoamilase assim como a estabilidade das mesmas frente a variações de pH e temperatura, efeitos de íons, preferência por diferentes substratos e identificação dos produtos de hidrólise.



5.1- Efeito do pH sobre a atividade das amilases

A determinação das características físico-químicas das enzimas envolvidas em processos biotecnológicos faz-se importante, tendo em vista a otimização da atividade das mesmas, com possibilidades para futuras aplicações em escala industrial. Sabe-se que a catálise enzimática apresenta limites bastante estreitos de pH. Cada enzima apresenta um pH ótimo de atuação, o qual está diretamente relacionado com a conformação tridimensional nativa que é influenciada pelo pH e por íons presentes na solução.

O pH ótimo para a atividade de α -amilase foi 4,5 (Fig. 9 A); no entanto, 95% dessa atividade foi observada em pH 4,0 e 93% em pH 5,0. Dados da literatura mostram que os pHs ótimos de atividade das enzimas da maioria dos fungos variam de ácidos a neutros. Para a atividade sacarificante, quantificada pela liberação de açúcar redutor (Fig. 9 B), observa-se que o pH ótimo de atividade foi 5,0. Nota-se ainda que essa atividade permanece em 95% em pH 5,5 e 88% em pH 6,0. Ronaszek e outros (2000) descreveram uma α -amilase de *A. terreus* com um pH ótimo de atividade 5,0. Esse mesmo pH foi determinado para a atividade de α -amilase de *T. lanuginosus*, *A. oryzae* (RONASZEK et al., 2001; FRANCIS et al., 2003), respectivamente.

Uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* apresentou um pH ótimo de atividade em torno de 5,5 (WANDERLEY et al., 2004), enquanto que Carlsen e colaboradores determinaram um pH ótimo de atividade em 6,0 para α -amilase de *A. oryzae*. O pH



ótimo determinado para a atividade de α -amilase de *Mucor pusillus* encontra-se entre 3,5 e 4,0 (SOMKUTI e STEINBERG 1980).

Moreira e outros (1999) determinaram que a atividade ótima para amilases produzidas por *A. tamaritii* encontrava-se na faixa de pH de 4,5 a 6,0.

A atividade de glucoamilase (Fig. 9 C) foi máxima em pH 4,5. Esses dados coincidem com aqueles apresentados para as glucoamilases de *A. terreus* (ALI; HOSSAIN, 1990), *A. terreus* NA-170 (GHOSH et al., 1991) e *Aspergillus* sp (ELLAIAH et al., 2002). Por outro lado Taylor e outros (1978) e Cereia e outros (1999) determinaram um pH ótimo de 6.6 para glucoamilase de *Humicola lanuginosa* e pH 6,0 para glucoamilase de *Scytalidium thermophilum*, respectivamente.

O pH ótimo para a atividade de glucoamilase foi o mesmo determinado para a atividade de α -amilase, porém não coincidiu com o apresentado para atividade de amilase sacarificante quantificada pela liberação de açúcares redutores totais, sugerindo, que, além da glicose, outros açúcares redutores estão presentes no hidrolisado enzimático. Esses dados indicam a presença de uma terceira enzima sacarificante, uma possível α -amilase sacarificante ou até mesmo uma β -amilase, cuja presença não é comum em fungos. Nota-se ainda que além das diferenças nos pH ótimos, os perfis de respostas das enzimas, em função da variação do pH de reação, foram também distintos entre si.

Figura 9: Efeito do pH na atividade das amilases
(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase.



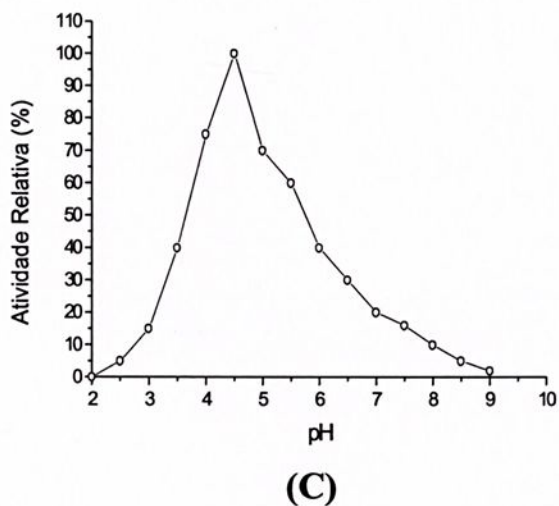
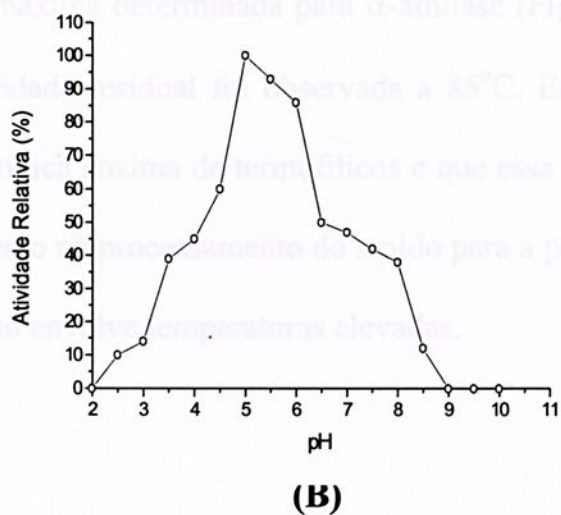
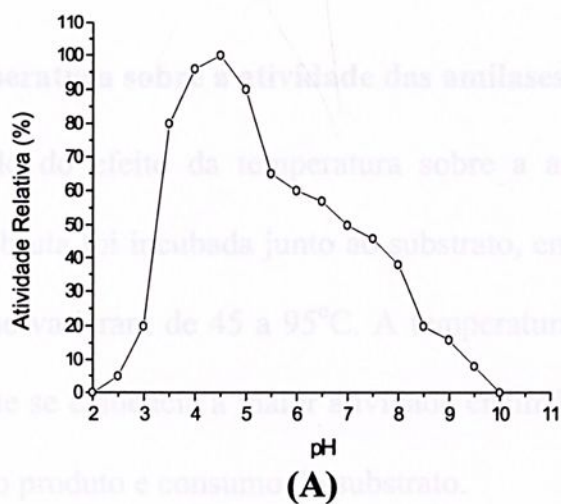


Figura 9: Efeito do pH na atividade das amilases

(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase.

5.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das amilases

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas, a solução enzimática bruta foi incubada junto ao substrato, em pH ótimo de atividade, em temperaturas que variaram de 45 a 95°C. A temperatura ótima é definida como sendo aquela em que se evidencia a maior atividade enzimática e conseqüentemente a maior formação do produto e consumo do substrato.

A atividade máxima determinada para α -amilase (Fig. 10 A) ocorreu a 75°C, porém 80% de atividade residual foi observada a 85°C. Esses dados mostram que essa enzima é uma típica enzima de termofilicos e que essa característica a torna um importante instrumento no processamento do amido para a produção de xaropes, uma vez que este processo envolve temperaturas elevadas.

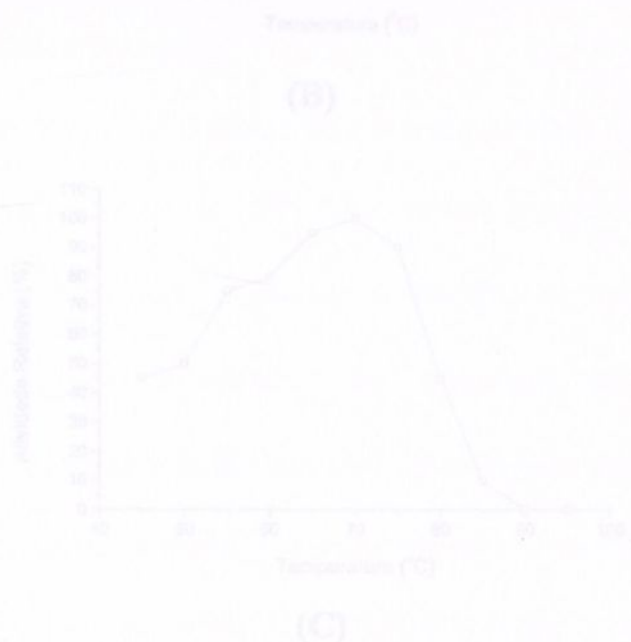
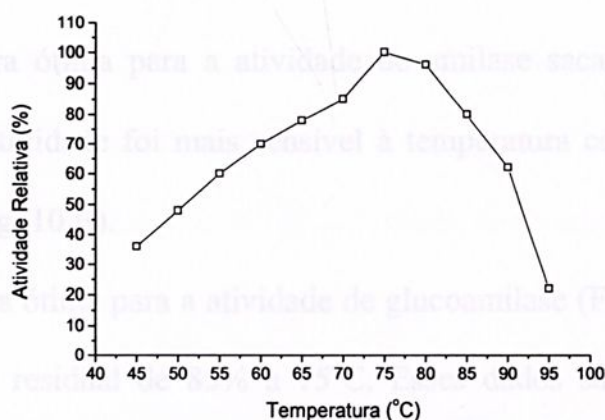
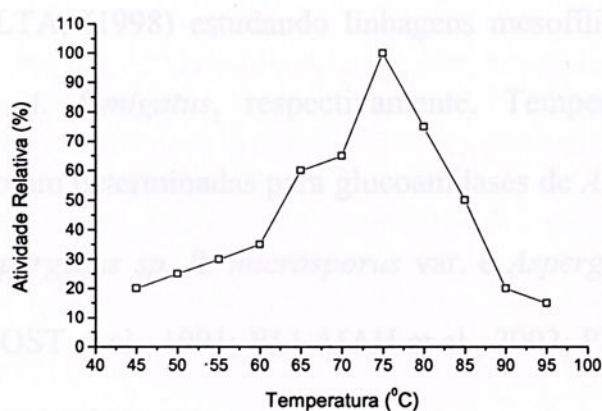


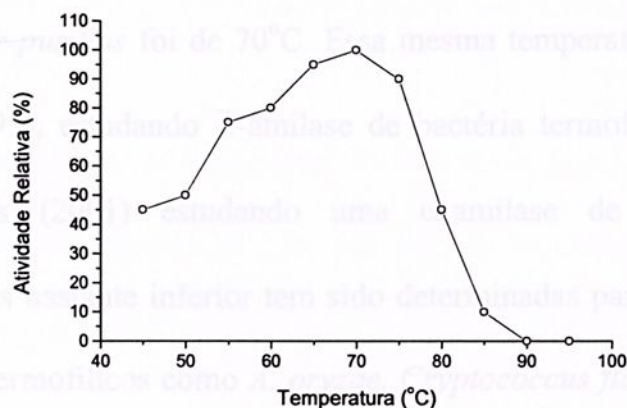
Figura 10: Efeito da temperatura sobre a atividade das amilases
(A) atividade de α -amilase (B) atividade salivar (C) atividade de Glicocamilase.



(A)



(B)



(C)

Figura 10: Efeito da temperatura sobre a atividade das amilases

(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de Glucoamilase.

A temperatura ótima para a atividade de amilase sacarificante também foi 75°C, porém essa atividade foi mais sensível à temperatura com perda de 25% de atividade a 80°C (Fig. 10 B).

A temperatura ótima para a atividade de glucoamilase (Fig. 10 C) foi de 70°C com uma atividade residual de 85% a 75°C. Esses dados são superiores àqueles determinados por ALI; HOSSAIN, (1991), por GHOSH e colaboradores, (1991) e por SILVA; PERALTA, (1998) estudando linhagens mesofílicas de *A. terreus*, *A. terreus* NA-170 e *A. fumigatus*, respectivamente. Temperaturas de atividade inferiores também foram determinadas para glucoamilases de *A. terreus* CTC 826, *A. terreus* NA 170, *Aspergillus* sp, *R. microsporus* var. e *Aspergillus* sp AS-2 (ALI e HOSSAIN, 1991; HOST et al., 1991; ELLAIAH et al., 2002; PEIXOTO et al., 2003; SONI et al., 2003), respectivamente.

Somkuti e Steinberg (1980) relataram que a temperatura ótima de atividade de α -amilase de *Mucor pusillus* foi de 70°C. Essa mesma temperatura foi relatada por Shaw e outros (1995), estudando α -amilase de bactéria termofílica *Thermus* sp e Stamford e outros (2001) estudando uma α -amilase de *Nocardiopsis* sp. Temperaturas ótimas bastante inferior tem sido determinadas para a atividade de α -amilase de fungos termofílicos como *A. oryzae*, *Cryptococcus flavus* e *A. tamarii* em 50, 50 e 55°C (FRANCIS et al., 2003; WANDERLEY et al., 2004; MOREIRA et al., 1999).



A mesma temperatura de atividade ótima foi determinada por Ronaszek e outros, (2000) para atividade de glucoamilase do fungo termofílico *T. lanuginosus* e por Stamford e outros (2002) estudando glucoamilase de *Streptosporangium* sp.

5.3- Estabilidade das amilases frente a variações de pH em ausência de substrato

Após a determinação do pH e temperatura ótimos para atividade das enzimas, foram feitos testes para determinar a estabilidade das enzimas frente à variações de pH, em ausência de substrato. O extrato enzimático foi incubado em tampão sob diferentes pHs, que variavam de 3 a 10 durante 24 horas. Os resultados são mostrados na Figura 11.

Analisando os resultados obtidos (Fig. 11 A), nota-se que a α -amilase mostrou-se 100% estável nos pHs 3,0 e 4,0, mantendo 80% até pH 9,0 e 70% em pH 10,0.

Quanto à atividade sacarificante (Fig. 11 B) nota-se que a mesma mostrou um perfil de sensibilidade à variação de pH diferente da α -amilase, preservando sua atividade máxima na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, 90% de atividade em pH 7,0 e 60% em pH 10,0.

As amilases de *Thermosipho* sp (BI-430) estudadas por Legin e outros (1997) apresentaram estabilidade na faixa de pH de 4,6 a 8,0. As α -amilases de *A. oryzae*, *A. tamarii* e *T. lanuginosus* ATCC 34626 permaneceram estáveis em pHs entre (5,0 e



7,0), (4,0 e 7,0) e (5,5 e 9,0) (CARLSEN et al., 1996; MOREIRA et al., 1999 e NGUYEN et al., 2002), respectivamente.

A glucoamilase demonstrou alta sensibilidade à variação de pH. A atividade máxima foi verificada entre pHs 4,0 e 5,0 e somente 60% de atividade detectada em 6,0 (Fig. 11 C). Glucoamilases produzidas pelas linhagens de *A. terreus* NA170 (HOSH et al., 1991) e GTC826 (ALI; HOSSAIN, 1991) demonstraram estabilidade na faixa de 3,0 a 7,0, semelhante a faixa de estabilidade para as amilases produzidas por *A. tamaritii* (MOREIRA, 1999).



Figura 11: Efeito do pH sobre a estabilidade das amilases
(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase.

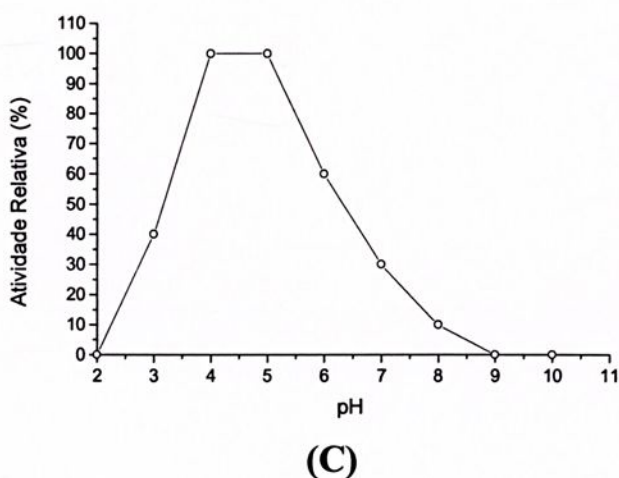
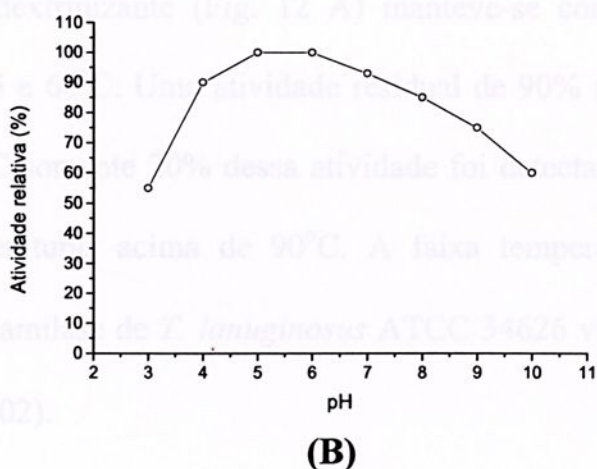
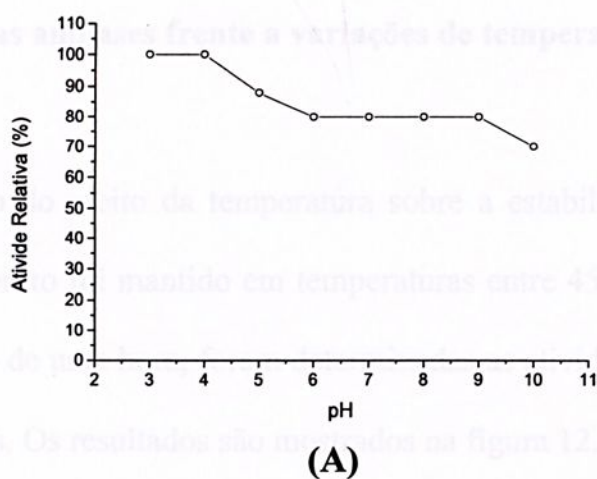


Figura 11: Efeito do pH sobre a estabilidade das amilases

(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase.

5.4- Estabilidade das amilases frente a variações de temperatura em ausência de substrato

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas, o extrato enzimático bruto foi mantido em temperaturas entre 45 e 90°C, em ausência de substrato. Depois de uma hora, foram determinadas as atividades residuais em pH e temperatura ótimos. Os resultados são mostrados na figura 12.

A atividade dextrinizante (Fig. 12 A) manteve-se conservada na faixa de temperatura entre 45 e 60°C. Uma atividade residual de 90% foi observada a 65°C, enquanto que a 90°C somente 20% dessa atividade foi detectada. Não foi detectada atividade em temperaturas acima de 90°C. A faixa temperatura de estabilidade determinada para α -amilase de *T. lanuginosus* ATCC 34626 variou entre 45 e 55°C (NGUYEN et al., 2002).

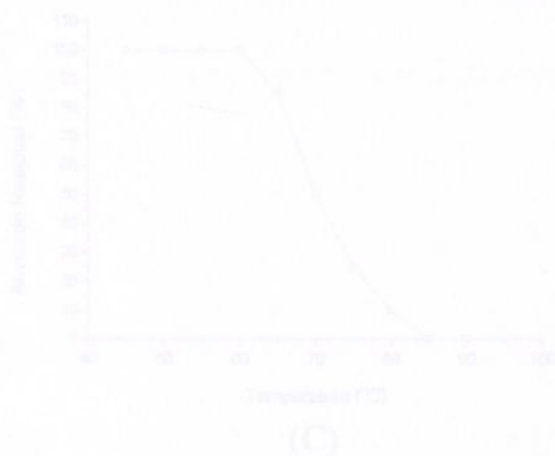
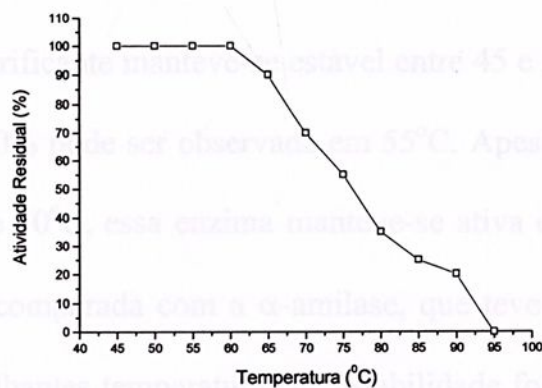
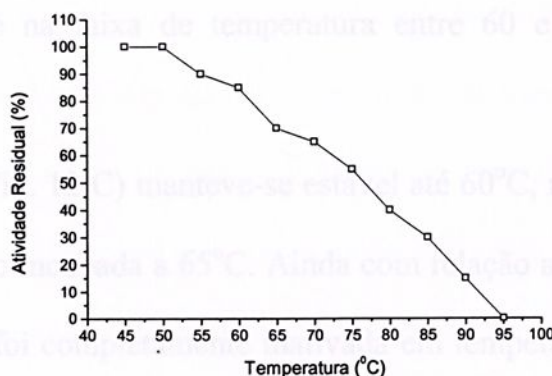


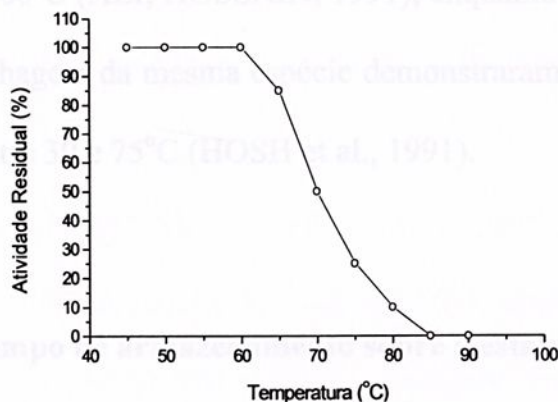
Figura 12: Efeito da temperatura na estabilidade das amilases.
(A) atividade de α -amilase (B) atividade salivária (C) atividade de glucoamilase.



(A)



(B)



(C)

Figura 12: Efeito da temperatura na estabilidade das amilases

(A) atividade de α -amilase (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase.

A atividade sacarificante manteve-se estável entre 45 e 50°C (Fig. 12 B). Uma atividade residual de 90% pode ser observada em 55°C. Apesar da pequena faixa de estabilidade, entre 45 e 50°C, essa enzima manteve-se ativa dentro de um intervalo maior de temperatura comparada com a α -amilase, que teve uma queda acentuada entre 60 e 70°C. Semelhantes temperaturas de estabilidade foram determinadas para α -amilase de *A. tamarii* (MOREIRA et al., 1999). Uma α -amilase de *M. pusillis* apresentou estabilidade na faixa de temperatura entre 60 e 65°C (SOMKUTI e STEINBERG, 1980).

A glucoamilase (Fig. 12 C) manteve-se estável até 60°C, retendo uma atividade residual de 85% quando incubada a 65°C. Ainda com relação a glucoamilase nota-se também que a mesma foi completamente inativada em temperaturas acima de 80°C. As glucoamilases produzidas por *A. terreus* GTC826 mostraram estabilidade na faixa de temperatura de 40 a 60°C (ALI; HOSSAIN, 1991), enquanto que as glucoamilases produzidas por uma linhagem da mesma espécie demonstraram estabilidade em uma faixa de temperatura entre 30 e 75°C (HOSH et al., 1991).

5.5- Efeito do tempo de armazenamento sobre a estabilidade das enzimas

Esta etapa do trabalho foi realizada com o intuito de avaliar um possível efeito do tempo de armazenamento do extrato enzimático bruto sobre a estabilidade das enzimas. Para o ensaio foi utilizado extrato enzimático obtido em 48 horas de cultivo, sob condições ideais de pH inicial e temperatura de cultivo, tendo farelo de mandioca



como fonte de carbono. O extrato enzimático bruto foi mantido congelado, sob refrigeração a uma temperatura de 7°C e à temperatura ambiente, por 12 semanas. A cada semana foram medidas atividades pelos três métodos (dextrinizante, quantificação de açúcares redutores liberados e glucoamilase). Os resultados são mostrados na figura 13.

Pode-se observar que não houve alterações significativas nas atividades das enzimas (dextrinizante, atividade sacarificante e glucoamilase) quando estas foram armazenadas sob congelamento e temperatura ambiente, ao longo de 12 semanas.

Sabe-se que algumas soluções, quando expostas ao congelamento, podem sofrer alterações no que diz respeito a mudanças no comportamento de seus constituintes. Uma separação entre a água e solutos presentes em uma solução, tendem a fazer com que os solutos se concentrem. Uma possível concentração das proteínas presentes na solução durante o congelamento poderia provocar à desnaturação das mesmas. Entretanto, esse efeito do congelamento não foi observado para as enzimas amilolíticas.

De um modo geral, a estabilidade demonstrada pelas enzimas amilolíticas presentes no extrato enzimático, depois de congeladas e à temperatura ambiente, por um período de tempo relativamente grande, constituiu em uma característica importante apresentada por essas enzimas. Por outro lado, a atividade das amilases, quando mantidas a 7°C (em geladeira) foi acentuadamente reduzida após a primeira semana de estocagem.



A atividade dextrinizante foi estável somente por uma semana, perdendo 30% de sua atividade depois de duas semanas, 70% depois de três semanas e sendo completamente inativada depois de 5 semanas. Resultados semelhantes foram observados para a estabilidade de amilase sacarificante, que manteve-se estável por uma semana e perdeu 30% de atividade já na segunda semana. Uma completa inativação pode ser observada depois de 6 semanas.

A glucoamilase foi a que demonstrou mais susceptibilidade ao efeito da manutenção em geladeira. Na primeira semana, a enzima já apresentou uma queda de 20% em sua atividade, e na segunda semana a queda foi de 30%. Na terceira semana, a enzima apresentou 50% de atividade original, e uma completa inativação ocorreu depois de 6 semanas.

A inativação de uma enzima em solução pode ser resultado de diversos fatores como a desorganização de sua estrutura, ação de proteases ou interferência de inibidores. Entretanto, como a temperatura de 7°C contribuiu para o aumento desse processo de inativação, permanece inexplicado.

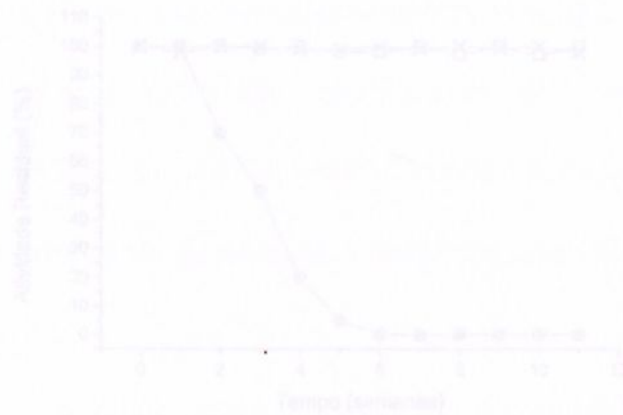
O resultado obtido reforça mais ainda a idéia de que possa haver uma enzima com atividade sacarificante, diferente da glucoamilase. Observa-se através da figura 13, que a estabilidade de amilase sacarificante cai a partir da primeira semana, enquanto que a glucoamilase perde parte de sua atividade já na primeira semana.

Ainda com relação aos resultados observados para a estabilidade das enzimas sob as três condições avaliadas, nota-se que as três enzimas apresentaram o mesmo perfil de estabilidade. As três enzimas permaneceram estáveis quando mantidas sob

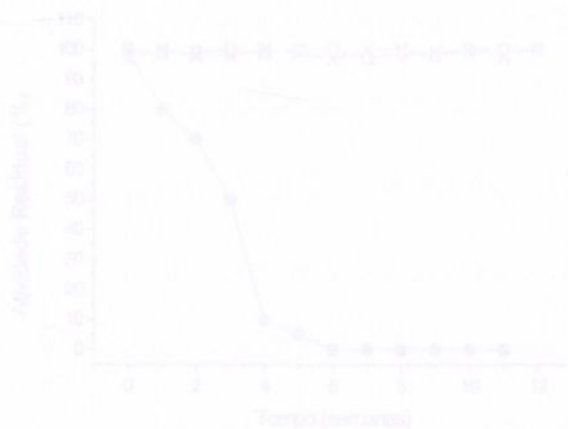


condições de congelamento e a temperatura ambiente (+ ou - 25°C), e foram susceptíveis a desestabilização quando mantidas a 7°C, sugerindo que as três enzimas em questão podem estar sujeitas aos mesmos fatores desestabilizantes.

De forma geral, através de nossos ensaios não foi possível determinar qual ou quais fatores estariam atuando para a desestabilização das enzimas. Para que se possa conhecer um pouco mais sobre os mesmos seria necessária a purificação das enzimas.

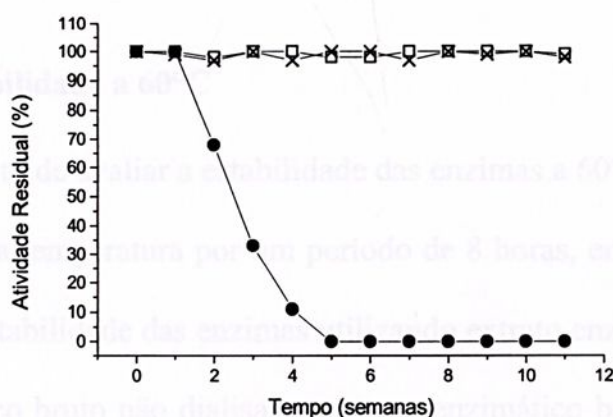


(B)

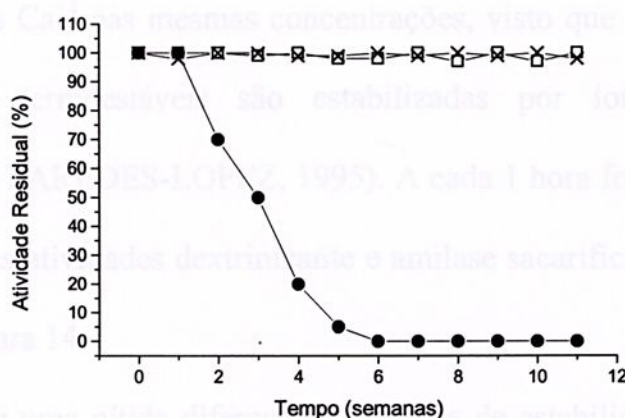


(C)

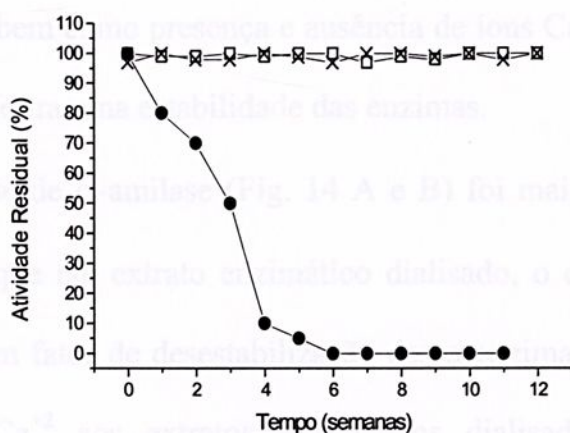
Figura 13 Efeito do tempo de armazenamento sob a estabilidade das enzimas. (A) estabilidade de α -amilase (B) estabilidade de amilase racarificante (C) estabilidade de glucamilase. —○— congelada; —●— temperatura de 7°C; —*— temperatura ambiente.



(A)



(B)



(C)

Figura 13 Efeito do tempo de armazenamento sob a estabilidade das enzimas.

(A) estabilidade de α-amilase (B) estabilidade de amilase sacarificante (C) estabilidade de glucoamilase. — □ — congelada; — ● — temperatura de 7°C; — × — temperatura ambiente.

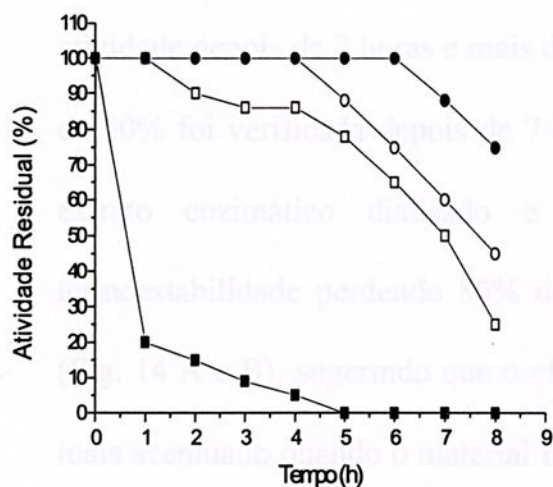
5.6- Estabilidade a 60°C

Com o intuito de avaliar a estabilidade das enzimas a 60°C, o extrato enzimático foi mantido nessa temperatura por um período de 8 horas, em ausência de substrato. Foi avaliado a estabilidade das enzimas utilizando extrato enzimático bruto dialisado, extrato enzimático bruto não dialisado, extrato enzimático bruto dialisado acrescido de íons Ca^{+2} em concentrações de 5 e 10 mM e extrato enzimático não dialisado acrescido de íons Ca^{+2} nas mesmas concentrações, visto que a literatura mostra que várias amilases termoestáveis são estabilizadas por íons Ca^{+2} (GUZMÁN-MALDONADO: PAREDES-LOPEZ, 1995). A cada 1 hora foram retiradas alíquotas para a medida das atividades dextrinizante e amilase sacarificante. Os resultados são mostrados na figura 14.

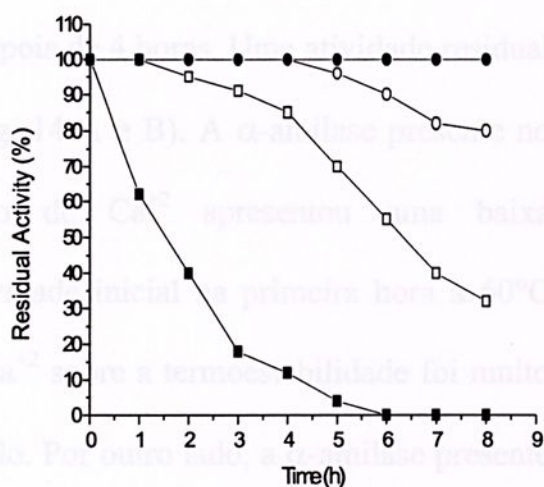
Observou-se uma nítida diferença nos perfis de estabilidade apresentados para α -amilase dextrinizante e amilase sacarificante. Fatores como a diálise do extrato enzimático bruto, bem como presença e ausência de íons Ca^{+2} , em ambos os extratos enzimáticos, interferiram na estabilidade das enzimas.

A estabilidade de α -amilase (Fig. 14 A e B) foi maior em extrato enzimático não dialisado do que em extrato enzimático dialisado, o que mostra que a própria diálise constitui um fator de desestabilização dessa enzima. Nota-se que o efeito da adição de íons Ca^{+2} aos extratos enzimáticos dialisado e não dialisado, nas concentrações de 5 e 10 mM, levou um perfil de estabilidade ainda mais diferenciado.

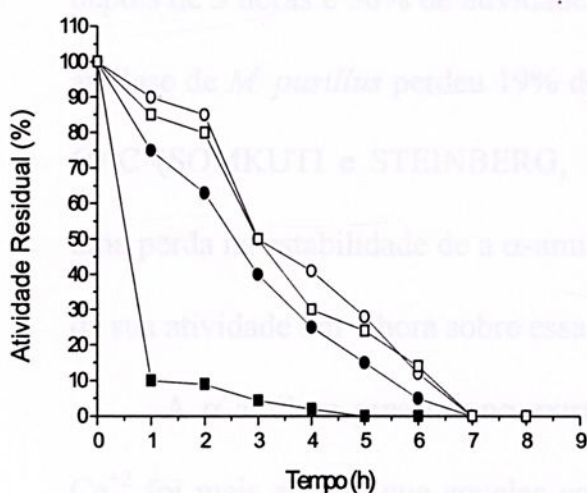




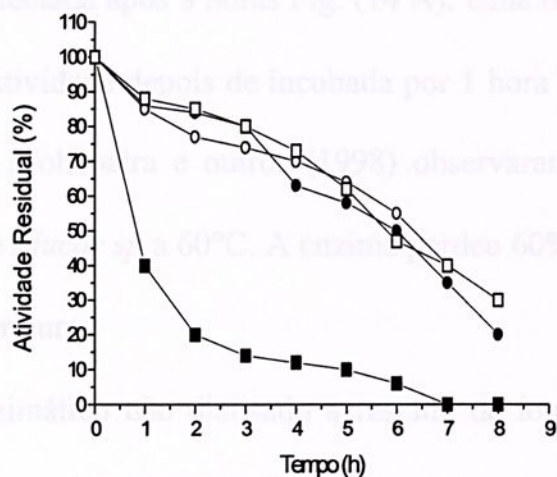
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 14: Estabilidade de α -amilase e amilase sacarificante a 60°C.

(A) estabilidade de α -amilase utilizando 5 mM de Ca^{+2} (B) estabilidade de α -amilase utilizando 10 mM de Ca^{+2} (C) estabilidade de amilase sacarificante utilizando 5 mM de Ca^{+2} e (D) estabilidade de amilase sacarificante utilizando 10 mM de Ca^{+2} . — □ — extrato enzimático dialisado sem Ca^{+2} ; — ■ — extrato enzimático dialisado com Ca^{+2} — ○ — extrato enzimático não dialisado sem Ca^{+2} — ● — extrato enzimático não dialisado com Ca^{+2}

A α -amilase dextrinizante presente no extrato enzimático dialisado e sem íons Ca^{+2} , mostrou-se estável depois de uma hora a 60°C , retendo mais de 90% de atividade depois de 2 horas e mais de 85% depois de 4 horas. Uma atividade residual de 50% foi verificada depois de 7 horas (Fig. 14 A e B). A α -amilase presente no extrato enzimático dialisado e acrescido de Ca^{+2} apresentou uma baixa termoestabilidade perdendo 80% de sua atividade inicial na primeira hora a 60°C (Fig. 14 A e B), sugerindo que o efeito do Ca^{+2} sobre a termoestabilidade foi muito mais acentuado quando o material foi dialisado. Por outro lado, a α -amilase presente no extrato enzimático não dialisado e sem íons Ca^{+2} mostrou-se bastante estável. A enzima manteve 100% de sua atividade depois de 4 horas a 60°C , mais de 90% depois de 5 horas e 50% de atividade foi detectada após 8 horas Fig. (14 A). Uma α -amilase de *M. pusillus* perdeu 19% de sua atividade depois de incubada por 1 hora a 60°C (SOMKUTI e STEINBERG, 1980). Mohapatra e outros (1998) observaram uma perda na estabilidade de a α -amilase de *Mucor sp* a 60°C . A enzima perdeu 60% da sua atividade em 1 hora sobre essa temperatura.

A α -amilase presente no extrato enzimático não dialisado acrescido de íons Ca^{+2} foi mais estável que aquelas contidas em extrato enzimático bruto dialisado e não acrescidos de íons Ca^{+2} (Fig. 14 A e B). A enzima manteve 100% da atividade depois de 6 horas em concentração de 5 mM de íons Ca^{+2} e 100% de atividade depois de 8 horas na presença de 10 mM do íon junto ao extrato enzimático.



As enzimas sacarificantes presentes no extrato enzimático bruto apresentaram estabilidade muito inferior àquela observada para a α -amilase (Fig. 14 C e D). Em todas as condições analisadas as enzimas perderam estabilidade já nas primeiras horas a 60°C. Uma amilase de *A. oryzae* perdeu 75% de sua atividade após 1 hora a 60°C (KUNDU e DAS, 1970). Peixoto e outros (2003) observaram uma queda de 50% na estabilidade de uma amilase de *R. microsporus* var depois de 1 hora a 60°C.

Assim como nos experimentos realizados para α -amilase, as enzimas presentes no extrato enzimático dialisado foram menos estáveis que aquelas presentes no extrato não dialisado, mostrando que, a diálise do extrato enzimático bruto por si só, constituiu um fator para a desestabilização da enzima.

As enzimas sacarificantes presentes no extrato enzimático dialisado, assim como a α -amilase foram fortemente desestabilizadas na presença de íons Ca^{+2} , já as enzimas sacarificantes contidas no extrato enzimático não dialisado, e acrescido de Ca^{+2} não sofreram interferência do íon em sua estabilidade. Esses resultados mostram que as enzimas sacarificantes presentes no extrato enzimático não requerem íons Ca^{+2} para a estabilização, e que a combinação entre diálise do extrato enzimático e presença de íons Ca^{+2} , assim como para α -amilase também desfavoreceu a estabilidade dessa enzima.

Soni e outros (2003) observaram uma diferença na estabilidade de glucoamilase de *Aspergillus* AS-2 quando incubada na presença de íons Ca^{+2} . A enzima perdeu



80% de atividade depois de 30 minutos a 60°C sem a presença do íon, e na presença de 10 mM do íon, a atividade residual foi 20% maior.

Os resultados apresentados para a estabilidade das enzimas, principalmente aqueles referentes a α -amilase, são de extrema importância, levando em conta o tempo em que essa enzima permaneceu estável em uma temperatura de 60°C, o que mostra que essa enzima poderá atuar por um período de tempo maior, em processos que necessitam de temperaturas mais elevadas. Cabe aqui ainda destacar que a maioria das enzimas fúngicas mostradas na literatura não apresentaram termoestabilidade tão significativa, comparados com os obtidos para essa enzima.

5.7- Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade amilolítica

5.7.1- Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases

Para avaliar um possível efeito do Ca^{+2} sobre as atividades das enzimas produzidas em nossos ensaios, foram testadas soluções enzimáticas brutas dialisada contra tampão acetato 10 Mm, pH 5,0, contendo EDTA e não dialisada (meio de cultivo livre de micélio).

O perfil de atividade enzimática observada nos três métodos de determinação enzimática, em presença de Ca^{+2} nas concentrações, que variam de 2 a 60 mM, são mostrados na Figura 15.

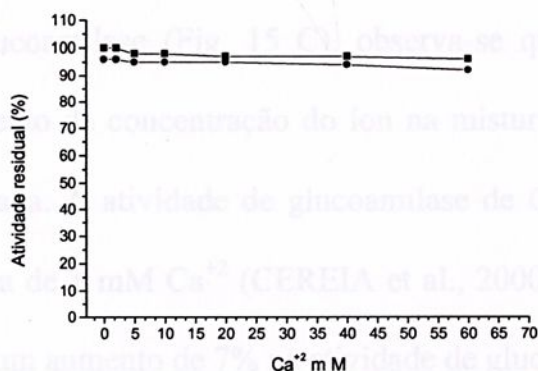


Nota-se que a atividade de α -amilase (Fig. 15 A) permaneceu praticamente constante em todas as concentrações testadas para as amostras dialisada e não dialisada, o que indica que a enzima não é influenciada por esse íon. Mohapatra e outros (1998) observaram que, a atividade de α -amilase de *Mucor* sp não era influenciada pela adição de íons Ca^{+2} em concentrações inferiores a 10 mM, e que concentrações acima de 10 mM inibia em parte a atividade da enzima.

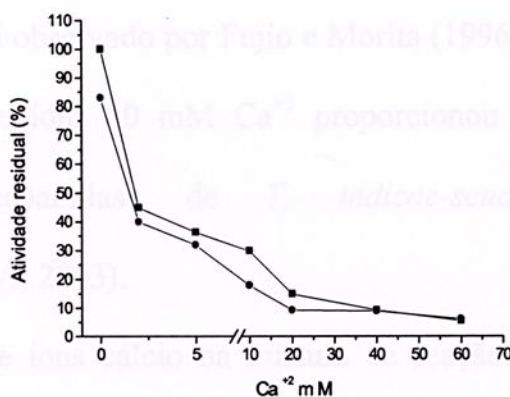
Nugyen e outros (2002) verificaram um aumento de 35% na atividade de α -amilase de *T. lanuginosus* na presença de 10 mM de íons Ca^{+2} . Por outro lado, Somkuti e Steinberg (1980), estudando uma α -amilase de *M. pusillis*, verificaram que essa é completamente inibida por cálcio. As α -amilase de *Cryptococcus flavus* perderam 30% de atividade na presença de 20 mM de Ca^{+2} (WANDERLEY et al., 2003).

A atividade de amilase sacarificante medida pela liberação de açúcar redutor (Fig. 15 B) diminui substancialmente em função do aumento da concentração de Ca^{+2} na mistura de reação, em ambos as amostras enzimáticas, indicando que essas enzimas são inibidas por esse íon.

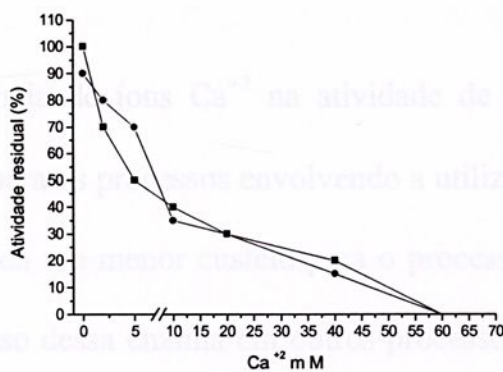
Figura 15: Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases. O fungo *A. pusillus* A13.36 produziu a enzima em 48 horas de fermentação, em meio de cultivo contendo farelo de mandioca como fonte de carbono pH 4,0 a 45°C. (A) atividade desidratante (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase. —●— solução enzimática bruta, —○— solução enzimática bruta dialisada



(A)



(B)



(C)

Figura 15: Efeito da adição de íons Ca^{+2} à mistura de reação, sobre a atividade das amilases.

O fungo *R. pusillus* A13.36 produziu a enzima em 48 horas de fermentação, em meio de cultivo contendo farelo de mandioca como fonte de carbono pH 6,0 a 45°C. (A) atividade dextrinizante (B) atividade sacarificante (C) atividade de glucoamilase. —■— solução enzimática bruta, —●— solução enzimática bruta dialisada

Quanto à glucoamilase (Fig. 15 C), observa-se que a atividade também é inibida com o aumento da concentração do íon na mistura de reação, nas amostras dialisada não dialisada. A atividade de glucoamilase de *C. thermophilum* diminuiu em 70% na presença de 1 mM Ca^{+2} (CEREIA et al., 2000). Por outro, Ali; Hossain (1991) observaram um aumento de 7% na atividade de glucoamilase de *A. terreus* em presença de íons Ca^{+2} e um aumento de 32% na atividade de Glucoamilase de *Rhizopus* sp A-11 foi observado por Fujio e Morita (1996) na presença de 10 mM de Ca^{+2} . A presença de íons 10 mM Ca^{+2} proporcionou um aumento em 45% na atividade de glucoamilase de *T. indicae-seudaticae* (KUMAR e SATYANARAYANA, 2003).

A presença de íons cálcio na mistura de reação também proporcionou um aumento na atividade e estabilidade de glucoamilase de *Aspergillus* sp AS-2 (SONI et al., 2003).

A independência de íons Ca^{+2} na atividade de α -amilase (Fig. 15 A) traz algumas vantagens para os processos envolvendo a utilização dessas enzimas. Dentre elas, podem ser citada um menor custeio para o processo. Esse fato também reflete na importância do uso dessa enzima em outros processos sob condições de escassez de íons Ca^{+2} . Segundo Gupta e outros (2003), uma das limitações do uso de α -amilases em aplicações detergentes, consiste na dependência de íons Ca^{+2} para sua atividade e estabilidade, sendo assim, seu uso ficaria restrito em ambientes com baixas concentrações desse íon.



5.7.2- Efeito da adição de outros íons à mistura de reação, sobre a atividade das amilases

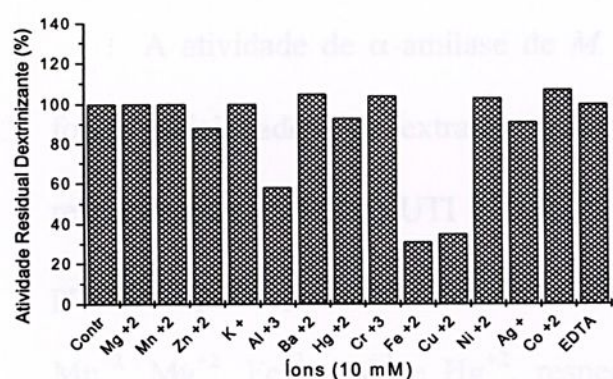
Para o estudo da adição de outros íons à mistura de reação foi seguido o procedimento descrito no item anterior, porém utilizando-se soluções de MgCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 , AgCl_2 , KCl , AlCl_3 , BaCl_2 , CrCl_3 , FeCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 e de EDTA, em concentração suficiente para que a concentração do íon metálico na mistura de reação fosse de 10 mM. Os resultados são mostrados na Figura 16.

A atividade de α -amilase (Fig. 16) não foi alterada pela presença de Mg^{+2} , Mn^{+2} e EDTA, em ambos os extratos enzimáticos dialisado e não dialisado (Fig. 16 A e D) e também não foi alterada na presença de Zn^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} no extrato enzimático bruto dialisado (Fig. 16 D), porém perdeu atividade em 15, 42, 07, 69, 65 e 09% na presença de Zn^{+2} , Al^{+3} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} e Ag^{+2} , respectivamente, no extrato enzimático bruto não dialisado (Fig. 16 A) e em 10, 33, 15, 75, 31, 11 e 03% na presença de íons K^+ , Al^{+3} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} e Cr^{+3} , respectivamente, no extrato enzimático dialisado (Fig. 16 D).

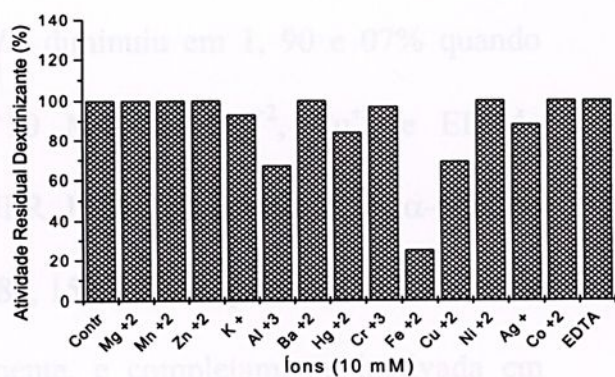
Um aumento na atividade de α -amilase pôde ser verificado na presença de íons Ba^{+2} , Cr^{+2} e Co^{+2} no extrato enzimático dialisado em 06, 04 e 07%, respectivamente (Fig. 16 D). Uma α -amilase de *T. lanuginosus* teve sua atividade aumentada em 12% na presença de Ba^{+2} e 03% na presença de EDTA (NUGYEN et al., 2002).

Figura 16: Efeito da adição de diferentes íons sobre a atividade das amilases. (A), (B) e (C) extrato enzimático bruto, (D), (E) e (F) extrato enzimático dialisado.

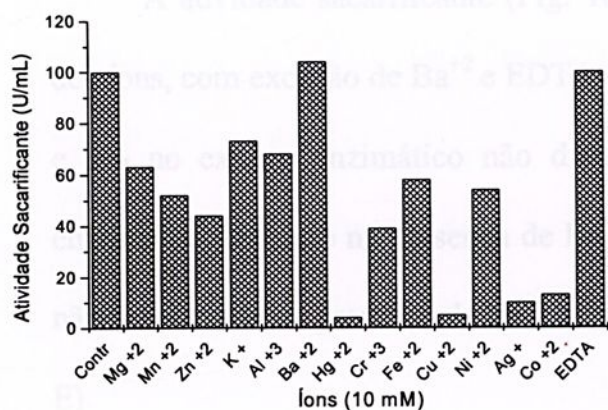




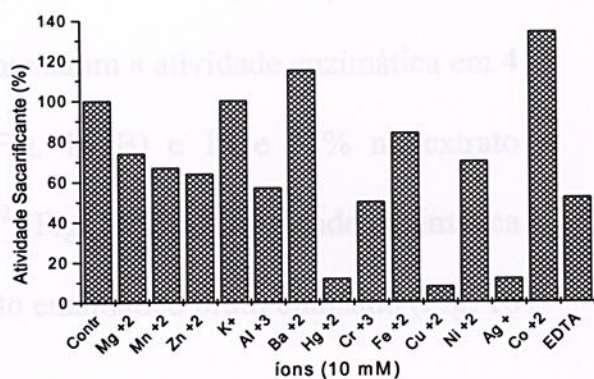
(A)



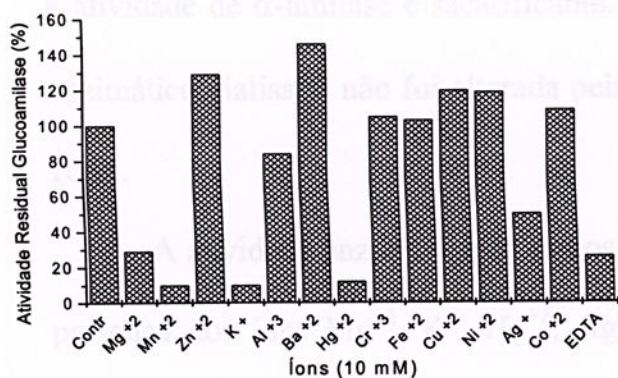
(D)



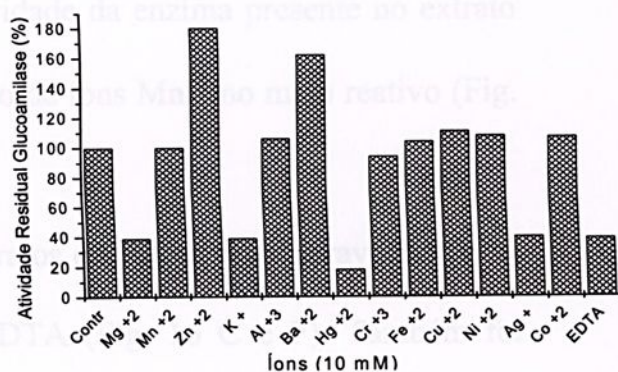
(B)



(E)



(C)



(F)

Figura 16: Efeito da adição de diferentes íons sobre a atividade das amilases. (A), (B) e (C) extrato enzimático bruto, (D), (E) e (F) extrato enzimático dialisado.

A atividade de α -amilase de *M. pusillis* diminuiu em 1, 90 e 07% quando foram adicionados ao extrato enzimático 10 Mm de Mg^{+2} , Cu^{+2} e EDTA, respectivamente (SOMKUTI e STEINBERGER 1980). A atividade de α -amilase produzida por *C. flavus* foi inibida em 04, 05, 80, 15 e 88% na presença de 20 Mm de Mn^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} e Hg^{+2} , respectivamente, e completamente inativada em presença de Cu^{+2} (WANDERLEY et al., 2004).

A atividade sacarificante (Fig. 16 B e E) foi inibida na presença da maioria dos íons, com exceção de Ba^{+2} e EDTA que aumentaram a atividade enzimática em 4 e 3% no extrato enzimático não dialisado (Fig. 16 B) e 15 e 37% no extrato enzimático dialisado na presença de Ba^{+2} e Co^{+2} (Fig. 16 E). A atividade enzimática não foi alterada na presença de íons K^{+} no extrato enzimático bruto dialisado (Fig. 16 E).

O perfil de atividade de glucoamilase (Fig. 16 C e F) foi bastante variado em função da presença dos diferentes íons quando comparados com aqueles obtidos para a atividade de α -amilase e sacarificante. A atividade da enzima presente no extrato enzimático dialisado não foi alterada pela adição de íons Mn^{+2} no meio reativo (Fig. 16 F).

A atividade enzimática de ambos os extratos decresceu consideravelmente na presença dos íons Mg^{+2} , K^{+} , Hg^{+2} , Ag^{+2} e EDTA (Fig. 16 C e F). Também foi verificada um declínio na atividade na presença de Mn^{+2} e Al^{+3} no extrato enzimático não dialisado (Fig. 16 C).



All e Hossain (1991) verificaram um declínio na atividade de glucoamilase de *A. terreus* na presença de Ag^{+2} e Hg^{+2} . Os íons Cu^{+2} , Ni^{+2} em uma concentração de 10 mM inibiram em parte a atividade de glucoamilase de *Rhizopus* sp A-11, enquanto que íons Ag^{+2} inibiram completamente a atividade da enzima (FUJIO e MORITA, 1996). A atividade de glucoamilase de *S. Thermophilum* decresceu na presença dos íons Ba^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} e EDTA (CEREIA et al., 2000). Um declínio na atividade de glucoamilase de *t. indicae-sedaticae* também foi observado na presença dos íons Ni^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} e EDTA (KUMAR e SATYANARAYANA, 2003).

A presença dos íons Zn^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} acarretaram um aumento na atividade de glucoamilase em 29, 46, 05, 03, 20, 19 e 09% no extrato enzimático não dialisado (Fig. 16 C), enquanto que Al^{+3} , Ba^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} proporcionaram um aumento na atividade de glucoamilase no extrato enzimático dialisado em 06, 62, 04, 11, 08 e 07% respectivamente (Fig. 16 F).

Um pequeno aumento na atividade de glucoamilase de *Rhizopus* A-11 foi observado na presença de 10 Mm de íons Cr^{+2} , A^{+3} , Co^{+2} , Ba^{+2} e Mn^{+2} (FUJIO e MORITA, 1996). A presença de íons Ag^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} e Fe^{2+} em uma concentração de 10 mM aumentaram em 45, 29, 15, 59 e 88% respectivamente, a atividade de glucoamilase de *T. indicae-seudaticae* (KUMAR e SATYANARAYANA, 2003)

SONI e colaboradores (2003) observaram que uma concentração de 1 mM de Mg^{+2} aumentava a atividade de glucoamilase de *Aspergillus* sp AS-2 durante o



processo de sacarificação do amido e que concentrações acima de 5 mM desse mesmo íon inibiam a atividade da enzima.

Na tabela 2 a seguir é feita uma síntese do efeito de vários íons sobre a atividade de amilases fúngicas.

Fungo	Íon	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)	Referência
<i>Somclit</i> e <i>Stenbiercher</i> (1960)	Mg ²⁺	10	99	
	Ca ²⁺	10	61	
	Cu ²⁺	10	10	
	EDTA	10	95	
ALL e HOSSAIN (1991)	Mg ²⁺	NM	115	
	Ca ²⁺	NM	107	
	Al ³⁺	NM	<100	
	Hg ²⁺	NM	<100	
FLINO e MORTTA (1986)	Cu ²⁺	10	132	
	Mg ²⁺	10	0	
	Ca ²⁺	10	45	
	Ni ²⁺	10	92	
	Li ⁺	10	79	
	C ⁴⁺	10	111	
	Al ³⁺	10	109	
	Ce ³⁺	10	107	
	Ba ²⁺	10	108	
	Mn ²⁺	10	109	

Tabela 2: Efeito de íons sobre a atividade de algumas amilases fúngicas.

Fungo	Enzima	Íons	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)	Referência
<i>Mucor pusillis</i>	α -amilase	Mg ⁺²	10	99	SOMKUTI e STEINBERGER (1980)
		Ca ⁺²	10	61	
		Cu ⁺²	10	10	
		EDTA	10	93	
<i>Aspergillus terreus</i>	Glucoamilase	Mg ⁺²	NM	115	ALL e HOSSAIN (1991)
		Ca ⁺²	NM	107	
		Ag ⁺	NM	<100	
		Hg ⁺²	NM	<100	
<i>Rhizopus sp A-11</i>	Glucoamilase	Ca ⁺²	10	132	FUJIO e MORITA (1996)
		Ag ⁺	10	0	
		Cu ⁺²	10	55	
		Ni ⁺²	10	99	
		Li ⁺	10	79	
		Cr ⁺⁶	10	111	
		Al ⁺³	10	109	
		Co ⁺²	10	107	
		Ba ⁺²	10	108	
		Mn ⁺²	10	109	

Continuação da tabela 2.



T. 4435/05

Fungo	Enzima	Íons	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)	Referência
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Glucoamilase	Ca ⁺²	1	22,7	CEREIA et al., (2000)
		Cu ⁺²	1	17,2	
		Ba ⁺²	1	20	
		Mn ⁺²	1	21	
		Hg ⁺²	1	25	
		Mg ⁺²	1	20	
		Zn ⁺²	1	24	
		EDTA	1	23	
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α-amilase	Ca ⁺²	10	135	NUGYEN et al., (2002)
		Ba ⁺²	10	112	
		Mn ⁺²	10	100	
		Co ⁺²	10	92	
		Fe ⁺²	10	99	
		Zn ⁺²	10	24	
		EDTA	10	103	

Continuação da tabela 2.

Fungo	Enzima	íons	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%)	Referência
<i>Cryptococcus flavus</i>	α -amilase	Ca ⁺²	20	70	WANDERLEY et al., (2004)
		Cu ⁺²	20	0	
		Mn ⁺²	20	96	
		Mg ⁺²	20	95	
		Fé ⁺²	20	20	
		Zn ⁺²	20	85	
		Hg ⁺²	20	22	
Thermomucor seudaticae	indicae- Glucoamilase	Ca ⁺²	5	145	KUMAR e SATYANARAYANA (2003)
		Ag ⁺²	5	129	
		Cu ⁺²	5	115	
		Ni ⁺²	5	26	
		Co ⁺²	5	159	
		Ba ⁺²	5	79	
		Mn ⁺²	5	69	
		Zn ⁺²	5	0	
		Hg ⁺²	5	47	
		Mg ⁺²	5	89	
		Fé ⁺²	5	188	
		EDTA	5	22	

NM- não mencionado

5.8- Avaliação da atividade amilolítica em diferentes substratos

Esta etapa do presente trabalho consistiu em avaliar o perfil de atividade das amilases quando incubadas em substratos amiláceos, derivados de amido de cadeia curta, substratos sintéticos e sacarose. Foram utilizados como substratos amiláceos; amido de milho, amido de mandioca, amido de batata doce e amido solúvel como controle. Os derivados de amido de cadeia curta utilizados foram maltose, maltotriose, maltotetraose, maltohexaose e maltoheptaose. Para a medida de atividade enzimática sobre substratos sintéticos utilizou-se: ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (α -PNPG), ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (β -PNPG) e p -nitrofenil- α -D-maltosídeo. Para os substratos amiláceos foram medidas as atividades enzimáticas nos três métodos de determinação e para os substratos derivados do amido e sacarose foram medidas as atividades pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados e glucoamilase. Os resultados são mostrados na Figura 17.

As enzimas presentes no extrato enzimático apresentaram boa atividade em todos os substratos amiláceos testados. A atividade de α -amilase (Fig. 17 A) foi maior quando as enzimas foram incubadas com amido de mandioca (12,48 U/mL), seguido de (12,25 U/mL) em amido solúvel comercial. A atividade de α -amilase em amido de milho e de batata foram de 10 e 7,36 U/mL, respectivamente.



A diferença na atividade de α -amilase nos três substratos alternativos de cadeias longas ocorre em função da resistência com que cada amido tem com relação à enzima. O amido de batata demonstrou ser mais resistente ao ataque dessa enzima.

A maior atividade sacarificante (Fig. 17 B) foi detectada em presença de amido solúvel (12,61 U/mL), seguida de 12,06 U/mL na presença de amido de batata como substrato. A menor atividade ocorreu quando o substrato foi o amido de milho (11,00 U/mL). Ainda com relação à atividade de amilase sacarificante, observou-se pouca diferença na atividade da enzima em função dos substratos amiláceos utilizados, e que o amido de mandioca demonstrou uma pequena resistência a ação dessa enzima comparado com os demais substratos alternativos. Não foram detectadas atividades em substratos derivados de amido, o que permite inferir que as enzimas amilolíticas, presentes no extrato enzimático, não atuam em substratos de cadeias curtas (Fig. 17 B).

A atividade de glucoamilase (Fig. 17 C) foi maior sobre o amido de milho (1,55 U/mL), seguida de 1,25 U/mL do amido de mandioca e amido solúvel comercial. A menor atividade foi determinada sobre amido de batata (0,85 U/mL). Segundo Kimura e Robyt (1995), o amido pode ser dividido em três categorias de acordo com suas susceptibilidades a hidrólise por glucoamilases; muito susceptível, dentre eles encontram-se amidos de milho com 100% de amilopectina; moderadamente susceptível, dentre esses se encontram amidos de milho 29% amilose contra 71% amilopectina, amido de mandioca e amido de cevada, e os relativamente resistentes, os quais compreendem os amidos de batata. Os resultados apresentados



na Figura 17 C, para a atividade de glucoamilase, são consistentes com essa classificação. Não foi detectada atividade enzimática em substratos de cadeias curtas, o que reforça a hipótese de que a glicose presente nos hidrolisados, demonstrados em etapas anteriores sejam devidas em boa parte pela ação de glucoamilases, uma vez que a literatura tem mostrado que glucoamilases atuam preferencialmente em substratos de cadeias longas, tais como o amido e amiláceos em geral.

Com relação as diferenças observadas nas atividades de α -amilase sobre os substratos podem também estar relacionadas com a própria estrutura do amido. As enzimas amilolíticas podem ou não atacar o grânulo de amido, conforme o tamanho do grânulo, bem como a organização interna do mesmo e a proporção de amilose. Segundo Tharanathan e outros (1980), a diferença na ação das enzimas amilolíticas sobre os amidos de diferentes fontes, está diretamente relacionada com as diferenças na composição da molécula, em particular no teor de amilose, bem como no comprimento de suas cadeias.

Geralmente, os amidos de cereais apresentam maiores teores de amilose, se comparados com amidos de raízes e tubérculos (batata e mandioca), que contém cerca de 20%. Além disso, as cadeias de amilose dos amidos de cereais em geral, encontram-se associadas a moléculas de lipídios, que diferem no tipo e quantidade. Esse complexo, amilose-lipídeo diminui a susceptibilidade da amilose ao ataque das enzimas (CUI; OATES, 1999).

Outros fatores além dos mencionados podem interferir no mecanismo de ação das amilases sobre os grânulos de amido. Segundo Dreher (1984), a própria



associação entre os componentes do grânulo o torna mais ou menos susceptível ao ataque das enzimas. Outro fator que atua de forma decisiva na atividade das enzimas sobre os grânulos de amido, é a porosidade do mesmo (HUBER; BEMILLER. 1997).

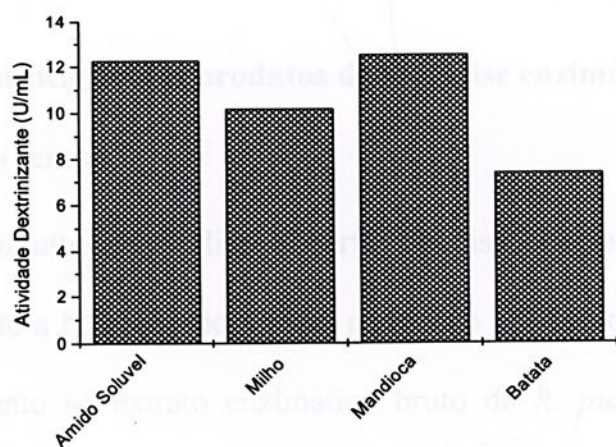
De modo geral, as enzimas demonstraram excelente capacidade de ação nos substratos amiláceos utilizados, o que as tornam muito interessantes para os diversos processos biotecnológicos, as quais estão envolvidas. Um outro fator importante no que diz respeito à transformação da molécula de amido, por essas enzimas, consiste no fato de que os substratos testados provêm de fontes que estão entre as que se prestam como fontes econômica ou comercial para a sua extração.

A utilização de substratos heterogêneos para a medida de atividade enzimática foi feita com o intuito de avaliar uma possível presença de enzimas, tais como a α -glicosidase, com capacidade de hidrolisar esses substratos. De acordo com Sugimoto e colaboradores (2003) as α -glicosidases hidrolisam substratos heterogêneos como α -glucosídeos e sacarose, além de substratos homogêneos como maltooligossacarídeos e α -glucanas, e são classificadas de acordo com a atuação sobre cada um desses substratos. Algumas α -glicosidases podem não apresentar atividade sobre substratos como amido e sacarose, mas apresentar atividade sobre substratos sintéticos como α e β -PNPG (CONSTANTINO et al. 1990).

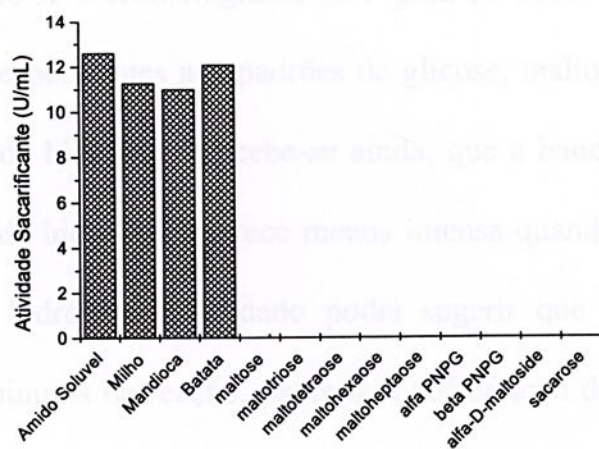
Não houve nenhuma atividade enzimática sobre os substratos sintéticos testados (Fig. 17 B e C). Esses resultados, além de mostrarem que essas enzimas não possuem a capacidade de atuar sobre esses substratos, também descarta a



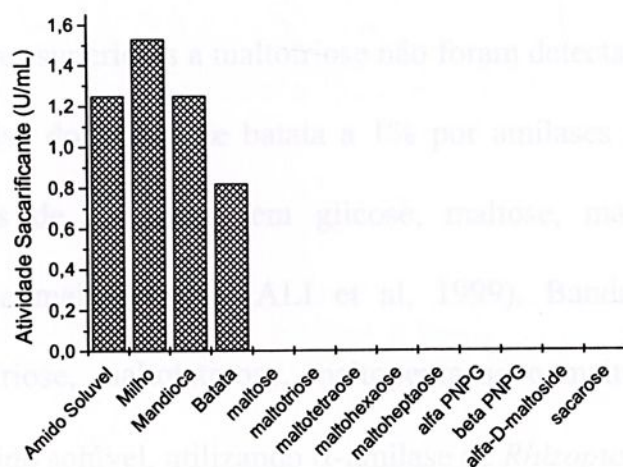
possibilidade da existência de β -amilase junto ao extrato enzimático, uma vez que o p-nitrofenil- α -D-maltosídeo consiste em um substrato específico para a determinação de atividade dessa enzima. Não foi também determinada nenhuma atividade sobre a sacarose tanto pelo método de quantificação de açúcares redutores liberados quanto pelo método de quantificação da glicose liberada.



(A)



(B)



(C)

Figura 17: Efeito de diferentes substratos sobre a atividade das amilases.
(A) atividade de α -amilase **(B)** atividade sacarificante **(C)** atividade de glucoamilase.

5.9- Identificação dos produtos de hidrólise enzimática do amido solúvel a 1% ao longo do tempo

Com o intuito de avaliar o perfil de distribuição dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise do amido, a solução de amido solúvel comercial a 1% foi incubada junto ao extrato enzimático bruto de *R. pusillus* A13.36 obtido em condições ideais de pH e temperatura de meio de cultivo.

Analizando-se o cromatograma da Figura 18 observa-se a presença nítida de três bandas correspondentes aos padrões de glicose, maltose e maltotriose, em 10 e em 30 minutos de hidrólise. Percebe-se ainda, que a banda referente a maltotriose, em 30 minutos de hidrólise, aparece menos intensa quando comparada a obtida em 10 minutos de hidrólise. Esse dado podia sugerir que a maltotriose, depois de decorridos 10 minutos de reação, passaria a sofrer ação de glucoamilases presentes no extrato enzimático, resultando em maltose e glicose. Entretanto, não foi detectada atividade sobre esse triglicerídeo quando testado isoladamente (Fig. 10). Açúcares de pesos moleculares superiores a maltotriose não foram detectados.

A hidrólise do amido de batata a 1% por amilases de *Bacillus* sp (US100) resultou, depois de 72 horas, em glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose (ALI et al, 1999). Bandas referentes à glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose resultantes da hidrólise do amido solúvel, utilizando α -amilase de *Rhizopus* sp foram detectadas por Cruz e colaboradores (1997).



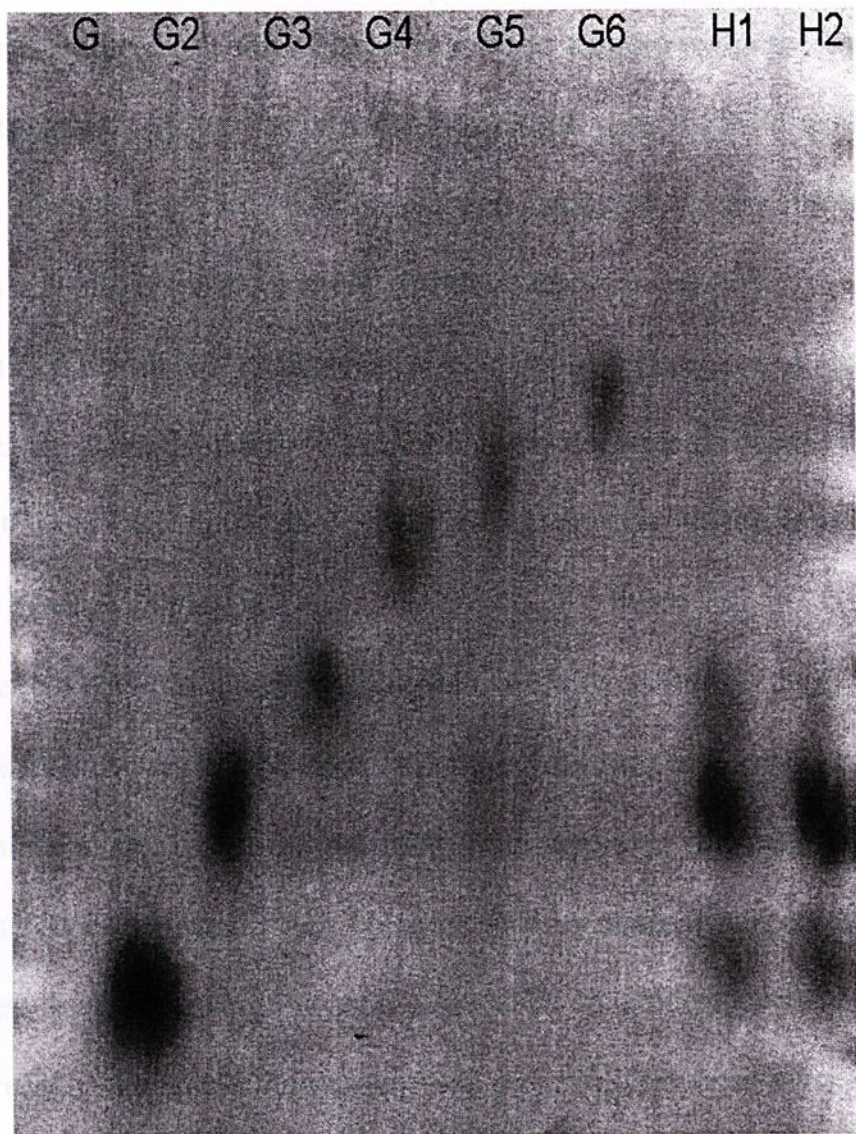


Figura 18: Cromatografia descendente em papel Whatman nº1 dos produtos de hidrólise do amido solúvel a 1% tratado com extrato enzimático de *Mucor* sp A13.36.

G= glicose, G2= maltose, G3= maltotriose, G4= maltotetraose, G5= maltopentose, G6= maltoexaose, H1= hidrolisado 10 min., H2= hidrolisado 30 min.

Com o intuito de avaliar não só um perfil qualitativo, mas também o perfil quantitativo de açúcares redutores liberados durante a hidrólise, uma cromatografia líquida foi realizada. Um estudo quantitativo nos dá uma idéia de quais açúcares estão sendo liberados e em quais proporções esses açúcares aparecem como resultados da ação das enzimas contidas no extrato enzimático.

Analisando os dados da Tabela 3, nota-se que ocorreu um aumento nas concentrações de glicose, maltose e maltotriose no decorrer do tempo de hidrólise enzimática. Observa-se ainda que, 96% do amido inicial foi hidrolisado nos primeiros 60 minutos de reação.

Dentre os 96% do amido hidrolisado, 64% constitui-se de glicose, 19% maltose e 7% maltotriose. Maltotetraose foi detectada em pequenas quantidades, em 10 e 30 minutos de hidrólise, enquanto que açúcares maiores ou iguais a maltopentaose foram detectados em todos os tempos analisados, porém em baixas concentrações. Soni e outros (2003) obtiveram 86% de amido hidrolisado depois de 24 horas de reação utilizando amilases de *Bacillus* sp. AS-1 e *Aspergillus* sp. AS-2.

A hidrólise total do amido foi detectada em 240 horas, sendo que os produtos constituem-se de 66% glicose, 19,5% maltose e 7,7% de maltotriose. Os 6,6% restantes correspondem a açúcares maiores que maltopentaose os quais não puderam ser identificados. A ação de glucoamilases produzidas pelo fungo termofílico *T. lanuginosus* sobre o amido de batata resultou depois de 24 horas em um hidrolisado contendo 76% de glicose (MISHRA; MAHESHWARI, 1996).



Tabela 3: Cromatografia líquida dos produtos de hidrólise do amido solúvel a 1% tratado com extrato enzimático de *Rhizomucor pusillus* A 13.36.

Tempo de hidrólise (min.)	Produto									
	Glicose %	Conc. (mg/mL)	Maltose %	Conc. (mg/mL)	Triose %	Conc. (mg/mL)	Tetrose %	Conc. (mg/mL)	≥ M5 %	Conc. (mg/mL)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	14	2,41	4,5	0,76	2,6	0,45	0	0,01	3,3	0,56
30	19	3,24	8,4	1,41	4	0,69	1,4	0,23	0,1	0,016
60	64	10,78	19	3,19	7	1,23	—	—	6	1,00
240	66	11,15	19,5	3,30	7,7	1,31	—	—	6,6	1,11

Os produtos de hidrólise detectados através das cromatografias de papel e líquida, revelam um alto poder de ação das enzimas contidas no extrato enzimático tendo em vista um tempo de hidrólise relativamente curto. Comparando os dados obtidos nas duas cromatografias, observa-se uma diferença na tonalidade das bandas de glicose e maltose na cromatografia de papel, o que sugeriria uma maior concentração de maltose no hidrolisado. Essa maior concentração, entretanto, não foi confirmada pela cromatografia líquida. Essa tonalidade acentuada da banda de maltose em comparação com a banda de glicose pode estar relacionada com uma maior afinidade entre maltose e os corantes utilizados na revelação.

Em geral, com base nos resultados podemos concluir que as enzimas presentes no extrato enzimático apresentaram um excelente poder de ação sobre o amido. Um outro fator importante a ressaltar é que essas enzimas não mostraram nenhum tipo de repressão em função da presença em grande quantidade de produto formado durante a hidrólise.



6- Hidrólise do amido de milho e mandioca a 25% para a produção de xarope

Esta etapa do trabalho consistiu em avaliar o efeito das enzimas contidas no extrato enzimático bruto, na hidrólise do amido de milho e mandioca. Para estes ensaios suspensões de amido, a 25% (p/p), em base seca, foram submetidas a ação das enzimas contidas no extrato enzimático bruto, obtido a partir de meio de cultivo contendo farelo de mandioca como fonte de carbono, nas melhores condições de pH inicial de meio de cultivo e temperatura, definidos anteriormente. A hidrólise ocorreu em pH 5,0 a 80 e 90°C durante 1 e duas horas e foi utilizado 10 U de atividade de amilase sacarificante por grama de amido. Os hidrolisados foram avaliados quanto aos teores de açúcares redutores liberados e expressos como porcentagem em relação ao amido seco (açúcar redutor liberado para cada 100g de amido seco). Os hidrolisados também foram submetidos a análise cromatográfica de papel.

Os valores de açúcares redutores expressos como porcentagem de amido hidrolisado foram submetidos à análise de variância (tabela 4). A média geral do ensaio foi de 26,71% de amido hidrolisado, com um desvio padrão de 2,0267 e um coeficiente de variação de 7,5854.

Pode-se observar pelos resultados de análise de variância, que os fatores substratos, temperatura, tempo e a interação entre temperatura e tempo, exerceram efeito significativo sobre a hidrólise dos amidos de milho e mandioca pelas enzimas contidas no extrato enzimático. A interação entre substratos e temperaturas,



substratos e tempo, assim como a interação entre substrato, temperatura e tempo, não exerceram efeito significativo.

Tabela 4: Análise de variância da hidrólise do amido de milho e mandioca a 80 e 90°C por 1 e duas horas.

Causa da variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Meio (A)	1	31.7860	31.7860	7.7386 *
Temperatura (B)	1	1742.1696	1742.1696	424.1482**
Tempo (C)	1	423	423	103.1120**
Meio x Temperatura	1	16.5668	16.5668	4.0334 ^{NS}
Meio x Tempo	1	.0216	.0216	.0053 ^{NS}
Temperatura x Tempo	1	72.3148	72.3148	17.6057**
Meio x Temp x Tempo	1	9.1267	9.1267	2.2220 ^{NS}
(Tratamentos)	7	2295.5135	2295.5135	--
Resíduo	14	57.5044	57.5044	--

NS= não significativo; *= significativo ao nível de 5%; **= significativo ao nível de 1%.

O teste de Tukey, para as médias de porcentagem de hidrólise do amido de milho e mandioca, indicou que as enzimas contidas no extrato enzimático atuaram com maior eficiência sobre o amido de milho, alcançando um rendimento de 27,87% de amido hidrolisado, contra um rendimento médio de 25,57% para a hidrólise do amido de mandioca.



A aplicação do teste de Tukey, aplicado para avaliar o efeito da hidrólise enzimática, indicou que as enzimas atuaram mais eficientemente a 80°C, proporcionando um rendimento de 35,24% contra um rendimento de 18,19%, observado quando os ensaios ocorreram a 90°C. O mesmo teste mostrou que em duas horas de hidrólise o rendimento foi significativamente maior do que aquele observado para 1 hora de hidrólise. Em duas horas de hidrólise o rendimento foi de 30.92%, já em 1 hora de hidrólise o rendimento foi de apenas 22.52%.

Tabela 5: Teste de Tukey para as médias dos fatores substrato, temperatura e tempo.

Fatores	Média (% de hidrólise)
Meio	Milho 27.8692 A
	Mandioca 25.5675 B
Temperatura	80°C 35.2383 A
	90°C 18.1983 B
Tempo	2 horas 30.9192 A
	1 hora 22.5175 B

Foi também aplicado o teste de Tukey para as médias de porcentagem de hidrólise para a interação entre os fatores temperatura e tempo de hidrólise. Os resultados do teste mostraram que o melhor rendimento foi alcançado quando os



ensaios ocorreram a 80°C, durante duas horas (41,17%), seguido de 29,30% quando os ensaios ocorreram a 80°C durante 1 hora. As médias observadas para os ensaios ocorridos a 90°C durante 1 e duas horas foram inferiores, alcançando 15,73 e 20,66%, respectivamente.

Tabela 6: Teste de tukey para as medias dos fatores temperatura e tempo de hidrólise

Fatores	Média (% de hidrólise)
80°C -2 horas	41,1750 A
80°C -1 hora	29.3017 B
90°C -2 horas	20.6633 C
90°C - 1 hora	15.7333 D

Considerando que o fator substrato (tipo de amido usado) exerceu influencia significativa sobre os teores de açúcares redutores, ou seja, que as enzimas hidrolisaram diferentemente o amido de milho e de mandioca, deu-se prosseguimento às análises dividindo-se os dados em 2 blocos (milho e mandioca) e realizadas as análises dentro de cada bloco.

Os resultados para análise de variância dos blocos individualizados, milho (tabela 7) e mandioca (tabela 8), mostraram que os fatores temperatura e tempo de hidrólise foram significativos para ambos os blocos e mostrou também, que a interação entre os fatores temperatura e tempo de hidrólise não foram significativos



quando o substrato foi amido de milho (tabela 7), porém foi significativa quando utilizou-se amido de mandioca (tabela 8).

Tabela7: Análise de variância da hidrolise do amido de milho a 80 e 90°C por 1 e duas horas.

Causa da variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Temperatura (A)	1	1049.2570	1049.2570	317.6126 **
Tempo (B)	1	214.7994	214.7994	65.0203**
AxB	1	15.0304	15.0304	4.5497 ^{NS}
(Tratamentos)	3	1279.0868	426.3623	--
Resíduo	6	19.8214	3.3036	--

NS= não significativo; **= significativo ao nível de 1%.

Tabela 8: Análise de variância da hidrolise do amido de mandioca a 80 e 90°C por 1 e duas horas.

Causa da variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Temperatura (A)	1	709.4794	709.4794	169.7842 **
Tempo (B)	1	208.7502	208.7502	49.9556**
Temperatura x Tempo	1	66.4111	66.4111	15.8927**
(Tratamentos)	3	984.6407	328.2136	--
Resíduo	6	25.0723	4.1787	--

NS= não significativo; **= significativo ao nível de 1%.



O teste de Tukey (tabela 9) para as médias dos fatores temperatura e tempo de hidrólise, dentro de cada bloco (amido de milho e mandioca), mostrou que a enzima foi significativamente melhor a 80°C que a de 90°C, para ambos os substratos. Essa melhor atividade enzimática observada a 80°C pode ser justificada pelo fato dessa temperatura estar mais próxima da temperatura ótima de atuação das enzimas e que a 90°C as enzimas estariam sendo inativadas, conforme pode ser observado na figura 12.

O mesmo teste revelou também que duas horas de hidrólise foi significativamente melhor que 1 hora tanto a 80, quanto a 90°C quando amido de milho foi o substrato. Para o substrato amido de mandioca, o teste mostrou que a 80°C, duas horas de hidrólise foi melhor que 1 hora, porém, não considerou significativa as diferenças entre os produtos de hidrólise resultantes de 1 e duas horas.

De modo geral, ficou evidente que os fatores temperatura e tempo de hidrólise foram determinantes para o processo de hidrólise do amido para a produção de xarope. Altos teores de açúcares redutores foram liberados em ambos os substratos, porém o amido de milho mostrou maior susceptibilidade ao ataque das enzimas. A melhor temperatura de hidrólise para os dois substratos foi 80°C, já o melhor tempo foi de duas horas a 80°C, para os dois substratos e duas horas a 90°C para o amido de milho. Embora não tenha sido considerada estatisticamente significativa a diferença entre os resultados obtidos para o amido de mandioca, em 1



e duas horas a 90°C, foi possível observar uma maior quantidade de açúcares redutores em duas horas de hidrólise.

Tabela 9: Teste de tukey para as medias dos fatores temperatura e tempo de hidrólise, dentro dos blocos amido de milho e mandioca.

Milho	Média (% de hidrólise)	Mandioca	Média (% de hidrólise)
80°C x 2 horas	42.5700 A	80°C x 2 horas	39.7800 A
80°C x 1 hora	31.8700 B	80°C x 1 hora	26.7333 B
90°C x 2 horas	21.6300 C	90°C x 2 horas	19.0600 C
90°C x 1 hora	15.4067 D	90°C x 1 hora	16.0600 C

É conhecido que o amido de milho é mais susceptível à hidrólise enzimática que o amido de mandioca quando se usa enzimas comerciais de *Bacillus subtilis*, *B. liqueniformes* e *B. amiloliquefaciens*. Os resultados apresentados indicam que as amilases de *R. pusillus* apresentam comportamento semelhantes aos das enzimas comerciais.

6.1- Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise do amido a 25%

Para uma avaliação de quais produtos estariam sendo liberados durante a hidrólise foi realizada uma cromatografia de papel conforme mostram as figuras 19



e 20. Glicose, maltose, maltotriose e maltotetraose foram tomados como padrão. Através das figuras 19 e 20, observa-se bandas referentes aos padrões de glicose, maltose, maltotriose e maltotetraose, o que indica que esses quatro açúcares são liberados no processo de hidrólise do amido de milho e de mandioca. A presença desses açúcares no hidrolisado também mostra que as enzimas presentes no extrato enzimático atuaram de forma similar em ambos os substratos.

Esses dados confirmam a capacidade sacarificante das enzimas quando o amido foi usado em concentração de 25%, indicando que a solução enzimática em questão apresenta importante potencial biotecnológico.

Figura 19: Eletroferograma de açúcares liberados por papel Whatman nº1. São mostrados os produtos de hidrólise do amido de milho e 25% tratado por extrato enzimático de 8 unidades A13 U.

10- glicose, 12- maltose, 14- maltotriose, 16- maltotetraose, H₂O- 1 hora a 30°C, H₂O- 2 horas a 30°C, H₂O- 1 hora a 40°C, H₂O- 2 horas a 40°C, H₂O- 1 hora a 50°C, H₂O- 2 horas a 50°C.

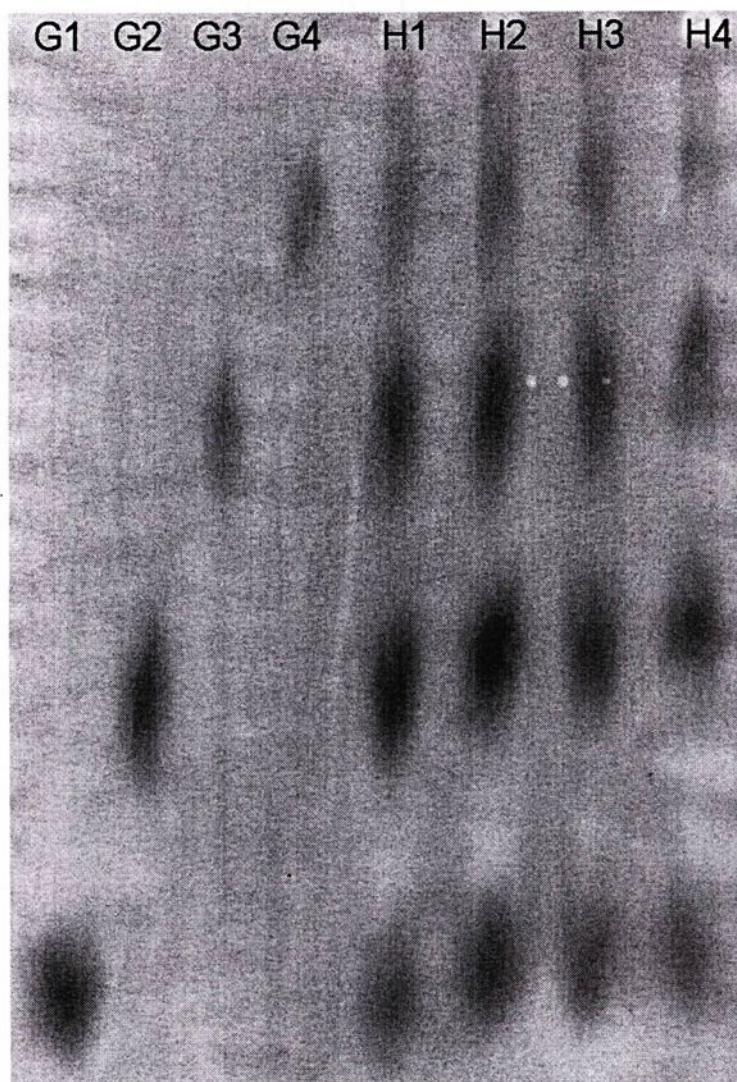


Figura 19: Cromatografia descendente em papel Whatman nº1 dos produtos de hidrólise do amido de milho a 25% tratado com extrato enzimático de *R. pusillus* A13.36.

G= glicose, G2= maltose, G3= maltotriose, G4= maltotetraose, H1= 1 hora a 80°C, H2= duas horas a 80°C, H3= 1 hora a 90°C, H4= duas horas a 90°C.

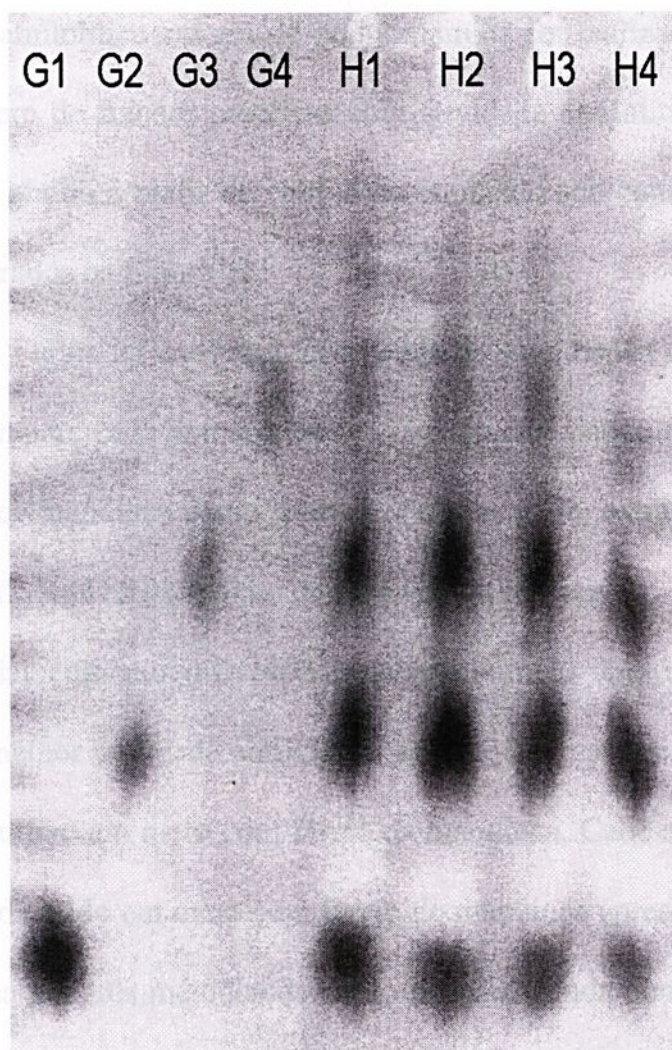


Figura 20: Cromatografia descendente em papel Whatman n°1 dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 25% tratado com extrato enzimático de *R. pusillus* A13.36.

G= glicose, G2= maltose, G3= maltotriose, G4= maltotetraose, H1= 1 hora a 80°C, H2= duas horas a 80°C, H3= 1 hora a 90°C, H4= duas horas a 90°C.

7- Atividade amilolítica em Gel de poliacrilamida

A atividade amilolítica em gel de poliacrilamida foi realizada com o intuito de verificar o número de frações protéicas com atividade amilolítica, presentes no extrato enzimático, obtido a partir de cultivo determinado sob condições ideais. Os resultados são mostrados na Figura 21.

Os dados da Figura 21 mostram a presença de uma banda correspondente a atividade amilolítica para cada extrato, em E1, extrato enzimático obtido a partir de cultivo com farelo de mandioca como fonte de carbono e E2, extrato obtido a partir de cultivo com amido solúvel comercial como fonte de carbono.

Nota-se nitidamente uma diferença acentuada entre as duas bandas presentes, o que indica uma melhor atividade amilolítica para as enzimas presentes no extrato obtido a partir de cultivo em meio com farelo da mandioca. Cabe aqui ressaltar que o extrato enzimático obtido em meio com farelo de mandioca apresentou uma maior atividade enzimática nos três métodos de determinação. Ainda com base nos dados apresentados pode-se inferir que as bandas presentes em ambos os extratos possivelmente seriam os resultados da ação de α -amilases.



VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO PROJETO

As melhores produções por *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

apresentam atividades amilolíticas semelhantes, sendo que a atividade amilolítica

de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

A atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Deve ser destacado que a atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

A atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Figura 21: Atividade amilolítica em gel de poliacrilamida. E1= extrato enzimático obtido em meio de cultivo contendo farelo de mandioca como fonte de carbono, E2= extrato enzimático obtido em meio de cultivo contendo amido solúvel como fonte de carbono e M= marcador de peso molecular.

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

Essa atividade amilolítica de *K. fragilis* é superior a de *K. fragilis* quando avaliadas em sua forma bruta

VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO PROJETO

As amilases produzidas por *R pusillus* quando ensaiadas em sua forma bruta apresentam atividades dextrinizantes e sacarificantes, praticamente simultâneas, além da presença de glucoamilases. Essas atividades conjuntas permitiu uma hidrólise de mais de 60% da solução de amido a 1% e mais de 40%, quando a 25%.

A alta temperatura de atuação das enzimas, além da termoestabilidade associadas ao potencial sacarificante, sugere que estes preparados enzimáticos possuem grande potencial de aplicação na produção de xarope. Deve ser destacado ainda, que as enzimas não requerem cálcio para manter sua estabilização a altas temperaturas, como ocorrem com as enzimas comerciais atualmente em uso, pelo contrário, as atividades sacarificantes e dextrinizantes são inibidas por esse íon. Essa propriedade barateia o processo pelo não requerimento da adição de cálcio e ainda evita a formação de complexos de cálcio indesejáveis.

Embora os dados com enzima bruta tenham sido satisfatórios com relação à aplicação na hidrólise, visto que os preparados enzimáticos utilizados na indústria também consistem de enzimas não purificadas, deixaram questões importantes como: a atividade dextrinizante e sacarificante é realmente derivada de duas enzimas diferentes? A termoestabilidade observada é característica devida unicamente às estruturas das moléculas ou existem outros fatores exógenos (do meio) favorecendo a mesma? Como ocorre o efeito inibitório dos íons Ca^{+2} ? Por que essas enzimas são



inibidas enquanto outras são estabilizadas pelo cálcio? Quais as diferenças entre as ações inibitórias da atividade enzimática e temoestabilização das enzimas?

Essas questões somente poderão ser respondidas com a purificação das enzimas em questão, o que se pretende executar na continuidade do projeto.

VII - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

- A linhagem de *Rhizomucor pusillus* A13.36 mostrou excelente capacidade de produzir α -amilases com poder dextrinizante e sacarificante, em fermentação submersa (FSM).
- O fungo produziu glucoamilase em FSM em quantidade máxima de 1,56 U/mL.
- O pH inicial de meio de cultivo mais indicado para a produção das enzimas foi 6,0 e a melhor temperatura de cultivo para a produção das enzimas foi 45°C.
- Tanto farelo de milho, quanto farelo de mandioca mostraram capacidade de indução da síntese das enzimas.
- As enzimas amilolíticas presentes no extrato enzimático bruto foram otimamente ativas em temperaturas elevadas (75°C para atividade de α -amilase dextrinizante e sacarificante, 70°C para glucoamilase) e apresentaram boa estabilidade térmica quando incubadas em temperaturas na ausência de substrato.



- As características físico-químicas das enzimas indicaram a presença de 2 tipos diferentes de α -amilase, uma sacarificante e outra dextrinizante.

- A α -amilase presente na solução enzimática bruta atuou preferencialmente em moléculas de amido (mandioca > milho > batata) e não apresentou atividade em dextrinas de cadeias curtas, substratos sintéticos e sacarose.

- A hidrólise do amido de milho e mandioca, utilizando extrato enzimático bruto, resultou na liberação de açúcares redutores como glicose, maltose, maltotriose e maltotetraose em quantidades significativas, o que nos leva a inferir que essas enzimas constituem um importante instrumento para a produção de xaropes.

ALL, B. M.; MEZGHANI, M.; REJAK, S. A thermostable α -amylase producing *Aspergillus* from a new isolated *Aspergillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. *Enzyme Microbial Technology*, v. 24, p. 584-592, 1999.

ALL, B.; BOSSAIN, Z. Characterization of glucanase from *Aspergillus* *Aspergillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 71, p. 144-146, 1991.

ANTRANIKIAN, O.; MEISEBERG, C.; GOTTSCALK, G. Production of thermostable α -amylase, pullulanase and α -glucosidase in continuous culture by a new *Aspergillus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 53, p. 1668-1671, 1987.

ANTRANIKIAN, O.; RODRIGES, A.; CANGANELLA, F.; KLINGENBERG, M.; JUNNA, A. Biodegradation of polymers at temperatures up to 130-degrees-c. *J. Macromol. Sci.-Pure and Appl. Chem.*, v. 32, p. 561-569, 1995.

AQUINO, A. C. M. M. Purificação e Determinação de Propriedades Bioquímicas das Atividades de Glucoamilase e α -amilase Produzidas pelo Fungo Termofílico *Aspergillus thermophilus* (S.). Ribeirão Preto, FFCI RP-USP, 121 p. Mestrado.



VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGER, T; PETERSEN, B. J.; O'CONNOR, M. S.; MURPHY, R. L.; KELLY, J. M.; NIELSEM, J. Physiological characterization of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different *cre A* genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase. **Journal of Biotechnology**. v. 92, p. 279-285, 2002.

ALI, B. M.; MEZGHANI, M.; BEJAR, S. A thermostable α -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. **Enzyme Microbial Technology**., v. 24, p. 584-589, 1999.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics for glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v.71,p.144-146, 1991.

ANTRANIKIAN, G.; HERZBERG, C.; GOTTSCHALK, G. Production of thermostable α -amylase, pullulanase and α -glucosidase in continuous culture by a new *clostridium* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 53, p. 1668-1673, 1987.

ANTRANIKIAN, G.; RUDIGER, A.; CANGANILLA, F.; KLINGEBERG, M.; SUNNA, A. Biodegradation of polymers at temperatures up to 130-degrees-c. **J. Macromol. Science Pure and Appl. Chem.**, v.32, p.661-669,1995.

AQUINO, A. C. M. M. Purificação e Determinação de Propriedades Bioquímicas das Atividades de Glucoamilase e α -amilase Produzidas pelo Fungo Termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1. Ribeirão Preto, FFCLRP-USP, 121 p. Mestrado.



ARNESEN, S.; ERIKSEN, S. H.; OLSEN, J.; JENSEN, B. Increased production of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of tween 80. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 249-252, 1998.

BASAVESWARA, S. D.; SASTRI, N. V. S.; SUBBA RAO, P. V. Purification and characterisation of a thermostable glucoamylase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). **Biotechnol. J.** v. 193, p. 379-387, 1981.

BENNAMOUN, L.; MERAIHI, Z.; DAKHMOUCHE, S. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. **Journal Food Engineering**, v.64, p.257-264, 2004.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Methods of Enzymatic Analysis. Edited by H. U. Bergmeyer. Verlag-Chemie-Academic Press, New York, v. 3: 1205-1215, 1974.

BHARAT, B.; HOONDAL, G. Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. **Biotechnol. Lett.** v. 20, p. 157-159, 1998.

BROCK, T. D. Life at High Temperatures. **Science**, v. 230, p. 132-138, 1985.

BROCK, D. T.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 6^a ed., 1991.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 90, p. 115-185, 2001.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1397-1403, 2003.



BUSCH, J. E.; STUTZENBERGER, F. J. Amylolytic activity of *Thermomonospora fusca*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v.13, p. 637-642, 1997.

CANGANELLA, F., ANDRADE, C., ANTRANIKIAN, G. Characterization of amylolytic and pullulolytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Feravidobacterium* species. **Appl. Microb. Biotechnol.**, v. 42, p. 239-245, 1994.

CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 81-93, 1996.

CEREIA, M.; TERENCE, J. A.; LEWIS, J.; POLIZELI, M. D. L. T. M. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. **Journal Basic Microbiol.** V. 40 (2), p. 83-92, 2000.

COCHRANE, V. M. Physiology of fungi. New York: Wiley, 1958.

CONSTANTINO, H. R.; BROWN, S. H.; KELLY, R. M. Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 7, p. 3654-3660, 1990.

CRUZ, R.; SOUSA, E. L.; HOFFMAN, E. H. E.; BELLINI, M. Z. B.; CRUZ, V. D.; VIEIRA, C. R. Relationship between Carbon Source, Production and Pattern Action of α -amylase from *Rhizopus* sp. **Rev. Microbiol.** V. 28, p. 101-105, 1997.

CUI, R.; OATES, C. G. The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. **Food Chemistry**. V. 65, p. 417-425, 1999.

DE MOT, R.; ANDRIES, K.; VERACHTERT, H. Comparative study of starch degradation and amylase production by Ascomycete yeast species. **Appl. Microbiol.** v. 5, p. 106-118, 1984.



DERGAL, S. B. Química de los Alimentos. Faculdade de Química. Universidade Nacional Autônoma de México. Primeira edição, 1981.

DREHER, M. L., BERRY, J. W., DREHER, C. J. Starch digestibility of foods. A nutritional perspective. **Critical. Reviews in food science and nutrition.** v. 20, p. 47-71, 1984.

DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K., REBERS, P. A.; SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** V.28, p.350-356; 1956.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry.** v. 38, p. 615-620, 2002.

FENEMA, O. R. Introdução a la Ciência de los Alimentos. Barcelona. Ed. Reveré, S. A., v.1, 445 pp, 1985.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal.**, v.15, p.107-115, 2003.

FRIEDRICH, J.; CIMERMAM, A.; STEINER, W. Submerged production of pectinolytic enzyme by *Aspergillus niger*: effect of different aeration/agitation regimes. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 31, p. 490-494, 1989.

FUJIO, Y.; MORITA, H. Improved Glucoamylase Production by *Rhizopus* sp. A-11 Using Metal-Ion Supplemented Liquid Medium. **Journal OF Fermentation and Bioengineering.** v. 82, p. 554-557, 1996.

GHOSH, A; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Purification and characterization of glucoamylases of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **J. Appl. Bacteriol.**, v.71, p.162-169,1991.



GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbiol Biotechnology**, W.H. Freeman and Company, New York, 1995.662 p.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 47, p. 1-11, 1997.

GOTO, C. E.; BARBOSA, E. P.; KISTNER, L. C. L.; GANDA, R. F.; ARRIAS, V. L.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus fumigatus*. **Rev. Microbiol.**, v.29, p.99-103, 1998.

GROBOILLOT, A. Immobilization of cells for application in the food industry. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 14, p. 75-107, 1994.

GROMIHA, M. M. Important inter-residue contacts for enhancing the thermal stability of thermophilic proteins. **Biophysical Chemistry.** v. 91, p. 71-77, 2001.

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

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Review Food Sc. Nutrition**, v.35, p.373-403, 1995.

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

HANEY, P. J.; BADGER, J. H.; BULDAK, G. L.; REICH, C.I.; WOESE, C. R.; OLSEN, G. J. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. **Proc. Natl. Sci. U. S. A.** v. 96, P. 3578-3583, 1999.

HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Archaeobacteria: Ancient organisms with commercial potential. **Letters Appl. Microbiol.**, v.9, p.33-39, 1989.



HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Visualization of channels and cavities of corn and sorghum starch granules. **Cereals chemistry**. V. 74, p. 537-541, 1997.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 94, No. 6, p. 530-535. 2002.

JENSON, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Purification of extracellular amylolytic enzymes from the thermophilic fungus *thermomyces lanuginosus*. **Can J Microbiol**, v. 34, p. 218-223, 1988.

JIN, B.; LEEUWEN, H. J.; PATEL, B. DOELLE, H. W.; YU, Q. Production of Fungal Protein and glucoamilase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 59-65, 1999.

KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Production and saccharification by a thermostable and neutral glucoamilase of a thermophilic mould *Thermomucor indicae-seudaticae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, p. 419-425, 2004.

KILIKIAN, B. V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.10-12, 1996.

KIMURA, A.; ROBTY, J. F. Reaction of enzymes with starch granules: Kinetics and products of the reaction with glucoamylase. **Carbohydr. Res.** v. 227, p. 87-107, 1995.

KOBAYASHI, F.; SAWADA, T.; NAKAMURA, Y.; OHNAGA, M.; GODLIVING, M.; USHIYAMA, T. Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of steam-exploded potato. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 69, p. 177-189, 1998.

KOCH, R.; SPREINAT, A.; LEMKE, K.; ANTRANIKIAN, G. Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from *Archaeobacterium Pyrococcus woesei*. **Arch. Microbiol.**, v. 155, p. 572-578, 1991.



KOHILU, U.; NIGAM, P.; SINGH, D.; CHAUDHARY, K. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme Microb. Technol.** v. 28, p. 606-610, 2001.

KONSULA, Z.; KYRIAKIDES, L. M. Hydrolysis of starch by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. 2003.

KOTTWITZ, B.; UPADEK, H.; CARRER, G. Applications and benefits of enzymes in detergents. **Chim Oggi**. V. 12, p. 21-24, 1995.

KUMAR, U. S.; REHANA, F.; NAND, K. Production of an extracellular thermostable calcium-inhibited α -amylase by *Bacillus licheniformis* MY 10. **Enzyme Microb. Technol.**, v.12, p.714-716, 1990.

KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Purification and Kinetics of a Raw Starch-Hydrolyzing, Thermostable, and Neutral Glucoamylase of the Thermophilic Mold *Thermomucor indicae-seudaticae*. **Biotechnol.** v. 19, p. 936-944, 2003.

KUMAR, R. K.; VENKATESH, S. K.; KUMAR, U. S. Evidence that cleavage of the precursor enzyme by autocatalysis caused secretion of multiple amylases by *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**. v. 557, p. 239-242, 2004.

KUNDU, A. K.; DAS, S. Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*. **Appl. Microbiol.** v. 19, p. 598-603, 1970.

KUNDU, A. K.; DAS, S.; GUPTA, G. K. Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *Aspergillus oryzae*. **J Fermente Technol.**, v. 51, p. 142-150, 1973.

LADERMAN, A. K.; DAVIS, B. R.; KRUTZCH, H. C.; LEWIS, M. S.; GRIKO, Y. V. PRIVALOV, P. L.; ANFINSEN, C. B. The purification and characterization of extremely thermostable α -amylase from hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. **The Journal of Biochemical Chemistry**, v. 268 (32), p. 24394-24401, 1993.



LASA, I.; BERENGUER, J. Thermophilic Enzymes and their Biotechnological Potential. **Microbiol. sem.** V. 9, p. 77-89, 1993.

LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. **Química de Alimentos**, Nobel, São Paulo, 1986. 98p.

LEGIN, E.; LADRAT, C.; GODFROY, A. BARBIER, G.; DUCHIRON, F. Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. **Cptes Rendus de la Academic Sc.** v.320, p.893-898, 1997.

LEHNINGER, A. C.; NILSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Worth publishers, 2^a ed., 1995.

LI, D. C.; YANG, Y. L.; PENG, Y. L.; SHEN, Y. L. Purification and characterization of extracellular glucoamilase from the thermophilic *Thermomyces lanuginosus*. **Mycol. Res.** v. 102 (5), p. 568-572, 1998.

LIN, L. L.; TSAU, M. R.; CHU, W. S. General characteristics of Thermostable Amylopullulanases and Amylases from the Alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 51-56, 1994.

LONSANE, B. K.; RAMESH, M. V. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and hydrolysis. **Adv Appl. Microbiol.** v. 35, p.1-56, 1990.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. I., FAN, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin pheno reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p. 265-175, 1951

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. Prentice Hall. 10^a Ed., 2003.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology.** v. 64, p. 461-488, 2000.



MAMO, G.; GASHE, B. A.; GESSESSE, A. A high Thermostable Amylase from Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* sp. WN11. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86 (4), p. 557-560, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.

MISHRA, R.; MAHESHWARI, R. Amylases of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Their purification, Properties, action on starch and response to heat. **Journal of Biosciences**. v. 21, p. 653-672, 1996.

MOHAPATRA, B. R.; BANERJEE, U. C.; BAPUJI, M. Characterization of fungal amylase from *Mucor* sp. Associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. **Journal of Biotechnology**. v. 60, p. 113-117, 1998.

MOLLER, K; SHARIF, M. Z; OLSSON, L. Production of fungal α -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. **Journal of Biotechnology**. v. 111, p. 311-318, 2004.

MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVIEZ, V.; SOUZA, C .M. S.; PERALTA, R. M. Production of Amylases by *Aspergillus tamari*. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 157-162, 1999.

NGUYEN, D. G; REZESSY-SZABÓ, J. M; HOSCHKE, A. Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. **Food Technol Biotechnol**. v. 38, p. 229-234, 2000.

NGUEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbiol Tecnology**. v. 31, p.345-352, 2002.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KÄHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extramorphs as a source of novel enzymes for industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.51, p.711-729, 1999.



O' DONNELL, D.; WANG, L.; XU, J.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochemical Engineering Journal**. v. 7, p. 187-193, 2001.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Review. Biotechnol Appl Biochemistry**. v. 31, p. 135-152, 2000.

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

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Review. Biotechnology Advances**. V.22, p. 189-259, 2004.

PARK, K.Y.; MARANCENBAUM, E.; MORGA, A. A. New starch resource: Study of some characteristics of the starch by enzyme methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 26 (5), 1978.

PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.** v.6, p. 269-273, 2003.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, vol. 1, Ed. Makron Books, SP, Brasil, 1981.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**, vol. 1, Ed. Makron Books, SP, Brasil, 1996.

PRIEST, F. G. Extracellular Enzymes. In: COLE, J. A.; KNOWLES, C. J.; SCHLESSINGER, D. **Aspects of Microbiology**. Washington, American Soc. Microbiol., 1984. p.17.

PRIETO, J. A.; BORT, B. R.; MARTINEZ, J.; RANDEZ-GIL, F.; BUESA, C.; SANZ, P. Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. **Biochem. Cell Biol.** v. 73, p. 41-49, 1995.



RABALHO, A. A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca, 2002. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 01, p. 175-188, 1998.

RAJOKA, M. I.; YASMIN, A.; LATIF, F. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamilase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Applied Microbiology**, v. 39, p. 13-18, 2004.

RAMACHADAN, S.; PATEL, A. K.; MADHAVAN, N.; FRANCIS, F.; NAGY, G. S.; PANDEY, A. Coconut oil cake potential raw material for the production of α -amylase. **Bioresours Technology**, v. 93, p. 169-174, 2004

RAMASESH, N.; SKRREKANTIAH, K. R.; MURTHY, V.S. Purification and characterization of a thermophilic α -amylase of *Aspergillus niger* van Tieghem. **Starch**, v. 34, p. 274, 1982.

RONASZEK, G.; NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABO, J. M.; HOSCHKE, A.; BHAT, M. K. Screening the strains of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginynosos* for amylolytic activities. **Acta Alimentaria**, v. 29 (1), p. 71-79, 2000.

ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Xylanases production by *Trichoderma longibrachiatum*. **Enz. Microb. Technol.** v. 11, p. 405-410, 1989.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. S. Extremófilos: organismos a prova de agressões ambientais extremas. **Boletim de Biotecnologia**, n. 69, p. 2-10, 2001.

SHAW, J. F.; LIN, F. P.; CHEN, S. C.; H. C. Purification and Properties of an Extracellular α -amylase from *Thermus* sp. **Bot. Bull. Acad.**, v. 36, p. 195-200, 1995.



SHIRAGA, S.; KAWAKAMI, M.; UEDA, M. Construction of combinatorial library of starch-binding domain of *Rhizopus oryzae* glucoamylase and screening of clones with enhanced activity by yeast display method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 28, p. 229-234, 2004.

SILVA, W. B.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *A. fumigatus*. **Can. J. Microbiol.** v. 44, p. 493-497, 1998.

SINGH, D.; DAHIYA, J. S.; NIGAM, P. Simultaneous raw starch hydrolysis and ethanol fermentation by glucoamylase from *Rhizocolonia solini* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Basic Microbiology**. V. 35, p. 117-121, 1995.

SKORUPA, P. N.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Characterization of new variant of the yeast *Cryptococcus flavus* isolated from the biodiversity of Brazilian Cerrado. Abstracts from the 23rd meeting on Genetics of Microorganisms, Pirenópolis, GO, Brazil, 2002.

SOMKUTI, A. G.; STEINBERG, H. D. Thermoacidophilic Extracellular α -amylase of *Mucor pusillus*. **Devel. Ind. Microbiol.**, v. 21, p. 327-337, 1980.

SONI, K. S.; K, A.; GUPTA, K. J. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. **Process Biochemistry**., v.39, p. 185-192, 2003

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermoestable α -amylase from *Nocardiopsis* sp. Endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STOLP, H. Microbiol Ecology: Organisms, Habitats, Activities. **Cambridge University Press**, p. 280, 1988.

SUGIMOTO, M.; OHTA, T.; KAWAI, F. Change in maltose- and soluble starch-hydrolyzing activities of chimeric α -glucosidases of *Mucor javanicus* and *Aspergillus oryzae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1645, p. 1-5, 2003.



TAKASAKI, Y. Production of Maltohexaose by α -amylase from *Bacillus circulans* G-6. **Agric. Biol. Chem.**, v.46 (6), p. 1539-1547, 1982.

THARANATHAN, R. N., PARAMAHANS, S. V., WANKHEDE, D. B. Amylolytic susceptibility of native groundnut and ragi starch granules as viewed by scanning electron microscopy. **Starch/starke**. V. 32, p. 158-161, 1980.

TOSI, L. R. O; TERENZI, H. F; JORGE, J. A. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 846-852, 1993.

UENO, S.; MIYAMA, M.; OHASHI, Y.; IZUMIYA, M.; KUSAKA, I. Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 273-276, 1987.

VAN DER MAAREL, C. E. J M.; VAN DER VEEN, B.; UITDECHAAG, J. C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiol. Mole. Biol. Rev.**, v.65, p.1-43, 2001.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes. **Issue**, v. 24, p.329-418, 1989.

WANDERLEY, J. K.; TORRES, G. A. F.; MORAES, P. M. L.; ULHOA, J. C. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 165-169, 2004.

WILSON, J. J.; INGLEDEW, W. M. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 44, p. 301-307, 1982.



YABUKI, M.; ONO, N.; HOSHINO, K.; FUKUI, S. Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 34, p. 1-6, 1977.

ZAHA, I.; ARNALDO, F.; HENRIQUE, B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. 3ª Edição, 2003.

ZAHA, C. B.; ZEIKUS, G. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. **Starch Staerke**. v. 41, p. 57-64, 1989.

ZAVALA, A.; NAYA, H.; ROMERO, H.; MUSTO, H. Trends in códon anda mino acid usage in thermotoga maritime. **J. Mol. Evol.** v. 54, p. 563-568, 2002.





unesp

