
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PRODUÇÃO DE AMILASES PELO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE
Rhizopus microsporus var. *oligosporus* E SUA UTILIZAÇÃO NA
OBTENÇÃO DE XAROPE DE GLICOSE**

BRUNA ESCARAMBONI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Abril – 2014

BRUNA ESCARAMBONI

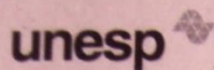
**PRODUÇÃO DE AMILASES PELO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE *Rhizopus*
microsporus var. *oligosporus* E SUA UTILIZAÇÃO NA OBTENÇÃO DE XAROPE
DE GLICOSE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Dr. Pedro de Oliva Neto

Rio Claro

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE AMILASES PELO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* E SUA UTILIZAÇÃO NA OBTENÇÃO DE XAROPE DE GLICOSE

AUTORA: BRUNA ESCARAMBONI

ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Departamento de Tecnologia Agro-industrial e Sócio-Economia Rural / UFSCar, campus Araras

Prof. Dr. EUTÍMIO GUSTAVO FERNÁNDEZ NÚÑEZ
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras UNESP, campus Assis

Data da realização: 11 de abril de 2014.

Inteiramente a Deus, por ser o centro e razão da minha vida.

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Durval e Neide, e ao meu irmão,
Gustavo, por serem o meu alicerce.
Pelo amor, carinho e apoio
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado mais esta conquista.

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

Agradeço à minha família pela alegria de tê-los ao meu lado em todos os momentos, por tudo que me proporcionaram neste período, pela participação concreta e efetiva nesta realização, que é nossa! Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto pela orientação desde os meus primeiros passos de vida acadêmica, na iniciação científica e neste trabalho de mestrado, pela atenção, paciência, troca de experiências e acima de tudo pela confiança.

À Dra. Valéria e ao Dr. Gustavo pelas sugestões, disponibilidade e amizade.

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

À Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP por disponibilizar recursos e instalações para a realização dos experimentos.

Ao Instituto de Biociências e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia aplicada) – UNESP campus de Rio Claro pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao Luiz Henrique Franciscatti de Gênova, pelo apoio, carinho, paciência e palavras de encorajamento na importante etapa de finalização deste projeto! Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Industrial pelo companheirismo, sugestões, amizade e momentos de descontração.

Aos professores e funcionários da UNESP campus de Assis que participaram dos meus dias nestes dois anos.

À Fapesp e à Capes pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada a todos!

“Quando o homem tiver acabado, então estará no começo; e quando cessar a pesquisa, ficará perplexo.” Eclo 18, 6

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

As amilases pertencem à classe das hidrolases e são enzimas de grande importância para aplicações industriais representando de 25 a 33% do mercado mundial de enzimas. Há uma gama extensiva de aplicações e um enorme interesse na descoberta de enzimas com melhores propriedades na degradação do amido. O presente trabalho visou otimizar a tecnologia de produção de amilases por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação em estado sólido com farelo de trigo. Em uma segunda etapa o extrato enzimático foi parcialmente caracterizado e utilizado para produção de xarope de glicose. Foi determinada a concentração ideal de sais para suplementação do meio de cultivo, a influência da umidade e inóculo na produção amilolítica utilizando-se um delineamento central composto rotacional (DCCR). Estabeleceu-se o protocolo para extração enzimática e verificou-se a produção ao longo do tempo em diferentes temperaturas de fermentação. A atividade enzimática foi determinada a partir da quantificação dos açúcares redutores liberados durante reação de hidrólise de amido. A menor concentração otimizada foi de 1,25% (m/m) de sulfato de amônio, 0,25% de fosfato de potássio e 1,25% de ureia. O melhor teor de umidade para a produção amilolítica foi de 50% e a extração mais eficiente ocorreu com 10 mL de água destilada por grama de substrato. A máxima produção enzimática ocorreu nos cultivos a 30 °C durante 120 h. A melhor temperatura para atividade amilolítica foi de 60 a 65 °C. A melhor estabilidade térmica (80%) foi obtida até 50 °C por 1 hora de incubação. A enzima produzida apresentou maior atividade em uma faixa de pH entre 4,0 e 5,0. A estabilidade foi superior a 80% após 1 hora de contato em pH de 3,0 a 7,0. O extrato enzimático bruto foi capaz de realizar a conversão total de amido em açúcar redutor após 6 horas de reação a 55 °C. Para a farinha de trigo tipo II foi obtido um rendimento de 83% em 6,5 horas e para o farelo de trigo, 62% em 7 horas. O produto da reação catalítica foi concentrado até a obtenção de um xarope com 20% de glicose. No presente trabalho verificou-se um aumento na produção enzimática de 180 U/g para mais de 600 U/g. Além disso, o extrato amilolítico foi capaz de catalisar a hidrólise completa do amido. Estes resultados evidenciaram a viabilidade técnica do bioprocessamento desenvolvido utilizando resíduos da fabricação do amido tanto para a produção de amilases como xarope de glicose.

Palavras-chave: Amilase; Fermentação em estado sólido; *Rhizopus oligosporus*; Farelo de trigo; Glicose.

ABSTRACT

The amylases belong to the class of the hydrolases and they are enzymes of great importance to industrial applications, representing from 25% to 33% of the worldwide enzymes business. There is a wide range of applications and a huge interest in the discovery of enzymes with better properties in the starch degradation. The present work aims to optimize the technology of production of amylases by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* in solid state fermentation with wheat bran. In second stage the enzymatic extract was partially characterized and used in glucose syrup production. The ideal concentration of salts to supplement the culture medium was determined, as well as the influence of moisture and inoculum on amylase production using a central composite rotational design (DCCR). The best protocol for enzymatic extraction and profiles of amylase production at different temperatures of fermentation were determined. The enzymatic activity was measured by the quantification of reducing sugars released during hydrolysis reaction of starch. The lowest optimal concentration was 1.25% (w/w) ammonium sulfate, 0.25% potassium phosphate and 1.25% urea. The best moisture level for amylolytic production was 50%, and the most efficient extraction was with 10 ml of distilled water per gram of substrate. The maximum enzyme production in the cultures was at 30 °C for 120 h. The best temperature for amylolytic activity was 60 to 65 °C, and better stability (80%) was obtained up to 50 °C for 1 hour of incubation. The enzyme produced showed greater activity in a pH range 4.0-5.0, and more than 80% of stability after 1 hour of contact in a pH range 3.0-7.0. The crude enzymatic extract was able to perform the total conversion of starch to reducing sugar in 6 hours of reaction at 55 °C. For type II wheat flour was obtained a yield of 83% in 6.5 hours, and for wheat bran, 62% in 7 hours. The product of the catalytic reaction was concentrated to obtain 20% glucose syrup. In this study it was found an increase in the enzymatic production from 180 U/g to more than 600 U/g after optimization. These results demonstrated the technical feasibility of the bioprocess developed using residues of starch manufacture for the production of amylase and glucose syrup.

Keywords: Amylase; Solid state fermentation; *Rhizopus oligosporus*; Wheat bran; Glucose.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Polímeros do amido. (A) Segmento linear curto da amilose com ligações α -1,4. (B) Ponto de ramificação (α -1,6) da amilopectina. (C) Disposição da amilose e amilopectina no grão de amido. As fibras de amilopectina formam estrutura dupla-hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose. *Nonreducing end*: extremidade não redutora; *Reducing end*: extremidade redutora; *Branch*: ramificação; *Branch point*: ponto de ramificação; *Main chain*: cadeia principal; *Amylose*: amilose; *Amylopectin*: amilopectina. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006).....17
- Figura 2:** Ilustração de fluxos de massa dos componentes do farelo de trigo e possíveis produtos. *Wheat bran*: farelo de trigo; *Lignin*: lignina; *Minerals* minerais; *Fat*: gordura; *Protein*: proteína; *Amino acids*: aminoácidos; *Arabinoxylans*: arabinoxilanas; *WE-AX* (*water-extractable arabinoxylan*): arabinoxilanas solúveis/extraíveis por água; *WU-AX* (*water-unextractable arabinoxylan*): arabinoxilanas insolúveis/não extraíveis por água; *Phenolic acids*: ácidos fenólicos; *Vanillin*: vanilina; *Cellulose*: celulose; *Starch*: amido; *Lactic acid*: ácido láctico. Fonte: Adaptado de Apprigh et al. (2014).....25
- Figura 3:** Ensaio de FES com diferentes concentrações de sais. (1) Solução padrão de sais; (2) Ausência de suplementação; (3), (4) e (5) Concentrações intermediárias. Valores especificados na tabela 1. * médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas (Teste de Tukey, $p > 0,05$).....32
- Figura 4:** Valores experimentais da atividade enzimática (U/g) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.....36
- Figura 5:** Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/g) em função de X_1 e X_2 (A) e (B), X_1 e X_3 (C) e (D) e X_2 e X_3 (E) e (F). X_1 : Sulfato de amônio; X_2 : Fosfato de potássio; X_3 : Ureia.....37
- Figura 6:** Validação do modelo para atividade amilolítica utilizando duas soluções de nutrientes. Solução 1 (m/m): 1,25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,63% KH_2PO_4 e 1,25% ureia – valores codificados (0, 0, +1,68); Solução 2 (m/m): 1,25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25% KH_2PO_4 e 1,25% ureia – valores codificados (0, -1, +1,68).....39

Figura 7: Quantidade de enzima recuperada com diferentes métodos de extração (volume de água destilada por grama de substrato). (1): 5 mL/g; (2): duas etapas com 5 mL/g; (3): 10 mL/g. * médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas (Teste de Tukey, $p > 0,05$).....	40
Figura 8: Valores experimentais da atividade enzimática (U/g) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.....	42
Figura 9: Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade enzimática (U/g) em função da concentração de Inóculo (X_1) e Umidade (X_2).....	42
Figura 10: Produção amilolítica por <i>Rhizopus oligosporus</i> em diferentes temperaturas de incubação: (-●-) 25 °C, (-■-) 28 °C, (-○-) 30 °C, (-□-) 35 °C.....	45
Figura 11: Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da amilase no extrato bruto (A) e concentrado (B) na ausência de substrato: (-●-) temperatura na atividade enzimática, (-■-) estabilidade térmica após 30 min de incubação e (-○-) estabilidade térmica após 1 h de incubação.....	48
Figura 12: Efeito do pH na atividade e estabilidade da amilase de <i>Rhizopus oligosporus</i> no extrato bruto: (-●-) pH na atividade enzimática, (-○-) estabilidade enzimática após 1 h de incubação em tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7.....	49
Figura 13: Perfil de hidrólise do amido solúvel (-●-), farinha de trigo tipo II (-○-) e farelo de trigo (-◆-) utilizando uma solução contendo 5% de carboidrato e extrato enzimático bruto na proporção de 1,2 U/mL da solução de reação, a 55 °C. Rendimento: conversão de carboidrato em açúcar redutor, expresso em porcentagem.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes concentrações de sais (% , m/m) como fontes de nutrientes na FES....	26
Tabela 2: Especificação dos níveis das variáveis utilizadas no DCCR 2 ³	27
Tabela 3: Matriz do DCCR 2 ³ com níveis codificados para o estudo da influência da concentração dos sais.....	27
Tabela 4: Especificação dos níveis das variáveis utilizadas no DCCR 2 ²	28
Tabela 5: Matriz do DCCR 2 ² com níveis codificados para estudo da influência da umidade do meio de cultura e concentração de inóculo.....	29
Tabela 6: Delineamento experimental para o processo de obtenção de amilase, as respostas obtidas e os valores previstos pelo modelo estatístico.....	34
Tabela 7: Coeficientes de regressão para o modelo polinomial utilizando variáveis codificadas.....	35
Tabela 8: ANOVA para a resposta atividade enzimática (U/g).....	35
Tabela 9: DCCR para o processo de obtenção de amilase, as respostas obtidas e os valores previstos pelo modelo estatístico.....	40
Tabela 10: Coeficientes de regressão para o modelo polinomial utilizando variáveis codificadas.....	41
Tabela 11: ANOVA para a resposta de atividade enzimática (U/g).....	41
Tabela 12: Concentração do extrato enzimático por precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	46
Tabela 13: Composição geral dos substratos utilizados para hidrólise enzimática.....	51
Tabela 14: Rendimento da produção de glicose durante a hidrólise dos substratos amiláceos considerando o teor de açúcar redutor liberado pela massa do substrato utilizado.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Amido	16
3.2 Amilases	17
3.3 Aplicações das amilases	18
3.4 Produção de amilases	21
3.5 Fermentação em estado sólido (FES)	22
3.5.1 Farelo de trigo	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Micro-organismo e inóculo	26
4.2 Planejamento experimental para avaliação dos componentes do meio de FES	26
4.3 Extração enzimática	28
4.4 Planejamento experimental para avaliação da influência da umidade e concentração de inóculo	28
4.5 Variação do tempo de cultivo em diferentes temperaturas	29
4.6 Métodos analíticos	29
4.6.1 Determinação de açúcares redutores e atividade enzimática	29
4.6.2 Atividade celulolítica (CMCase)	30
4.6.3 Determinação de proteínas	30
4.7 Precipitação fracionada e purificação parcial com sulfato de amônio	30
4.8 Caracterização bioquímica do extrato enzimático	30
4.8.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica	30
4.8.2 Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade	31
4.9 Hidrólise enzimática de diferentes substratos amiláceos e produção de xarope de glicose	31
4.10 Análise dos resultados	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Planejamento experimental para avaliação dos componentes do meio	32
5.2 Validação do modelo	38
5.3 Extração enzimática	39
5.4 Planejamento experimental para avaliação da influência da umidade e concentração de inóculo	40
5.5 Efeito do tempo de cultivo em diferentes temperaturas	43

5.6	Precipitação com sulfato de amônio.....	45
5.7	Caracterização bioquímica do extrato enzimático.....	47
5.7.1	Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica.....	47
5.7.2	Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade.....	48
5.8	Hidrólise enzimática de diferentes substratos amiláceos e produção de xarope de glicose	50
6.	CONCLUSÕES	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Amilases compreendem uma importante classe enzimática com numerosas aplicações industriais e em procedimentos analíticos, representando 25-33% do mercado de enzimas (BORGIO, 2011; KUMAR, et al., 2012; RAVINDAR e ELANGO VAN, 2013). Pertencem à classe das hidrolases e catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, liberando diversos produtos, como dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; GUANDALINI, 2007).

O amido é o principal polissacarídeo de armazenamento nas células vegetais, com destaque para as produções mais importantes economicamente, como o trigo, arroz, milho, mandioca e batata. Quimicamente é um homopolímero constituído de moléculas de glicose unidas por ligações α -1,4 e α -1,6. No final da cadeia polimérica, encontra-se um grupo aldeído, que é conhecido como final redutor. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido, a amilose e a amilopectina (VAN DER MAAREL et al., 2002; NELSON e COX, 2006; CASTRO et al., 2010).

As amilases formam um complexo enzimático compreendendo uma grande variedade de enzimas que atuam sinergisticamente para quebrar os polissacarídeos amilose e amilopectina do amido em glicose. Elas podem ser divididas basicamente em quatro grupos: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases (VAN DER MAAREL et al., 2002; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

No cenário atual há uma gama extensiva de aplicações tais como nas indústrias de alimentos, detergentes, papéis, têxteis, panificação, indústria química e farmacêutica, para a hidrólise do amido e na fabricação de etanol. (VAN DER MAAREL et al., 2002; GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; MITIDIARI et al., 2006; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; CASTRO et al., 2010). Devido à crescente demanda, há um enorme interesse na descoberta de enzimas com melhores propriedades na degradação do amido, bem como no desenvolvimento de técnicas que reduzam o custo de produção dos derivados amilolíticos.

A principal vantagem do uso de micro-organismos para a produção de amilases é o potencial econômico e capacidade de produção em larga escala, além da relativa facilidade de manipulação e obtenção de enzimas com características específicas (GUPTA et al., 2003; SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Os fungos são especialmente valorizados, por ser uma excelente fonte de enzimas de interesse industrial. Os pertencentes ao gênero *Rhizopus* possuem destaque por serem bons produtores de amilases e possuem a capacidade de

metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos resíduos agroindustriais (JIN et al., 2002; RAY, 2004; NOROUZIAN et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008). A espécie *Rhizopus oligosporus* é caracterizada como segura, uma vez que recebe a certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) que permite diversas aplicações, inclusive em alimentos e rações (VATTEM et al, 2004).

A fermentação em estado sólido (FES) tem ganhado a atenção das pesquisas nos últimos 20 anos, e credibilidade entre muitas corporações industriais. Tem diversas vantagens sobre o processo convencional de fermentação submersa, muitas delas estão relacionadas à fisiologia especial apresentada pelos fungos em FES (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Além disso, é uma técnica simples com baixo capital de investimento, necessita de menor quantidade de água e energia, garante a melhor recuperação do produto e está sendo reportada como o processo mais apropriado para os países em desenvolvimento (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Diferentes resíduos agroindustriais podem ser utilizados para a produção de amilases em fermentação em estado sólido, tais como farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, sabugo de milho e resíduos de laranja (DJEKRIF-DAKHOUCHE et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; HASHEMI et al., 2010; CASTRO e SATO, 2013). Porém, o farelo de trigo possui um teor relativamente elevado de proteínas e carboidratos, bem como uma pequena quantidade de lignina, sendo este o principal diferencial para outras biomassas contendo lignocelulose (APPRICH et al., 2014). As indústrias de processamento de amido empregam glicoamilases, principalmente de espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* na sacarificação do amido e, embora elas possam ser produzidas por vários métodos de fermentação, o sistema de fermentação em estado sólido tem dado os maiores teores enzimáticos (NOROUZIAN et al., 2006).

Apesar das amilases já serem produzidas industrialmente por diversos micro-organismos, há grandes variações de preço, sendo as glicoamilases fúngicas as mais caras, e esse é um fator limitante para o seu uso industrial. No presente trabalho foi desenvolvido um bioprocesso, empregando-se resíduos agroindustriais tanto para a produção enzimática, como para a produção de xarope de glicose. Essa iniciativa foi devido à importância econômica das amilases, sua aplicabilidade em diversas áreas industriais, baixo custo de insumos empregados na fermentação em estado sólido, e a importância do aproveitamento de subprodutos agroindustriais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O estudo proposto visou desenvolver um bioprocesso para a produção de amilases por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação em estado sólido (FES), determinar a melhor temperatura e pH de atuação do extrato bruto obtido, e sua aplicação na obtenção de xarope de glicose a partir amido e resíduos industriais.

2.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer a melhor proporção dos sais sulfato de amônio, fosfato de potássio e ureia como fonte de nutrientes para o meio de cultivo em estado sólido (FES) de *Rhizopus oligosporus* tendo farelo de trigo como substrato, utilizando-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta.

2. Determinar as melhores condições de umidade e inóculo por planejamento experimental, bem como temperatura e tempo de cultivo para a produção de amilases pelo processo de fermentação em estado sólido.

3. Concentrar e purificar parcialmente o extrato enzimático por precipitação com sulfato de amônio.

4. Caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático quanto à atividade e estabilidade frente à variação de temperatura e pH do meio reacional.

5. Produzir xarope de glicose através da ação do extrato enzimático sobre os substratos amido solúvel, farinha de trigo tipo II e farelo de trigo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Iniciativas de pesquisa e desenvolvimento têm revolucionado o campo das enzimas industriais com a elaboração de novos produtos e melhoria dos processos existentes. Considerando as questões ambientais e de custos dos processos químicos convencionais, a biotecnologia está ganhando terreno rapidamente, pois oferece inúmeras vantagens em relação às tecnologias convencionais. As enzimas industriais representam um mercado expressivo mundialmente, sendo estimado em US\$ 3,3 bilhões em 2010, podendo chegar a 4,4 bilhões dólares em 2015 (THOMAS et al, 2013). Amilases são enzimas de grande importância para aplicações industriais e representam de 25 a 33% do mercado mundial de enzimas (RAVINDAR e ELANGO VAN, 2013).

3.1 Amido

O amido é um polissacarídeo sintetizado pelas plantas e utilizado como importante fonte de nutrição para os outros organismos vivos. Ele é sintetizado nos plastídios, que estão presentes nas folhas, e acumula-se como grânulos insolúveis semicristalinos com diferentes tipos polimórficos e graus de cristalinidade. Os grânulos variam em tamanho de 2 a 100 μm e exibem formas arredondadas, ovais e irregulares. O amido é o principal componente da maior parte dos alimentos básicos e é utilizado em muitas indústrias alimentícias e não alimentícias, principalmente nas indústrias têxteis, de papel, farmacêutica, de bebidas e de álcool (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013).

Os processos industriais permitem que o amido seja extraído com elevada pureza. Trata-se de uma matéria-prima renovável, biodegradável e não tóxica, além de prover a maior porcentagem calorias na dieta humana. (LEONEL, 2001; MYERS et al., 2000). O amido puro é um pó branco sem sabor e inodoro, seu grânulo é inerte, estruturalmente estável, densamente condensado e insolúvel em água e álcool, sendo rompido na presença de enzimas. O tamanho e o formato dos grânulos são específicos de cada espécie de planta (PINTO, 2009).

Em termos da sua organização estrutural, o amido é formado de dois compostos de elevado peso molecular, amilose e amilopectina, e ambos contêm α -D-glicose como o único monômero. A amilose é um polímero insolúvel em água, linear de cadeias longas, composto de até 6000 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,4. A amilopectina é muito ramificada, solúvel em água, sendo constituída por cadeias lineares curtas de 10-60

unidades de glicose unidas por ligações α -1,4 e cadeias laterais com 15-45 unidades de glicose unidas por ligações α -1,6, que conferem volume à molécula de amido (Figura 1). Os níveis de amilose e amilopectina variam entre amidos, mas porcentagens representativas de amilose e amilopectina são 25-28% e 72-75%, respectivamente (NELSON e COX, 2006; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; SHARMA e SATYANARAYANA, 2013).

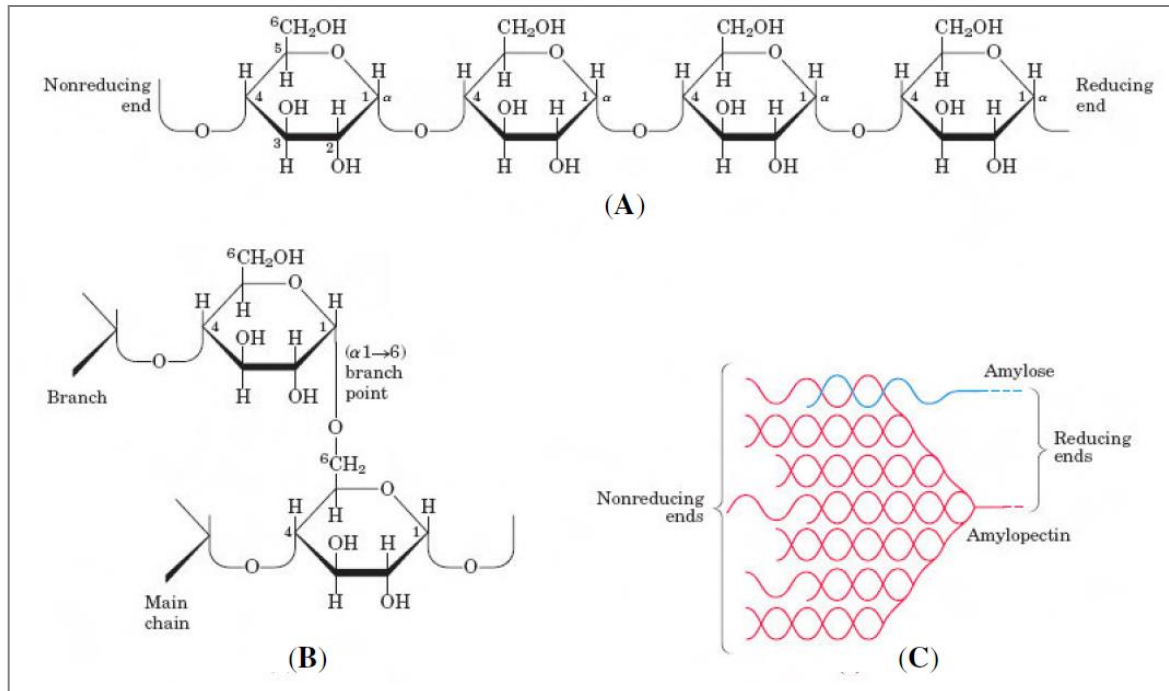


Figura 1. Polímeros do amido. (A) Segmento linear curto da amilose com ligações α -1,4. (B) Ponto de ramificação (α -1,6) da amilopectina. (C) Disposição da amilose e amilopectina no grão de amido. As fibras de amilopectina formam estrutura dupla-hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose. *Nonreducing end* : extremidade não redutora; *Reducing end*: extremidade redutora; *Branch*: ramificação; *Branch point*: ponto de ramificação; *Main chain*: cadeia principal; *Amylose*: amilose; *Amylopectin*: amilopectina. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006).

3.2 Amilases

Uma variedade de produtos diferentes pode ser obtida ao se processar enzimaticamente o amido, tais como xaropes de glicose, frutose, derivados de maltodextrina e ciclodextrinas, dependendo do tipo de amilase utilizada. Existem basicamente quatro grupos de enzimas que atuam na conversão do amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases (VAN DER MAAREL et al., 2002; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

As endoamilases, também conhecidas como enzimas despolimerizadoras por agirem na liquefação do amido, são compostas principalmente pelas α -amilases (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolases; E.C. 3.2.1.1) que catalisam a clivagem randômica das ligações glicosídicas α -D-1,4 entre as unidades de glicose presentes na parte interna e linear da molécula de amido, liberando oligossacarídeos de vários comprimentos (KANDRA, 2003; CASTRO et al., 2010)

As exoamilases (enzimas sacarificantes) hidrolisam exclusivamente as ligações glicosídicas α -1,4, como a β -amilase (E.C. 3.2.1.2) ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como a glicoamilase (sinônimo amiloglicosidase; 1,4- α -D-glucan glucohidrolase, E.C. 3.2.1.3) e α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20). Exoamilases atuam nos resíduos externos de glicose da amilose ou amilopectina e assim produzem apenas glicose como produto final (glicoamilase e α -glicosidase), ou maltose e dextrinas (β -amilase) (AQUINO et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008) Ao contrário das α -amilases, a maioria das glicoamilases também são capazes de hidrolisar as ligações α -1,6 nos pontos de ramificação da amilopectina, embora em um ritmo mais lento do que as ligações α -1,4 (ELLIAH et al., 2002).

As enzimas desramificadoras, como isoamilase (EC 3.2.1.68) e pululanase tipo I (EC 3.2.1.41), hidrolisam exclusivamente as ligações glicosídicas do tipo α -1,6. As pululanases clivam o pululano e amilopectina, enquanto que a isoamilase pode hidrolisar somente as ligações α -1,6 na amilopectina. As transferases clivam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação (VAN DER MAAREL et al., 2002).

3.3 Aplicações das amilases

Tradicionalmente, a hidrólise do amido é realizada utilizando um meio ácido sob alta temperatura, no entanto a hidrólise enzimática tem substituído a hidrólise ácida do amido em mais de 75 % dos processos (KANDRA, 2003; WANG et al., 2011). Hidrólises enzimáticas são vantajosas porque as enzimas catalíticas são específicas para a reação, conseqüentemente, não há formação de produtos indesejáveis proporcionando maior rendimento (BALLESTEROS et al., 2002).

O tratamento enzimático do amido ocorre em várias etapas e com mais de um tipo de amilase, tendo em vista sua conversão completa para xarope de glicose. O primeiro passo é a liquefação para solubilizar o amido em dextrinas de cadeia curta, utilizando α -amilase

termoestável, geralmente de *Bacillus sp.* A obtenção de produto final depende do tempo de incubação e da quantidade de enzima adicionada. O próximo passo é a sacarificação do xarope de amido hidrolisado para produzir um xarope de glicose com alta concentração (mais de 95 %). Isto é feito usando uma glicoamilase, comumente de origem fúngica – *Aspergillus niger* ou uma espécie semelhante. Esta glicoamilase atua com máxima eficiência em pH 4,2 e é estável a 60 °C. Para executar um processo eficiente de sacarificação, o pH da calda de amido hidrolisado é ajustado para 4,5 e a etapa realizada por 12-96 horas, a 60-62 °C. Um terceiro passo no processamento industrial de amido é a conversão de um xarope de alto teor de glicose em um xarope de alto teor de frutose. (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Várias modificações físicas, químicas e enzimáticas têm melhorado as propriedades funcionais do amido permitindo uma ampla gama de aplicações. A hidrólise do amido é uma forma simples de produzir carboidratos com propriedades funcionais especiais. (MOORE et al., 2005). Diversos estudos apontam glicoamilase e α -amilase como as enzimas mais importantes e utilizadas no processamento de amido (CARVALHO et al., 2008; FERREIRA-NOZAWA et al., 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; HASHEMI et al., 2010).

As amilases são uma das enzimas mais importantes nos bioprocessos industriais (WANG et al., 2011). Sua comercialização é a mais antiga, sendo usada pela primeira vez em 1984 como um auxiliar farmacêutico para o tratamento de desordens digestivas (GUPTA et al. 2003). No cenário atual há uma gama extensiva de aplicações para as amilases incluindo indústrias de alimentos, detergentes, papéis, têxteis, panificação, indústria química, produtos farmacêuticos, hidrólise do amido e fabricação de etanol. (VAN DER MAAREL et al., 2002; GUPTA et al. 2003; PANDEY et al., 2005; MITIDIERI et al., 2006; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; CASTRO et al., 2010).

O maior mercado para a aplicação das amilases é na produção de hidrolisados de amido obtendo-se glicose e frutose como produto final. O amido é convertido em xaropes de milho com alto teor de frutose (HFCS ou High Fructose Corn Syrups). Por sua alta propriedade adoçante, eles são usados em grandes quantidades como adoçantes na indústria de refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

As amilases são extensivamente empregadas na panificação, bebidas, preparação de auxiliares da digestão, produção de bolos, sucos de frutas e xaropes de amido (COUTO e SANROMÁN, 2006). Na indústria de panificação, as α -amilases têm sido amplamente usadas. Elas podem ser adicionadas na massa do pão para degradar o amido da farinha em pequenas dextrinas, as quais são subsequentemente fermentadas pela levedura. A adição da

enzima na massa resulta no aumento da taxa de fermentação e redução da viscosidade, melhorando o volume e textura do produto. Além disso, gera açúcar adicional na massa, que melhora o sabor, coloração e textura do pão (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Na indústria têxtil, a enzima mais utilizada é a amilase que é normalmente empregada para redimensionar os tecidos pela hidrólise do amido (MARYAN e MONTAZER, 2013). Uma camada removível de proteção, constituída por gomas de amido ou derivados, é aplicada aos fios para dar maior resistência durante o processo de tecelagem. O amido é bastante atrativo para esta finalidade, uma vez que é barato, apresenta grande disponibilidade em diversas regiões do mundo e pode ser removido facilmente. As amilases são usadas na eliminação das gomas ao invés do uso de oxidantes, ácidos ou bases, que danificam a celulose do tecido. As enzimas quebram as moléculas do amido em dextrinas que são solúveis em água, podendo ser facilmente removidas através da lavagem (SPIER, 2005; GUANDALINI, 2007).

Na indústria de papel as amilases são usadas na modificação do amido que é aplicado como cobertura do papel para fornecer proteção contra danos mecânicos durante o processamento e melhorar a qualidade do produto final, aumentando a resistência e apagabilidade. O amido é adicionado na etapa de prensagem, onde dois cilindros fazem a transferência da pasta de amido ao papel. A temperatura deste processo é em torno de 45 a 60°C (GUPTA et al., 2003).

A maioria das enzimas industriais que têm sido utilizadas atualmente pertence ao grupo das hidrolases. As indústrias de detergentes são as consumidoras primárias de enzimas, em termos de volume e valor. A expansão na área de aplicações de enzimas está melhorando o desempenho dos detergentes líquidos enzimáticos, sendo que a classe das proteases é a primeira usada na formulação dos detergentes e as amilases o segundo tipo de enzimas empregadas para esta finalidade (MITIDIERI et al., 2006).

Apesar das amilases já serem produzidas industrialmente por diversos micro-organismos, o seu custo elevado é o principal limitante para atender a demanda crescente. De acordo com a empresa SIGMA-ALDRICH (2014), o valor para aquisição de α -amilase de *Aspergillus oryzae* contendo 30 U/mg é de R\$ 17,88/g. O valor para amiloglicosidase de *Aspergillus niger* contendo 300 U/mL é de R\$ 454,00/mL e para a mesma enzima, porém de *Rhizopus* sp contendo 40 U/mg é de R\$ 1.491,00/g.

3.4 Produção de amilases

As amilases apresentam vasta ocorrência podendo ser obtidas de plantas, animais e micro-organismos. Contudo, enzimas de origem fúngica e bacteriana são predominantemente aplicadas nos setores industriais. A principal vantagem da utilização de fungos para a obtenção de amilases é a capacidade de produção em grandes quantidades e facilidade de manipulação. Enzimas amilolíticas têm recebido grande atenção por causa de sua importância tecnológica, benefícios econômicos e aplicabilidade na produção comercial de glicose (GUPTA et al., 2003; SALEEM e EBRAHIM, 2013).

O potencial da utilização de micro-organismos como fontes de enzimas relevantes industrialmente tem estimulado interesses na exploração de enzimas extracelulares de vários micro-organismos. Diversos são os micro-organismos produtores de amilases, destacando as espécies dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Bacillus* (BURHAN et al., 2003; SIVARAMAKRISHNAM et al., 2006; ALVA et al., 2007; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008).

Os fungos são especialmente valorizados, por ser uma excelente fonte de enzimas de interesse industrial. Os pertencentes ao gênero *Rhizopus* possuem destaque por serem bons produtores de amilases e possuem a capacidade de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos resíduos agroindustriais (JIN et al., 2002; RAY, 2004; NOROUZIAN et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008). Além disso, espécies desse gênero já foram empregadas com eficiência na diminuição dos níveis de contaminação pelas micotoxinas aflatoxina B1 e ocratoxina A (FURLONG, CACCIAMANI e BUFFON, 2007). Vatter, et al (2004), reportaram propriedades antimicrobianas de extratos fenólicos obtidos a partir de *Rhizopus oligosporus* cultivado em estado sólido.

Rhizopus oligosporus – sinônimo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* é um fungo filamentoso de crescimento rápido pertencente à divisão *Zygomycota* que são caracterizados por hifas não septadas (cenocíticas). As colônias são cinza-castanho pálido, e os esporangióforos com pigmentação escura ocorrem solitários ou em grupos com esporângios globosos. É comumente utilizado na preparação de um produto fermentado de soja popular na Indonésia chamado Tempeh (RANDHIR et al., 2004). O fungo *R. oligosporus* é caracterizado como um organismo “*Generally Recognized as Safe – GRAS*” pelo órgão FDA (*US Food and Drug Administration*), classificação dada a elementos de reconhecida segurança para uso alimentar (GUPTA et al., 2003; MISZKIEWICZ et al., 2004; RANDHIR et al., 2004; VATTER et al., 2004).

A composição de sacarídeos obtida após o rompimento das cadeias do amido é altamente dependente das condições de hidrólise, da temperatura, dependência do pH, estabilidade, especificidade e origem das enzimas. Por isso, o *screening* e estudo de diferentes micro-organismos produtores de amilase pode facilitar a descoberta de enzimas amilolíticas com propriedades e características bioquímicas específicas para uma variedade de processos industriais que requerem a sacarificação eficiente do amido (WANG et al., 2011).

3.5 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido é definida como um bioprocessamento que pode ser realizado na ausência ou quase ausência de água livre, no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para manter o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo. A matriz sólida pode ser fonte de carbono e outros nutrientes, ou ser constituída de um material inerte com soluções nutritivas impregnadas, para suportar e favorecer o crescimento microbiano (THOMAS et al., 2013).

Enzimas e metabólitos secundários, que são produtos de interesse biotecnológico, foram produzidos pelos micro-organismos, ao longo do processo evolutivo, para o uso em substratos sólidos úmidos, conseqüentemente, o cultivo em suspensões aquosas pode prejudicar a eficiência metabólica deles (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Por isso, as FES fornecem aos micro-organismos um ambiente próximo ao natural onde normalmente eles existem e foram isolados. Este parece ser o principal motivo dos altos rendimentos neste tipo de bioprocessamento quando comparado com a fermentação submersa, mesmo com os parâmetros de processo otimizados (THOMAS et al., 2013).

O desenvolvimento sustentável da fermentação submersa (FSm) possui limitantes como alto consumo de energia e poluição. Por outro lado, a FES assegura vantagens como economia de água, economia de energia e baixo custo, bem como uma oferta suficiente de oxigênio, menos efluentes orgânicos e maior rendimento do produto final. Compostos de alto valor agregado podem ser produzidos utilizando resíduos industriais e agrícolas de baixo custo. O processo de FES é utilizado na produção de alimentos (molho de soja, aromas e fragrâncias); células microbianas (proteína unicelular e fungos comestíveis); enzimas microbianas (amilase, glicosidase, celulase), e outros metabólitos microbianos (nucleotídeos, lipídios, vitaminas, aminoácidos, etc.) (CHEN, 2013).

A esterilidade é um fator limitante nas FSm, porque muitos contaminantes podem competir com o organismo do processo nas condições de alta disponibilidade de água. No

entanto, os processos de FES geralmente envolvem um micro-organismo que cresce rapidamente sob as condições de baixa disponibilidade de água. Assim, com a adição do inóculo a um substrato (cozido), o organismo de interesse é capaz de competir com os contaminantes, o que não exige uma operação rigorosamente asséptica do biorreator neste tipo processo. Os requisitos de projeto menos rigorosos para tais reatores e conseqüentemente, custos mais baixos é um ponto favorável da FES, proporcionando uma vantagem econômica sobre a FSm (PANDEY et al., 2000).

Enzimas importantes industrialmente têm sido tradicionalmente produzidas por fermentação submersa, mas recentemente, os processos de fermentação em estado sólido têm sido usados com maior frequência na produção destas enzimas (HASHEMI et al., 2010). A fermentação em estado sólido utilizando diferentes espécies de fungos filamentosos é um procedimento potencialmente útil, uma vez que estes organismos possuem a capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas extracelulares que degradam principalmente as substâncias celulósicas e a lignina (BÖHMER et al., 2011).

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo, portanto, sua otimização é de grande importância (JOO e CHANG, 2005). Segundo Carvalho et al. (2008), vários subprodutos agrícolas e industriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à obtenção destas enzimas em larga escala. Além do retorno econômico a reutilização desses materiais contribui para minimizar o impacto ambiental (GUANDALINI, 2007).

3.5.1 Farelo de trigo

A escolha dos materiais lignocelulósicos deve ser baseada na sua abundância e custos, bem como nas suas características físico-químicas (DELABONA et al., 2012). A farinha de trigo (*Triticum* spp.) é produzida em grandes quantidades pela indústria de processamento agrícola e gera como subproduto o farelo de trigo, utilizado principalmente para alimentação animal (IMMERZEEL et al., 2014). Mundialmente, a biomassa de farelo de trigo pode ser estimada em 150 milhões de toneladas por ano. Como este material tem baixo

valor agregado há um interesse cada vez maior em encontrar novas estratégias para a sua utilização (PRÜCKLER et al., 2014).

Como o farelo de trigo é histológica e quimicamente heterogêneo, os tratamentos para isolar produtos de valor dependem em grande parte do tecido alvo. (APPRICH et al., 2014). Vários tratamentos, como moagem, aquecimento, extração, extrusão e fermentação oferecem potencial para aumentar a aplicabilidade do farelo de trigo. Sua estrutura complexa pode ser alterada por ação enzimática, entretanto as enzimas purificadas são muitas vezes economicamente inviáveis. Deste modo, o cultivo de micro-organismos que produzem a enzima desejada no farelo de trigo como substrato pode oferecer uma maneira possível e viável para melhorar sua função tecnológica e nutricional (PRÜCKLER et al., 2014).

O farelo de trigo é obtido durante a moagem convencional dos grãos por tecnologias de dissociação e separação do endosperma amiláceo (farinha). Do ponto de vista histológico, o farelo de trigo é composto de diferentes tecidos com propriedades distintas: pericarpo, tegumento e camada aleurona, que representam 4-5, 1 e 6-9% do grão de trigo, respectivamente. Geralmente, o farelo de trigo possui em sua composição aproximadamente 12% de água, 13-18% de proteína, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos (PRÜCKLER et al., 2014). Além disso, é uma importante fonte de fibra dietética, vitaminas e minerais (CODA et al., 2014)

A aplicação do farelo de trigo no setor de alimentos ocorre em menor proporção. No entanto, a composição geral deste material oferece o potencial para ser usado como um substrato para biorrefinaria. A Figura 2 ilustra um fluxo de massa com base em dados publicados, levando em consideração a variação natural de possíveis compostos e produtos derivados. Além disso, os rendimentos são demonstrados em função da variação e viabilidade tecnológicas (APPRICH et al., 2014).

Na literatura diversos trabalhos realizados com farelo de trigo e outros resíduos agroindustriais de baixo custo em sistemas de FES, comprovam a superioridade do farelo de trigo como substrato e indutor para secreção de amilases, principalmente fúngicas, e obtenção dos níveis máximos de produção enzimática (ELLIAH et al., 2002; ANTO et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; HASHEMI et al., 2010; DELABONA et al., 2013). Isto demonstra que o farelo de trigo empregado com a tecnologia de FES constitui um processo adequado para aplicações biotecnológicas economicamente viáveis.

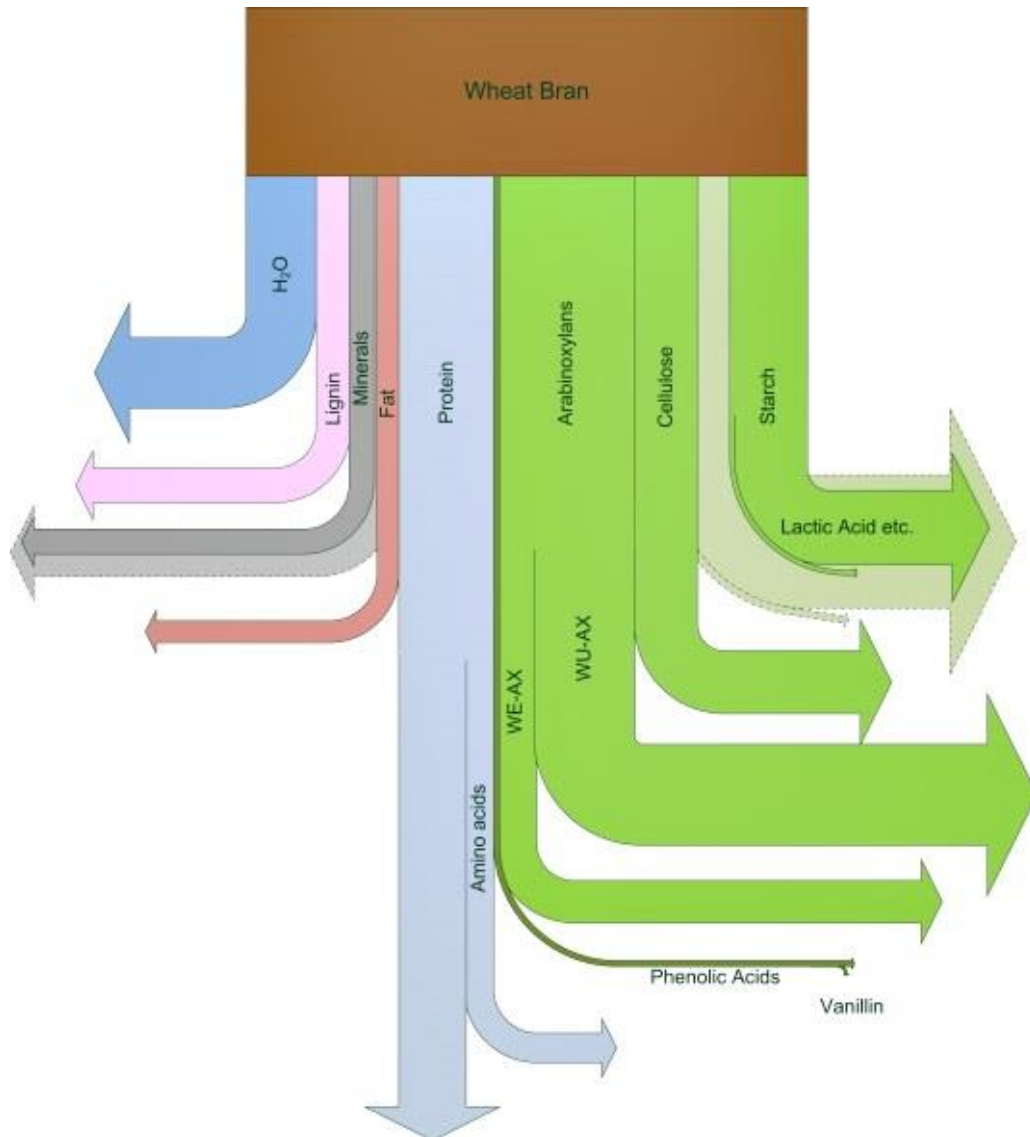


Figura 2. Ilustração de fluxos de massa dos componentes do farelo de trigo e possíveis produtos. *Wheat bran*: farelo de trigo; *Lignin*: lignina; *Minerals* minerais; *Fat*: gordura; *Protein*: proteína; *Amino acids*: aminoácidos; *Arabinoxylans*: arabinosilanas; *WE-AX* (*water-extractable arabinosylan*): arabinosilanas solúveis/extraíveis por água; *WU-AX* (*water-unextractable arabinosylan*): arabinosilanas insolúveis/não extraíveis por água; *Phenolic acids*: ácidos fenólicos; *Vanillin*: vanilina; *Cellulose*: celulose; *Starch*: amido; *Lactic acid*: ácido láctico. Fonte: Adaptado de Apprich et al. (2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo e inóculo

A linhagem de *Rhizopus oligosporus* (CCT 3762) proveniente da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas – SP foi repicada em frascos Erlenmeyer 250 mL contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e mantida a 30 °C por 7 dias. Após o crescimento, a superfície foi lavada com uma solução 0,01% (v/v) de Tween 80 estéril para remoção dos esporangiósporos, visando o preparo da suspensão de esporos que foi inoculada sobre o meio de cultivo em estado sólido.

4.2 Planejamento experimental para avaliação dos componentes do meio de FES

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de farelo de trigo. Para determinar o efeito da suplementação de sais na produção de amilase foi realizado um teste preliminar para estabelecer o melhor intervalo para ser utilizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta. A solução padrão de sais com composição em m/m: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 9,3%; KH_2PO_4 , 4,75%; ureia, 2,3% (SOCCOL et al.,1994) foi comparada com experimentos sem suplementação e com concentrações intermediárias (Tabela 1). Os substratos foram preparados com 60% de umidade, esterilizados à 121 °C por 20 min, inoculados com 1×10^6 esporos por grama de substrato seco e incubados a 30 °C por 120 horas.

Tabela 1. Diferentes concentrações de sais (% m/m) como fontes de nutrientes na FES.

Ensaio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4	Ureia
1	9,3	4,8	2,3
2	0	0	0
3	5	2,5	2,5
4	2,5	1,25	1,25
5	2,5	1,25	2,5

Metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar o efeito das variáveis selecionadas e as melhores concentrações correspondentes para maximizar a produção de amilase. As variáveis independentes foram as concentrações dos sais X_1 : sulfato de amônio, X_2 : fosfato de potássio monobásico e X_3 : ureia. Foi realizado um DCCR 2^3 tendo cinco níveis codificados (-1.68, -1, 0, +1, +1.68), seis pontos axiais e três repetições do ponto

central, totalizando 17 ensaios. A resposta analisada, variável dependente, foi a atividade amilolítica expressa em unidades de enzima por grama de farelo de trigo seco ofertado durante a FES. A tabela 2 apresenta os valores estudados para as três variáveis, tanto codificados como reais e a tabela 3, a matriz do delineamento com os níveis codificados das condições testadas.

Tabela 2. Especificação dos níveis das variáveis utilizadas no DCCR 2³.

Níveis codificados	Valores reais das variáveis em estudo (% , m/m)		
	Sulfato de amônio (X_1)	Fosfato de potássio (X_2)	Ureia (X_3)
-1,68	0,00	0,00	0,00
-1,00	0,50	0,25	0,25
0,00	1,25	0,63	0,63
1,00	2,00	1,00	1,00
1,68	2,50	1,25	1,25

Tabela 3. Matriz do DCCR 2³ com níveis codificados para o estudo da influência da concentração dos sais.

Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

4.3 Extração enzimática

A amilase foi extraída dos substratos fermentados com água destilada por agitação em *shaker* orbital a 180 rpm e 30 °C por 30 min. O extrato enzimático foi separado por filtração e utilizado para o ensaio de atividade enzimática e avaliação das diferentes condições de cultivo. Foram utilizados três protocolos: 5 mL de água destilada por grama de substrato seco (GUANDALINI, 2007); 10 mL de água destilada por grama de substrato (SPIER, 2005); e uma extração fracionada com adição de 5 mL/g seguida de agitação e filtração, acompanhada da adição de 5 mL de água por grama do material retido na primeira filtração, seguida de uma segunda etapa de agitação e filtração.

4.4 Planejamento experimental para avaliação da influência da umidade e concentração de inóculo

Foi realizado um DCCR 2², com quatro pontos axiais e três repetições do ponto central, totalizando 11 ensaios. A tabela 4 apresenta os valores estudados para as três variáveis e a tabela 5 o delineamento com as condições realizadas.

Tabela 4. Especificação dos níveis das variáveis utilizadas no DCCR 2².

Níveis codificados	Valores reais das variáveis em estudo	
	Inóculo (esporos/g) (X_1)	Umidade (%) (X_2)
-1,41	$1,00 \cdot 10^5$	40,00
-1,00	$3,70 \cdot 10^5$	44,36
0,00	$1,05 \cdot 10^6$	55,00
1,00	$1,70 \cdot 10^6$	65,64
1,41	$2,00 \cdot 10^6$	70,00

Tabela 5. Matriz do DCCR 2² com níveis codificados para estudo da influência da umidade do meio de cultura e concentração de inóculo.

Ensaio	X_1	X_2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

4.5 Variação do tempo de cultivo em diferentes temperaturas

De posse dos resultados quanto à formulação do meio, pela determinação da melhor concentração dos sais, umidade e inóculo, foram realizados os testes de variação do tempo de cultivo em 72, 96, 120 e 144 horas, sob as temperaturas de 25, 28, 30 e 35 °C.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Determinação de açúcares redutores e atividade enzimática

Foi realizada a dosagem de açúcares redutores liberados durante a reação enzimática pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959). Para a reação, foram adicionados 0,1 mL de solução enzimática a 0,65 mL de solução 0,5% (m/v) de amido em tampão acetato pH 5,5 (0,05 mol/L). Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C, durante 10 minutos. Foram adicionados 0,5 mL do reagente DNS e a mistura foi levada ao banho de ebulição por 5 minutos. Em seguida, os tubos de reação foram resfriados em banho de gelo e o conteúdo diluído com 3,75 mL de água destilada. Os tubos foram agitados por inversão e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

O valor obtido na leitura foi utilizado no cálculo da concentração de açúcares redutores, a partir de uma curva padrão relacionando concentração de glicose com densidade óptica. O controle da reação foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose por minuto de reação e expressa em U/g de substrato seco.

4.6.2 Atividade celulolítica (CMCase)

Para determinação da atividade celulolítica utilizou-se uma solução 0,5% de CMC – Carboximetilcelulose em tampão acetato pH 5,5 (0,05 mol/L) como substrato. Foram adicionados 0,1 mL de solução enzimática a 0,65 mL de solução de CMC e incubados a 50 °C durante 10 minutos. Para determinação dos açúcares redutores foi utilizado o método DNS. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por minuto de reação.

4.6.3 Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando o reagente Coomassie Blue G e soro-albumina bovina (BSA) como padrão para curva de calibração. A concentração de proteínas foi estimada com leituras de absorvância a 595 nm.

4.7 Precipitação fracionada e purificação parcial com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto foi submetido à precipitação fracionada 30-80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de acordo com o trabalho de Freitas (2012). O sal foi adicionado lentamente com agitação branda em banho de gelo e permanecendo em repouso por 24 h sob refrigeração para precipitação proteica. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm e 4°C durante 20 minutos. O precipitado foi solubilizado em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,5 e dialisado contra o mesmo tampão (ENGLARD e SEIFTER, 1990). O tempo de diálise variou de 24 a 48 horas.

4.8 Caracterização bioquímica do extrato enzimático

4.8.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica

O efeito da temperatura na atividade enzimática do extrato bruto e precipitado foi estudado pela incubação da mistura de reação enzimática, contendo a solução de enzima com o substrato, em diferentes temperaturas: 40, 50, 55, 60, 65, 70 e 80 °C por 10 min. Em seguida foi realizada a quantificação dos açúcares redutores liberados.

No teste de estabilidade térmica as soluções enzimáticas foram incubadas na ausência de substrato em várias temperaturas. Após 30 min e 1h, uma alíquota de 0,1 mL da enzima foi retirada e misturada com a solução 0,5% de amido solúvel. As misturas foram

incubadas a 60 °C durante 10 min e os açúcares redutores determinados como descrito no item 4.6.1 - Determinação de açúcares redutores e atividade enzimática.

4.8.2 Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade

O efeito do pH na atividade foi determinado utilizando como substrato para a reação enzimática o amido solúvel (0,5%) em tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L, pH 3, 4, 5, 6 e 7. Para os ensaios de estabilidade ao pH, os extratos enzimáticos foram submetidos aos diferentes valores de pH, variando de 3 a 7, nos mesmos tampões a 25 °C por uma hora. Após esse período, procedeu-se com a reação enzimática utilizando a solução de amido padrão em tampão acetato pH 5,5 para a quantificação da atividade residual.

4.9 Hidrólise enzimática de diferentes substratos amiláceos e produção de xarope de glicose

As melhores condições de pH e temperatura para a reação enzimática foram empregadas na hidrólise do amido e obtenção de açúcares redutores. Os substratos utilizados no processo biocatalítico foram amido solúvel, farinha de trigo tipo II e farelo de trigo, gelatinizados em tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L, pH 5. As soluções foram preparadas de modo a se obter uma concentração final de 5% (m/v) de carboidrato, considerando o teor presente em cada substrato (Tabela 13). A reação de hidrólise do amido ocorreu pela incubação do substrato juntamente com o extrato enzimático na proporção de 1,2 U/mL na temperatura de 55 °C. Foram retiradas amostras a cada 30 minutos por um período de até 7 horas e o produto analisado quanto ao teor de açúcar redutor determinado por espectrofotometria e expresso em porcentagem como rendimento da conversão de amido em açúcar redutor. Após este processo, o xarope resultante passou por uma etapa de filtração e foi concentrado em evaporador até atingir a concentração de 20% (m/v) de glicose.

4.10 Análise dos resultados

A análise de variância e teste de Tukey foram realizados com o software BioEstat 5.0 para verificar as diferenças entre as médias a um nível de significância de 0,05. O software estatístico STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.) foi utilizado para calcular os principais efeitos das variáveis e suas interações, a análise de variância (ANOVA), análise de regressão, as superfícies de resposta e curvas de contorno nos testes de DCCR, utilizando um nível de significância de 0,1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento experimental para avaliação dos componentes do meio

O experimento preliminar para determinar o melhor intervalo de concentrações a ser utilizado no planejamento experimental, indicou que a maior produção de amilase foi de 367 U/g (ensaio 3) para valores intermediários de concentração dos sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e ureia. Isto representa um aumento de 100% na atividade enzimática, quando comparado com os testes que utilizaram apenas farelo de trigo (180 U/g) como substrato (ensaio 2) e aqueles que foram suplementados com a máxima concentração sais (181 U/g) da solução padrão (ensaio 1), como apresentado na figura 3.

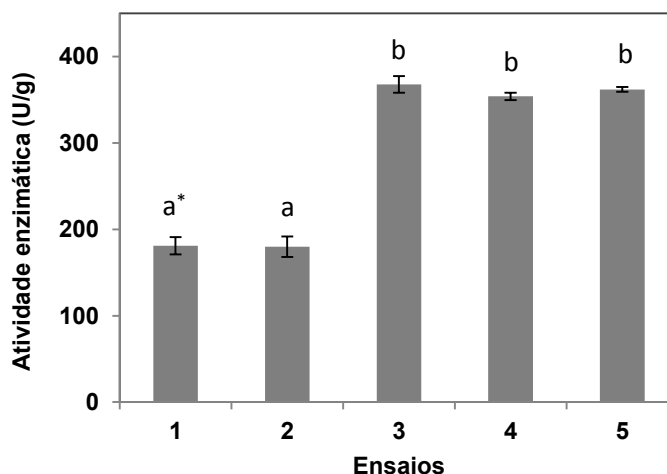


Figura 3. Ensaio de FES com diferentes concentrações de sais. (1) Solução padrão de sais; (2) Ausência de suplementação; (3), (4) e (5) Concentrações intermediárias. Valores especificados na tabela 1. * médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas (Teste de Tukey, $p > 0,05$). Barras de erros correspondentes aos valores de desvio padrão.

No presente trabalho os resultados com a solução padrão foram superiores à produção de glicoamilase (108 U/g) do estudo de Soccol et al. (1994) utilizando *Rhizopus oryzae* 28627 em fermentação em estado sólido e mandioca crua como substrato. Além disso, para a recuperação da enzima os autores empregaram 10 mL de água destilada por grama de meio fermentado, enquanto que os valores apresentados na tabela 6 foram obtidos com o protocolo de extração ainda não aperfeiçoado (5 mL/g), como será detalhado posteriormente no item 5.3 – Extração enzimática.

A composição do substrato influencia diretamente na atividade enzimática do fermentado. Além da fonte de carbono, sais minerais e nitrogênio são fatores essenciais para cumprir as exigências nutricionais dos meios de cultivo para a maioria dos micro-organismos. Deste modo, um teor adicional de proteína no substrato pode contribuir para o enriquecimento do meio e melhorar a produção enzimática (FREITAS et al., 2014).

O farelo de trigo é um substrato que oferece um importante aporte nutritivo ao micro-organismo, disponibilizando nitrogênio na forma de proteína (13-18%) em proporções superiores a outros substratos, como por exemplo, o farelo de mandioca, avaliado por Freitas et al. (2014), que possui apenas 2,6% de proteína. Porém, um aumento da concentração de nitrogênio conduz à maior expressão da amilase (KAMMOUM et al., 2008), apontando para a necessidade de um suprimento adicional de nitrogênio, como revelado por este estudo nos testes com farelo de trigo acrescido ou não de sais (Figura 3 – ensaios 2 e 3).

O estudo de Kammoum et al. (2008) revelou que o uso de diferentes fontes de nitrogênio parece ser a melhor maneira para produção de amilase e que, entre as fontes testadas, a ureia mostrou influência mais forte, seguida de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Isso corrobora a utilização destas fontes de nitrogênio para a suplementação do meio de FES no presente trabalho. No entanto, os resultados mostraram que a redução da concentração de sais dobrou a produção enzimática, em comparação com a solução padrão, correspondente à máxima concentração de sais testada. Isso indica as proporções mais elevadas dos componentes testados, causaram um possível efeito inibitório, como alteração do equilíbrio osmótico nas células fúngicas, afetando a síntese de amilase por *R. oligosporus*.

O fosfato parece desempenhar um papel importante na expressão de amilase. Este resultado confirma o proposto pela literatura que indica que este componente atua como regulador na síntese de metabólitos primários e secundários em micro-organismos e do mesmo modo que afeta o crescimento e a produção de amilase. Foram relatados aumentos significativos na produção de enzimas por *A. oryzae* com níveis de fosfatos acima de 0,2 M e ausência de produção de amilase por *B. amyloliquefaciens* com baixos níveis de fosfato. Porém, altas concentrações de fosfato foram inibitórias para a produção de enzimas por *B. amyloliquefaciens* (GUPTA et al., 2003).

Processos fermentativos com altos custos podem dificultar o potencial de industrialização (HUANG et al., 2013). Como cerca de 30-40% do custo de produção das enzimas industriais corresponde ao meio de crescimento (JOO e CHANG, 2005), o desenvolvimento de um bioprocessamento economicamente viável aponta a máxima produção

enzimática com o menor gasto possível pela utilização de resíduos agroindustriais e suplementação mínima de nutrientes.

Como os ensaios 3,4 e 5 foram estatisticamente iguais quanto à atividade, as menores concentração de sais do teste 4 foram selecionadas como os valores máximos dos intervalos utilizados no planejamento experimental e os valores mínimos foram correspondentes à ausência de suplementação. Foi empregado um DCCR 2³, com seis ensaios nos pontos axiais e três repetições da condição central (Tabela 6).

Tabela 6. Delineamento experimental para o processo de obtenção de amilase, as respostas obtidas e os valores previstos pelo modelo estatístico.

Ensaio	Variáveis codificadas			Atividade (U/g)	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	Ureia	Experimental	Previsto
1	-1	-1	-1	244,4	244,56
2	1	-1	-1	240,6	264,34
3	-1	1	-1	258,4	244,56
4	1	1	-1	264,7	264,34
5	-1	-1	1	328,2	339,16
6	1	-1	1	339,1	319,38
7	-1	1	1	312,3	339,16
8	1	1	1	313,9	319,38
9	-1,68	0	0	287,9	298,49
10	1,68	0	0	320,8	298,49
11	0	-1,68	0	318,9	294,65
12	0	1,68	0	282,2	294,65
13	0	0	-1,68	227,7	225,90
14	0	0	1,68	361,6	351,60
15	0	0	0	323,8	327,42
16	0	0	0	324,9	327,42
17	0	0	0	331,5	327,42

A quantidade de amilase sintetizada por *R. oligosporus* variou de 227,7 U/g (ensaio 13) a 361,6 U/g (ensaio 14). Esta variação reflete a importância da otimização do meio para alcançar maior produtividade. Para o valor mais baixo de atividade enzimática

obtida não houve adição de ureia e para o valor mais alto, a concentração de ureia foi a maior utilizada no planejamento (1,25%). Ou seja, as respostas de máximo e mínimo de atividade pertencem aos ensaios nos pontos axiais da ureia.

Tabela 7. Coeficientes de regressão para o modelo polinomial utilizando variáveis codificadas.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (7)	p - valor
Média	327,42	7,09	46,18	< 0,0001
X_1 (L)	5,15	3,33	1,55	0,1662
X_1 (Q)	-10,25	3,67	-2,79	0,0268
X_2 (L)	-4,74	3,33	-1,42	0,1980
X_2 (Q)	-11,61	3,67	-3,16	0,0158
X_3 (L)	37,41	3,33	11,23	< 0,0001
X_3 (Q)	-13,70	3,67	-3,73	0,0073
$X_1 X_2$	0,10	4,35	0,02	0,9818
$X_1 X_3$	1,27	4,35	0,29	0,7795
$X_2 X_3$	-9,89	4,35	-2,27	0,0572

Com a análise dos coeficientes de regressão (Tabela 7) é possível observar que os termos relacionados às três variáveis (X_1 , X_2 e X_3), bem como a interação entre as variáveis X_2 e X_3 , apresentaram efeitos estatisticamente significativos, afetando a síntese de amilase. O modelo com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros significativos $p < 0,10$ é expresso por:

$$\text{Atividade (U/g)} = 327,42 - 10,25 X_1^2 - 11,61 X_2^2 + 37,41 X_3 - 13,70 X_3^2 - 9,89 X_2 X_3$$

A análise de variância (Tabela 8) para as variáveis indicaram que a atividade enzimática pode ser descrita por um modelo polinomial com alto coeficiente de determinação, cuja variação explicada foi de 93%. A figura 4 mostra os valores experimentais versus os valores previstos pelo modelo ajustado, mostrando uma boa concordância entre eles.

Tabela 8. ANOVA para a resposta atividade enzimática (U/g).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{cal}
Regressão	22956,72	5	4591,34	29,01
Resíduos	1741,04	11	158,28	
Total	24697,76	16		

% de variação explicada (R^2) = 92,95%; $F_{5;11;0.1} = 2,45$.

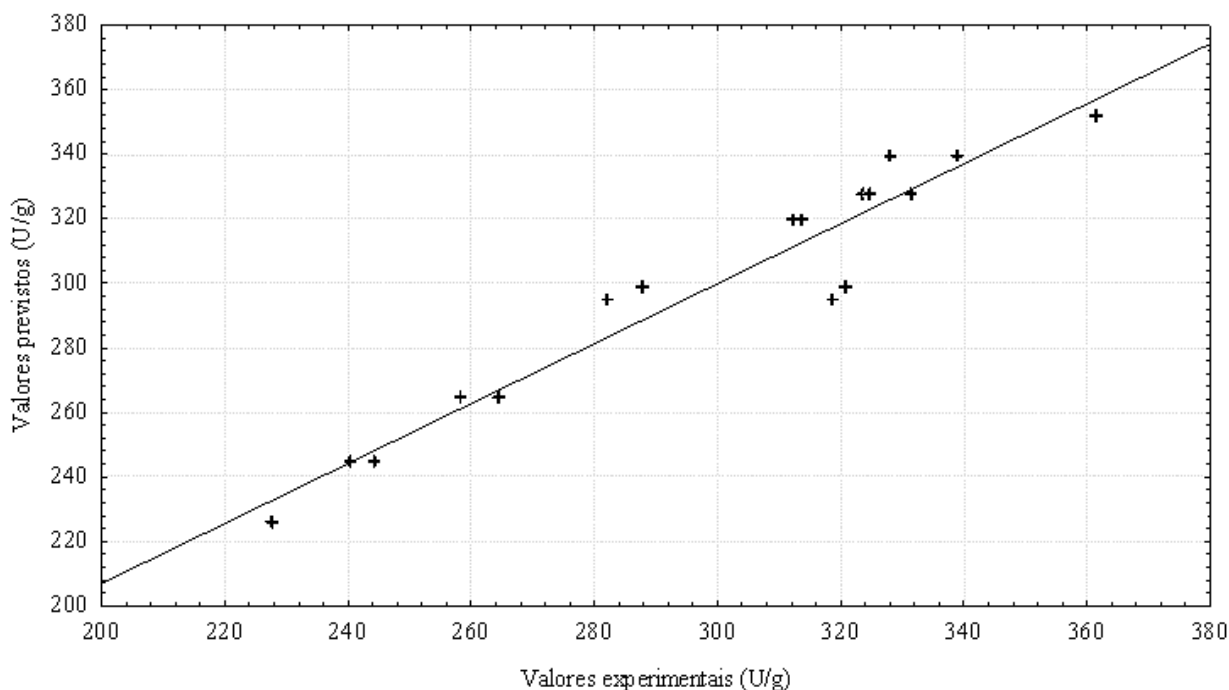


Figura 4. Valores experimentais da atividade enzimática (U/g) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

Através da análise das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 5) verifica-se que para a obtenção da máxima produção enzimática deve-se trabalhar com as fontes de nitrogênio e fósforo, sulfato de amônio e fosfato de potássio, em concentrações ao redor de 1,25% e 0,63% (condições do ponto central), respectivamente. No entanto, para valores mais altos de fosfato de potássio, a produção enzimática decresce e para as concentrações mais baixas a atividade aumenta (Figura 5E e 5F).

Foi verificada uma concentração ótima de 2,0 g/L de KH_2PO_4 como fonte de fósforo para a produção de peroxidase manganês-dependente de *Phanerochaete chrysosporium* em meio de cultura submerso. No entanto, a produção da enzima pode ser limitada pela elevada concentração de fósforo no meio de cultura, como verificado nos testes com 4,0 g/L de KH_2PO_4 em que a produção máxima de peroxidase manganês-dependente foi mais baixa do que em sistemas contendo concentrações de fósforo inferiores (LIANG et al., 2012).

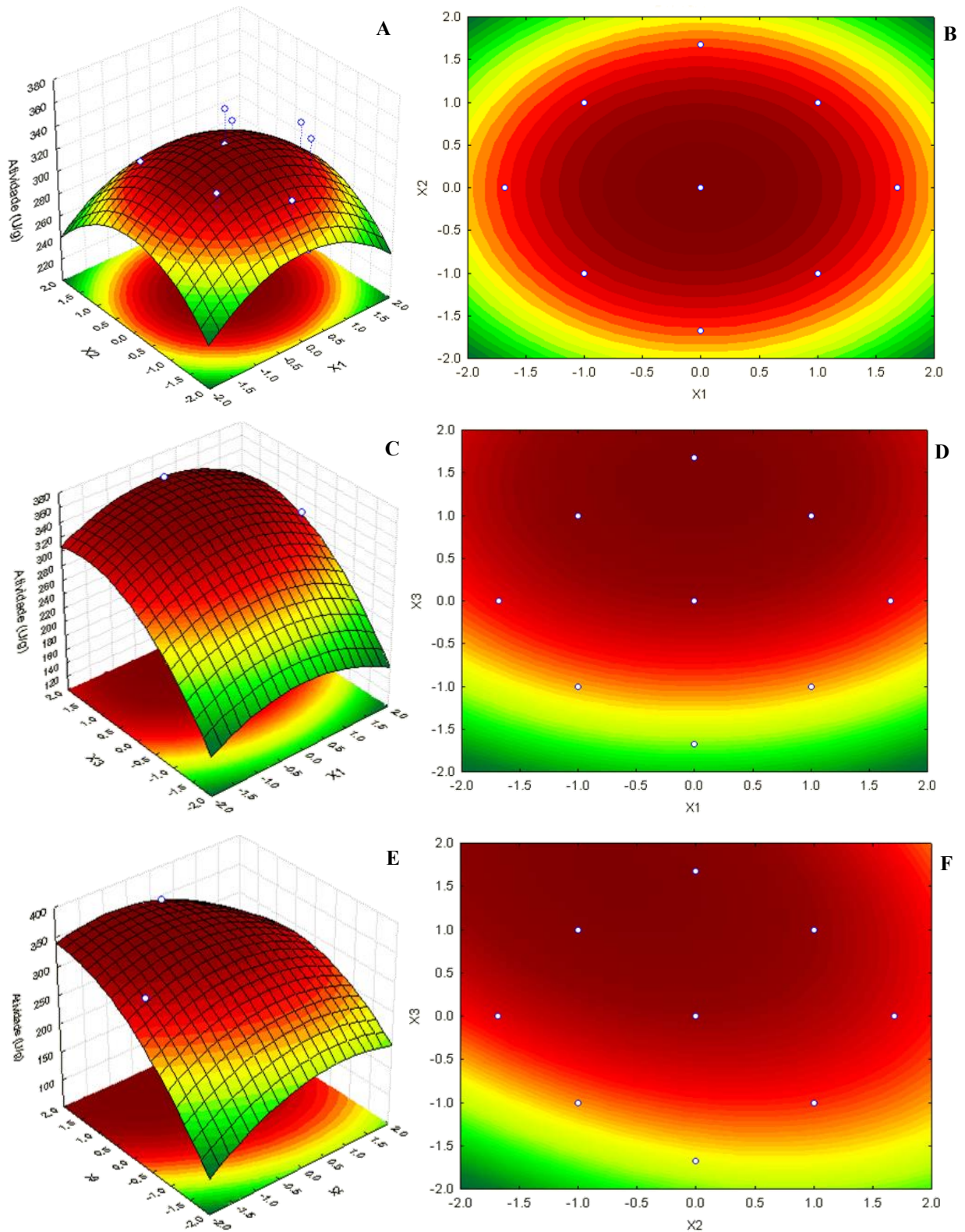


Figura 5. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/g) em função de X_1 e X_2 (A) e (B), X_1 e X_3 (C) e (D) e X_2 e X_3 (E) e (F). X_1 : Sulfato de amônio; X_2 : Fosfato de potássio; X_3 : Ureia.

Há uma forte influência da concentração de ureia sobre a resposta, de modo que a maior produção enzimática pode ser observada no ensaio com a concentração de 1,25%, o maior valor testado (Figuras 4C e 4E). Kammoum et al. (2008) verificaram a necessidade de acrescentar, entre outros nutrientes, ureia (0,5 g/g substrato seco) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 g/g) para otimização de um meio de cultivo submerso utilizando uma cepa de *Aspergillus oryzae* e planejamento experimental. Foi obtido um aumento na atividade amilolítica de 31,3 U/mL para 148,0 U/mL, demonstrando a importância destes componentes para a produção de amilases fúngicas.

5.2 Validação do modelo

A máxima atividade amilolítica (361,6 U/g) foi observada no experimento 14 (0, 0, +1,68) com a adição dos nutrientes 1,25% (m/m) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,63% (m/m) KH_2PO_4 e 1,25% (m/m) ureia. A adequação do modelo foi examinada por experimentos adicionais utilizando as condições ótimas previamente determinadas. O maior valor predito pelo modelo estatístico foi de 351,6 U/g (ensaio 14) e o valor experimental de validação foi $346,8 \pm 4$ U/g. Isto revela mais de 98% do valor predito, o que indica que o modelo gerado garante uma previsão adequada da produção de enzima. O modelo estatístico de amilase foi eficaz para prever os perfis de fermentação que utilizam diferentes concentrações dos componentes estudados com um elevado coeficiente de determinação.

Como a atividade aumenta para concentrações mais baixas de fosfato de potássio e buscam-se as menores concentrações de nutrientes para o cultivo em estado sólido do fungo, foi realizado um experimento comparativo entre duas soluções com as respectivas concentrações de sulfato de amônio, fosfato de potássio e ureia: (1) 1,25%, 0,63% e 1,25%, – valores codificados: (0, 0, +1,68); e (2) 1,25%, 0,25% e 1,25%, – valores codificados: (0, -1, +1,68).

A figura 6 apresenta os resultados de atividade enzimática obtida nos ensaios com adição das soluções 1 e 2. Nota-se que não houve diferença entre as médias, de modo que é preferível adotar a solução 2 como padrão para os demais testes, uma vez que utiliza a menor concentração de fosfato de potássio. Além disso, este experimento demonstra que é possível obter elevados valores de atividade amilolítica utilizando uma faixa de concentração entre 0,25 e 0,63% ao invés de um valor único, o que confere versatilidade ao processo.

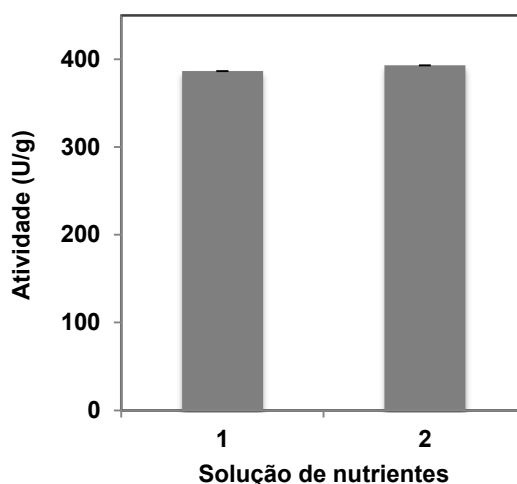


Figura 6. Validação do modelo para atividade amilolítica utilizando duas soluções de nutrientes. Solução 1 (m/m): 1,25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,63% KH_2PO_4 e 1,25% ureia – valores codificados (0, 0, +1,68); Solução 2 (m/m): 1,25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25% KH_2PO_4 e 1,25% ureia – valores codificados (0, -1, +1,68).

5.3 Extração enzimática

A eficiência na extração enzimática foi diferente para cada um dos protocolos testados. O melhor método para a extração foi aquele em que se utilizou 10 mL de água destilada por grama de substrato, no qual foi possível recuperar um extrato enzimático com atividade de 587,7 U/g (Figura 7). Nos ensaios com duas etapas de extração (5 + 5), cada uma com adição de 5 mL de água por grama de substrato, ocorreu uma perda de 11% de enzima durante a extração. Nos testes em que se utilizou 5 mL/g em apenas uma etapa houve uma perda enzimática de 28%.

Isto demonstra que, mesmo que o catalisador fique mais diluído, é necessária uma quantidade mínima de água destilada para que a maior parte da enzima presente no meio de fermentação em estado sólido passe para a fase líquida e possa ser utilizada como extrato enzimático bruto para quantificação da atividade amilolítica e as sucessivas etapas de *downstream*. A partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar o protocolo de extração enzimática com 10 mL/g para os demais ensaios de produção enzimática.

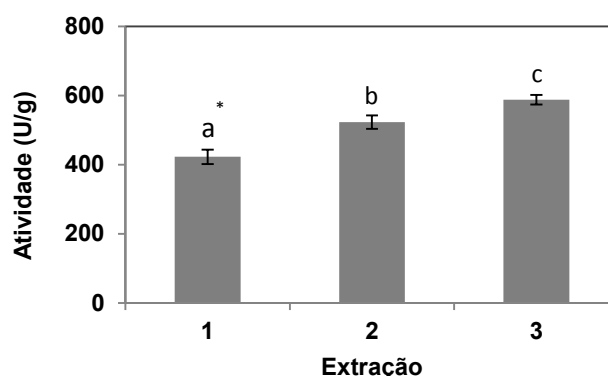


Figura 7. Quantidade de enzima recuperada com diferentes métodos de extração (volume de água destilada por grama de substrato). (1): 5 mL/g; (2): duas etapas com 5 mL/g; (3): 10 mL/g. * médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

5.4 Planejamento experimental para avaliação da influência da umidade e concentração de inóculo

Foi empregado um DCCR 2^2 , com três repetições da condição central e quatro ensaios nos pontos axiais (Tabela 9). As variáveis independentes empregadas foram concentração de inóculo (esporos/g de substrato) e umidade do meio de fermentação em estado sólido (% , m/m), nas faixas de estudo apresentadas na tabela 4.

Tabela 9. DCCR para o processo de obtenção de amilase, as respostas obtidas e os valores previstos pelo modelo estatístico.

Ensaio	Variáveis codificadas		Atividade (U/g)	
	Inóculo	Umidade	Experimental	Previsto
1	-1	-1	581,36	616,94
2	1	-1	610,38	616,94
3	-1	1	436,27	372,30
4	1	1	372,76	372,30
5	-1,41	0	570,41	571,85
6	1,41	0	540,30	571,85
7	0	-1,41	622,97	590,78
8	0	1,41	202,47	245,83
9	0	0	586,29	571,85
10	0	0	565,48	571,85
11	0	0	585,74	571,85

A quantidade de amilase sintetizada por *R. oligosporus*, obtida experimentalmente, variou de 202,47 U/g (ensaio 8) a 622,97 U/g (ensaio 7). Para o valor mais baixo de atividade enzimática o meio de FES foi preparado com 70% de umidade, enquanto que para o valor mais alto a umidade foi de 40%, um aumento de 3,1 vezes. Ou seja, as respostas de máximo e mínimo de atividade pertencem aos ensaios nos pontos axiais da umidade ($\pm 1,41$).

Tabela 10. Coeficientes de regressão para o modelo polinomial utilizando variáveis codificadas.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (5)	p - valor
Média	579,11	20,88	27,74	<0,0001
X_1 (L)	-9,65	12,80	-0,75	0,4851
X_1 (Q)	-7,74	15,28	-0,51	0,6339
X_2 (L)	-122,32	12,80	-9,55	0,0002
X_2 (Q)	-79,48	15,28	-5,20	0,0035
$X_1 X_2$	-23,13	18,08	-1,28	0,2569

Com a análise dos coeficientes de regressão (Tabela 10) é possível observar que os termos relacionados à variável umidade (X_2) apresentaram efeitos estatisticamente significativos, atuando diretamente sobre a produção amilolítica. O modelo com as variáveis codificadas incluindo apenas os parâmetros significativos $p < 0,10$ é expresso por:

$$\text{Atividade (U/g)} = 579,11 - 122,32 X_2 - 79,48 X_2^2$$

A ANOVA (Tabela 11) apresenta uma variação explicada de 94% e um F calculado adequado para avaliação da tendência de resposta (Figura 8).

Tabela 11. ANOVA para a resposta de atividade enzimática (U/g).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{cal}
Regressão	155844,6	2	77922,30	63,89
Resíduos	9757,4	8	1219,68	
Total	165602	10		

% de variação explicada (R^2) = 94,10%; $F_{2,8; 0,1} = 3,11$.

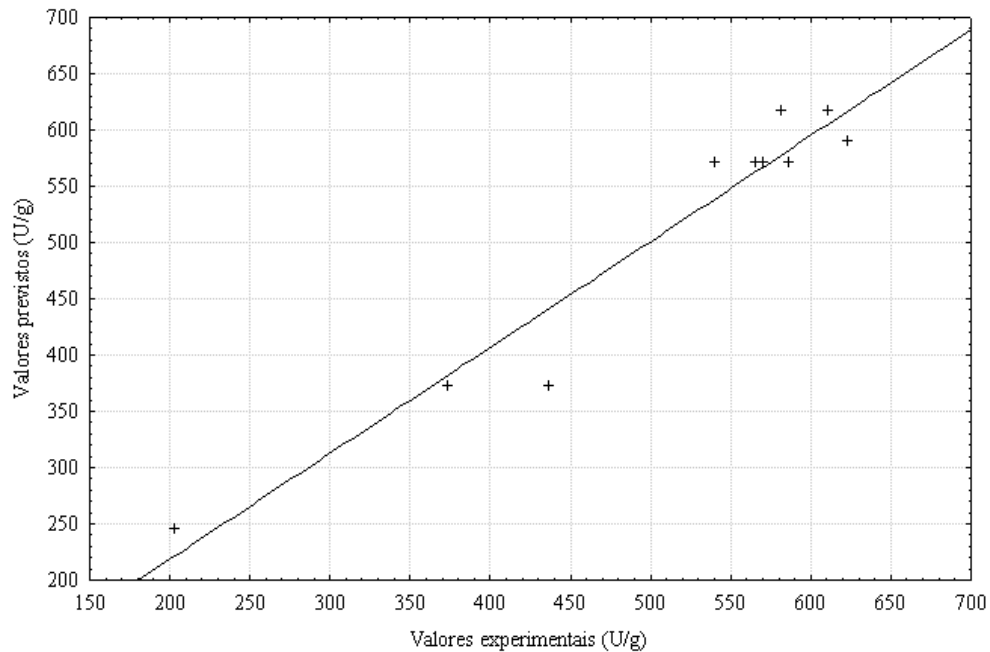


Figura 8. Valores experimentais da atividade enzimática (U/g) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

Através da análise da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 9) foi possível verificar a forte influência da umidade do meio na produção enzimática. Para obtenção dos maiores resultados de atividade enzimática deve-se trabalhar com a umidade em uma faixa de 44 a 55%. A concentração de inóculo não apresentou influência sobre a produção amilolítica, assim, é possível a produção de amilase em nível máximo utilizando inóculo na faixa de 1.10^5 a 2.10^6 esporos por grama de substrato.

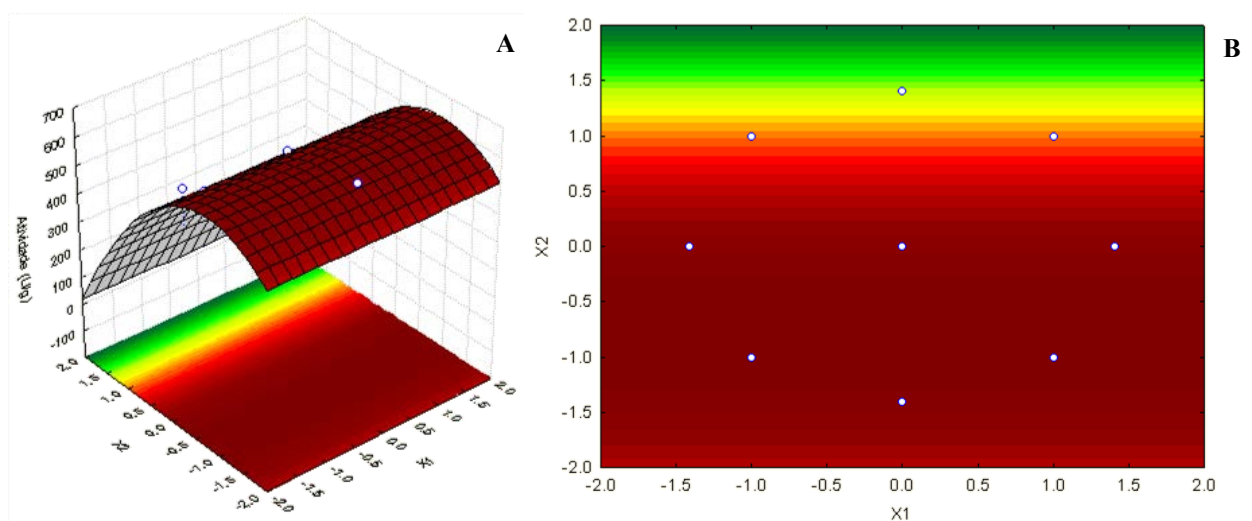


Figura 9. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade enzimática (U/g) em função da concentração de Inóculo (X_1) e Umidade (X_2).

A máxima atividade amilolítica prevista pelo modelo (616,9 U/g) foi observada nos experimentos 1 e 2 com 44,36% de umidade, seguida do experimento 7, com atividade prevista de 590,8 U/g (40% de umidade), e dos ensaios 5, 6, 9 10 e 11 com 571,85 U/g e 55% de umidade. Como a análise da superfície de resposta demonstrou uma faixa de 44 a 55%, a adequação do modelo foi examinada por um experimento adicional em triplicata utilizando 50% de umidade. O valor experimental de validação foi $602,9 \pm 6,6$ U/g, o que revela 98% da maior atividade predita (616,9 U/g). Isso demonstra que o modelo estatístico foi eficaz para prever os perfis de fermentação ao utilizar-se de diferentes concentrações de umidade com um elevado coeficiente de determinação.

As principais vantagens da FES são em consequência da fisiologia diferente apresentada por fungos e outros micro-organismos em um substrato sólido, em relação ao meio de fermentação submersa (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Portanto, fermentações em estado sólido formuladas com teores de umidade mais baixos se tornam mais semelhantes aos substratos úmidos encontrados pelos fungos no ambiente natural, bem como assegura uma atividade metabólica mais eficiente por manter uma porosidade maior e facilitar a difusão do oxigênio. Por outro lado, uma umidade muito alta resulta na diminuição das trocas gasosas.

O teor de água no substrato sólido das FES geralmente oscila na faixa de 12-80%, principalmente ao redor de 60% (CHEN, 2013), uma vez que a umidade ideal depende tanto do substrato sólido quanto do micro-organismo utilizado. Um efeito semelhante a este trabalho, referente ao teor de umidade inicial do substrato sobre a atividade de amilase, foi observada por Delabona et al. (2013), que verificaram um aumento na produção de endoglucanase por *A. niger* e *A. fumigatus* cultivados em farelo de trigo sob FES, com a diminuição do teor de umidade de 70 para 50%. Uma redução na produção da enzima com maior teor de umidade inicial pode ser associada a uma redução da porosidade do substrato e limitação na transferência de oxigênio.

5.5 Efeito do tempo de cultivo em diferentes temperaturas

A influência da temperatura na produção de amilase está relacionada com o crescimento do organismo. Entre os fungos, a maior parte dos estudos de produção de amilase foi desenvolvida com fungos mesófilos dentro do intervalo de temperatura de 25-37 °C (GUPTA et al., 2003). A temperatura do leito é uma das variáveis mais importantes na FES, uma vez que o seu controle é um desafio encontrado em larga escala. Muitos processos envolvem fungos filamentosos, que podem sofrer danos a partir de uma mistura contínua, de modo que são preferidos biorreatores em que o leito se mantém estático. Neste caso, é difícil

manter a temperatura do leite no valor ótimo para o crescimento sem que o micro-organismo sofra variações de temperatura durante o processo (DALSETER, 2005). Por isso se faz indispensável o estudo cinético capaz de descrever os efeitos das variações de temperatura no crescimento e principalmente na expressão de amilases pelo fungo.

A figura 10 mostra as médias obtidas nos experimentos realizados em diferentes temperaturas e tempo de cultivo. A maior produção amilolítica observada foi $602,9 \pm 6,6$ U/g no cultivo à 30 °C por 120 h e o menor valor foi $216,3 \pm 1,2$ U/g à 25 °C e 72 h de incubação. Gupta et al. (2008) também obtiveram a máxima produção e α -amilase por *Aspergillus niger* à 30 °C e 120 h de incubação. Em concordância, Saleem e Ebrahim (2013) alcançaram a produção máxima de amilase por *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* a 30 °C.

Na temperatura de 25 °C observa-se um aumento gradual na atividade, indicando que seria necessário um tempo maior de fermentação para o acréscimo da produção, uma vez que esta temperatura não favoreceu o crescimento celular nem a produção enzimática. Os resultados obtidos em 28 e 30°C apresentam um perfil de produção semelhante, no qual há um aumento gradual na atividade enzimática de 72 a 120 h de cultivo, estabilizando-se após este período. Assim, considerando a maior atividade obtida e o menor tempo de fermentação, que representa economia de energia empregada ao bioprocessamento, 120 h se mostrou o tempo mais eficaz na produção da enzima. Como a produção em 120 h foi estatisticamente superior à 30 °C do que 28 °C ($p < 0,05$), esta condição foi adotada como a melhor para a produção de amilase por *R. oligosporus* em fermentação em estado sólido. Alva et al. (2007) relataram a maior produção de amilase por *Aspergillus* sp. JGI 12 à 30°C.

Nos ensaios realizados à 35 °C não houve diferença entre as médias obtidas ao longo do tempo. Isso ocorre por características próprias do meio sólido como a sua baixa condutividade térmica que limita a dissipação de calor e leva ao aumento da temperatura no sistema de FES ao longo do tempo (DALSETER, 2005).

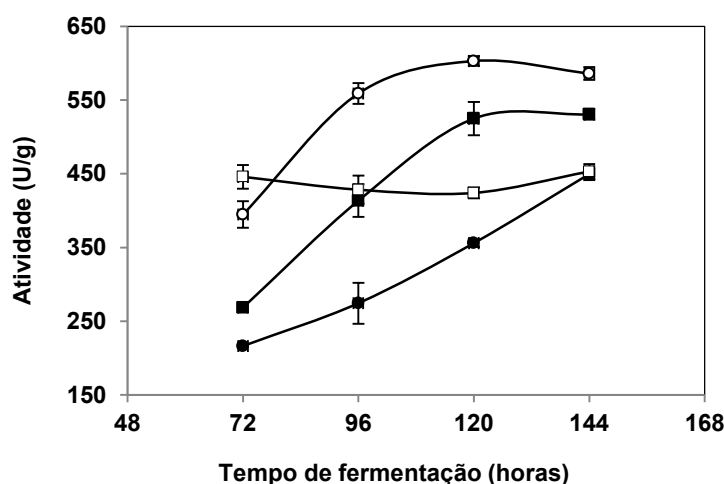


Figura 10. Produção amilolítica por *Rhizopus oligosporus* em diferentes temperaturas de incubação: (-●-) 25 °C, (-■-) 28 °C, (-○-) 30 °C, (-□-) 35 °C.

Hashemi et al. (2010) utilizaram farelo de trigo como substrato da FES de *Bacillus* e obtiveram uma atividade α -amilolítica de 197,27 U/g com incubação à 64 °C. Peixoto-Nogueira et al. (2008) cultivaram *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* à 45 °C por 72 h em FES, tendo farelo de trigo e grãos de milho como substrato, e alcançaram um máximo de 49,3 U totais.

No presente trabalho foram atingidos valores de produção de amilase fúngica superiores à 600 U/g de substrato seco, o que demonstra a viabilidade desta tecnologia para ser aplicada no desenvolvimento de um bioprocesso econômico com a utilização do farelo de trigo como substrato e do fungo *Rhizopus oligosporus*, que recebe a denominação GRAS (MISZKIEWICZ et al., 2004) assegurando sua utilização na alimentação.

5.6 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação de proteínas por sais é uma das técnicas mais empregadas para a concentração e purificação parcial de enzimas por não necessitar de equipamentos sofisticados como ultrafiltração ou métodos mais sensíveis, como filtração em gel. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos com a precipitação fracionada do extrato enzimático utilizando sulfato de amônio na concentração de 30-80%. Os valores se referem aos sobrenadantes com 30 e 80% e aos precipitados com 30 e 80%, estes com 24 e 48 h de diálise. Foram realizados dois ensaios com 100 mL de extrato bruto inicial, com atividade amilolítica de 57,27 U/mL e atividade específica de 119,24 U/mg de proteína.

Observa-se que na precipitação com 30% de sulfato de amônio o sobrenadante apresentou um fator de purificação de 1,27, com perda de 0,86% do total de amilases no precipitado. Na precipitação a 80% o precipitado apresentou um fator de purificação de 1,44 após 24h de diálise com rendimento de 53,11%. Apesar da baixa recuperação da amilase total, a atividade enzimática aumentou 9,7 vezes do extrato bruto, com 57,27 U/mL, para o precipitado, com 554,5 U/mL, demonstrando eficiência do processo para concentração enzimática.

As perdas significativas que ocorreram de 24-48 h de diálise sugerem a hidrólise da membrana, verificada pela sua fragilidade e ruptura. Isso indica a presença de enzimas que tenham a capacidade de atuar sobre a celulose da membrana mesmo em baixas temperaturas. Deste modo, foram realizados ensaios para determinação de CMCase no precipitado. Após 10 min de reação a 50 °C verificou-se que 1 mL do precipitado contém celulase suficiente para liberar 25,12 µmol de açúcar redutor, ou seja 2,51 U/mL. Como a diálise ocorreu sob refrigeração, foram realizados ensaios de CMCase nos quais a mistura de reação (precipitado e substrato) foi mantida em refrigerador por 24 h, seguido da determinação de açúcares redutores por DNS. Mesmo em condições de baixa temperatura ocorreu a liberação de 29,45 µmol de açúcar redutor por mililitro do precipitado em 24 h de contato. Isso demonstra que além de amilase o fungo *R. oligosporus* também produz pequenas quantidades de celulase, a qual apresenta uma atividade significativa após o processo de precipitação e consequente concentração enzimática.

Tabela 12. Concentração do extrato enzimático por precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Amostra	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Total (U)	Rendimento %	Purificação
Extrato bruto	57,27	0,48	119,24	5726,9	100	1,00
Sobrenadante 30%	30,3 ± 8,6	0,20 ± 0,1	151,8 ± 6,9	3186,0 ± 889,9	55,63 ± 15,5	1,27 ± 0,06
Precipitado 30%	8,8 ± 0,7	0,84 ± 0,1	10,6 ± 1,0	49,1 ± 10,6	0,86 ± 0,2	0,09 ± 0,01
Sobrenadante 80%	1,3 ± 0,1	0,02 ± 0,0	70,1 ± 11,7	139,8 ± 3,4	2,44 ± 0,1	0,59 ± 0,10
Precipitado 80 % *	554,5 ± 22,6	3,23 ± 0,1	171,5 ± 0,1	3041,6 ± 267,9	53,11 ± 4,7	1,44 ± 0,00
Precipitado 80% **	357,6 ± 21,4	2,33 ± 0,1	153,2 ± 6,1	1583,6 ± 763,7	27,65 ± 13,3	1,28 ± 0,05

Tempo de diálise: * 24h; ** 48 h.

De acordo com os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, apesar do sucesso alcançado para a concentração do extrato enzimático, a técnica de precipitação com sulfato de amônio e diálise não se mostrou promissora, uma vez que foram constatadas perdas efetivas

de rendimento (47%) e um aumento do fator de purificação de apenas 44%. Assim sendo, a aplicação da amilase para hidrólise dos substratos amiláceos e produção de glicose foi realizada com o extrato bruto, assegurando economia de tempo e investimentos ao processo, pela redução das etapas de *downstream*.

Estudos futuros visando a purificação e concentração enzimática podem ser realizados utilizando outras técnicas e aprimorando a técnica utilizada no presente trabalho. No entanto, as etapas sucessivas deste estudo empregaram o extrato bruto que, ainda assim, apresenta posição de destaque em comparação com a literatura quanto à concentração enzimática, segurança biológica (GRAS) e características bioquímicas posteriormente detalhadas.

5.7 Caracterização bioquímica do extrato enzimático

5.7.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica

A melhor temperatura para a amilase do extrato bruto e concentrado foi de 60 a 65 °C (Figura 11). Estes resultados concordam com o trabalho de Escaramboni (2011) realizado com o mesmo micro-organismo, porém em fermentação submersa.

Quando a estabilidade térmica da enzima foi analisada durante 30 min os resultados mostraram elevada estabilidade até 55 °C, mantendo mais de 86% de atividade a esta temperatura. A incubação em temperaturas mais altas demonstrou a ocorrência de desnaturação progressiva da amilase, de modo que a 65 °C cerca de 51 e 56% da enzima se mantém ativa para o extrato bruto e concentrado, respectivamente, reduzindo a zero até 80 °C.

Uma vez que a atividade diminui mais de 40% quando a enzima é submetida por 30 min às temperaturas apontadas como ótimas (60 e 65 °C), é pertinente considerar sua utilização a 55°C, devido a manutenção de 95%, para extrato bruto, e 87%, para concentrado, da capacidade de hidrólise após 30 min de incubação, com 88% de eficiência catalítica.

Dados da literatura mostram que mesmo os micro-organismos mesófilos, como fungos que crescem entre 28 e 32 °C, são capazes de produzir enzimas que atuam em temperaturas até 30 °C acima da temperatura máxima de crescimento, conforme descrito por Gomes et al. (2007). Como a amilase do presente estudo, várias das outras amilases conhecidas são também ativas na faixa de 50-65 °C (ANTO et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; WANG et al., 2011).

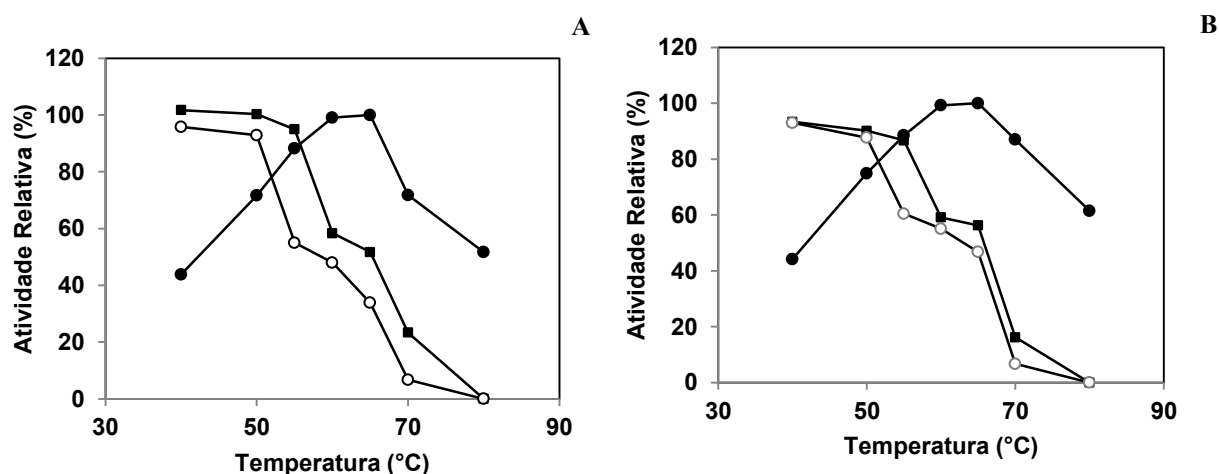


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da amilase no extrato bruto (A) e concentrado (B) na ausência de substrato: (-●-) temperatura na atividade enzimática, (-■-) estabilidade térmica após 30 min de incubação e (-○-) estabilidade térmica após 1 h de incubação.

A análise da estabilidade térmica durante 1 h de incubação demonstrou a manutenção de mais de 87% de estabilidade enzimática, para ambos os extratos, até 50 °C, reduzindo gradativamente com o aumento da temperatura. Nota-se que a atividade relativa para 30 min e 1 h mantem o mesmo perfil, sendo que, quanto maior o tempo de incubação, menor a estabilidade nas diferentes temperaturas.

A pesquisa demonstrou que em bioprocessos com duração de uma hora de reação enzimática é possível utilizar uma temperatura de 50 °C com estabilidade de 93 e 88%, respectivamente para extrato bruto e concentrado, mantendo mais de 70% de eficiência catalítica.

5.7.2 Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade

Verifica-se que a amilase produzida por *Rhizopus oligosporus* apresenta maior atividade em uma faixa de pH entre 4,0 e 5,0. Em pH 3,0 e 6,0 a enzima manteve atividade relativa superior a 65 %, e 24% para pH 7 (Figura 12). Enzimas que têm a capacidade de atuação em uma ampla faixa de pH são vantajosas para a indústria, uma vez que é necessário um menor ajuste do pH entre os processos sequenciais de liquefação e sacarificação (MICHELIN, 2005).

O extrato enzimático foi estável em uma ampla faixa de pH, mantendo 94 e 97% de atividade relativa após 1 hora de contato em pH 4,0 e 5,0, respectivamente, e mais de 80% em pH 3,0, 6,0 e 7,0. Assim, é possível constatar que a amilase produzida pelo micro-organismo estudado possui característica ácido-alcalino-tolerante, permitindo flexibilidade aos bioprocessos industriais.

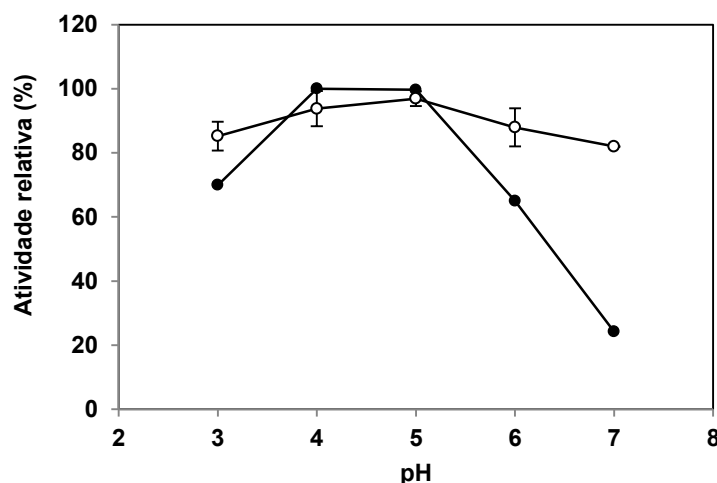


Figura 12. Efeito do pH na atividade e estabilidade da amilase de *Rhizopus oligosporus* no extrato bruto: (-●-) pH na atividade enzimática, (-○-) estabilidade enzimática após 1 h de incubação em tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7.

Guandalini (2007), obteve valores semelhantes, com melhor pH de 5,0 a 5,5 para α -amilase e amiloglicosidase do fungo *Metharhizium anisopliae*. Isso demonstra que as amilases fúngicas atuam melhor em pH ácido a neutro (GONÇALVES, 2006). Jin et al. (1999) obtiveram glicoamilase, também produzida por *R. oligosporus*, apresentando melhor atuação em pHs entre 4,0 e 5,0, e estabilidade na faixa de pH 3,0 e 9,0 por 60 minutos a 30 °C. Freitas et al. (2014) confirmaram que a amilase de *R. oligosporus* em fermentação submersa exibiu maior atividade enzimática em pH 4,0 e 5,0

Silva (2009) também obteve resultados semelhantes quanto ao efeito do pH na atividade amilolítica da enzima produzida por *Aspergillus niveus* em meio com casca de mandioca. O pH ótimo foi determinado na faixa de 4,0 a 5,0, permanecendo estável em pH de 4,0 a 7,0 após 24 h de incubação. Como o extrato amilolítico de *R. oligosporus* obtido neste trabalho apresentou uma faixa de pH ideal de atuação, bem como estabilidade superior a 80% em todos os pHs testados, a utilização desta enzima é apropriada, já que possibilita adequação aos procedimentos de hidrólise.

5.8 Hidrólise enzimática de diferentes substratos amiláceos e produção de xarope de glicose

Verifica-se que o perfil de hidrólise foi semelhante para todos os substratos testados, aumentado gradativamente a liberação de açúcares redutores de 30 minutos até 6 h, tendendo a se estabilizar após este período (Figura 13). Com a hidrólise do amido foi possível obter total conversão em açúcar redutor em 6 h de reação. Freitas et al. (2014) justificaram a aplicação de amilase de *R. oligosporus* para a produção de glicose à partir de amido pelo rendimento elevado de glicose e a qualidade do produto, sem a presença de outros açúcares, uma vez que alcançaram 96% de conversão do amido solúvel em glicose.

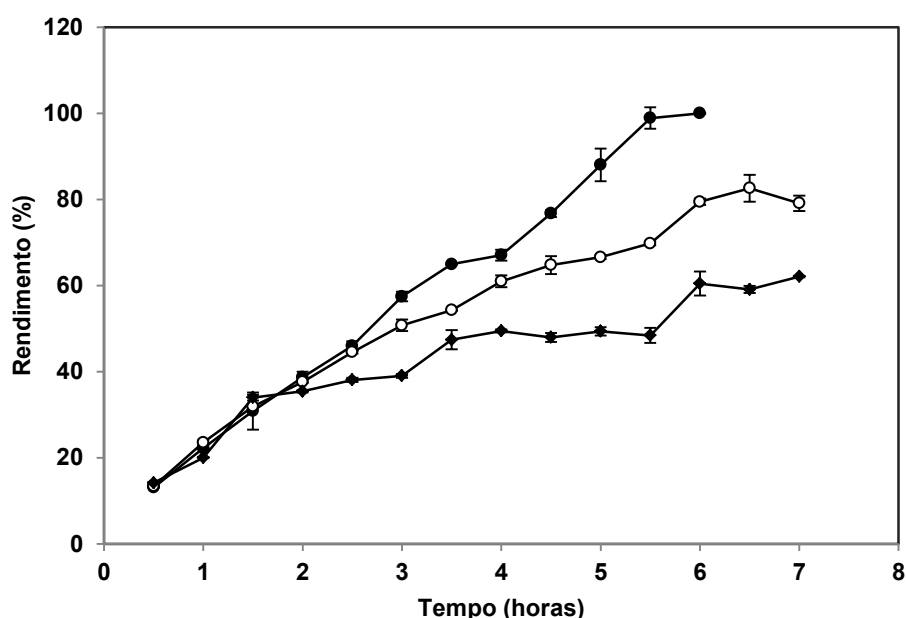


Figura 13. Perfil de hidrólise do amido solúvel (-●-), farinha de trigo tipo II (-○-) e farelo de trigo (-◆-) utilizando uma solução contendo 5% de carboidrato e extrato enzimático bruto na proporção de 1,2 U/mL da solução de reação, à 55 °C. Rendimento: conversão de carboidrato em açúcar redutor, expresso em porcentagem.

Quanto à hidrólise da farinha de trigo tipo II e farelo de trigo, a solução foi preparada considerando o teor de carboidratos totais. Para a farinha de trigo tipo II foi obtido um rendimento de 83% em 6,5 h e para o farelo de trigo, 62% em 7 h. O menor fator de conversão, em comparação com o amido, pode ser justificado pela presença de outros

componentes, como proteínas, gorduras e fibras na composição destes substratos, dificultando a ação enzimática sobre a porção alvo da amilase (Tabela 13).

Correlacionando o fator de conversão e a porcentagem de fibras, constata-se maior liberação de açúcares redutores quanto menor a proporção de fibras do substrato. Ficou evidente no item 5.6 deste trabalho que o extrato enzimático produzido por *Rhizopus oligosporus* pode apresentar celulase, verificado pelos ensaios para determinação de CMC_{case}, porém em quantidades insuficientes para hidrolisar a parte fibrosa do substrato.

Tabela 13. Composição geral dos substratos utilizados para hidrólise enzimática.

Composto	Amido solúvel (%)	Farinha de trigo tipo II (%)	Farelo de trigo (%)
Carboidratos	100,0	76,6	56,0
Proteínas	-	10,3	14,0
Gorduras totais	-	1,0	3,0
Fibras	-	2,6	11,0

Fonte: Amido solúvel (SIGMA-ALDRICH, 2014); Farinha de trigo tipo II (MOINHO NACIONAL, 2014); Farelo de trigo (MOINHO NACIONAL, 2014; PRÜCKLER et al., 2014).

Ghosh e Ray (2010) realizaram a sacarificação de diferentes tipos de amido pela isoamilase de *Rhizopus oryzae* PRT MTCC 9642. Foi obtido um máximo de 43% de sacarificação após 60 minutos de incubação, utilizando 1% de amido de batata (Merck). Liu e Xu (2008) testaram a capacidade de digestão de amido cru por α -amilase a partir de *Bacillus sp.* YX-1. Os autores constataram que a taxa de degradação de grânulos de milho, trigo e batata preparados com concentração de 1% foram iguais a 57,5%, 53%, 45,1% em 8 horas e de 63,2%, 56,4%, 48,6% em 12 horas, respectivamente.

A tabela 14 apresenta a comparação dos rendimentos de hidrólise considerando a liberação de açúcar redutor (AR) pelo teor de carboidratos do substrato ou em massa do substrato utilizada. Verifica-se que há um rendimento menor quanto maior a proporção de outros componentes, como fibras e proteína, naturalmente encontrados nos resíduos. No entanto, de acordo com os resultados apresentados é possível obter valores expressivos de açúcares redutores, sendo: 1 Kg de AR/ Kg de amido, 0,63 Kg de AR/Kg de farinha de trigo tipo II e 0,36 Kg de AR/ Kg de farelo de trigo, demonstrando a eficiência do bioprocessamento empregado.

Tabela 14. Rendimento da produção de glicose durante a hidrólise dos substratos amiláceos considerando o teor de açúcar redutor liberado pela massa do substrato utilizado

Tempo (h)	Rendimento (% massa)		
	Amido	FT II	FT
0,5	13,08	10,28	8,31
1	22,18	18,11	11,75
1,5	30,83	24,53	19,94
2	38,70	28,93	20,81
2,5	45,98	34,25	22,34
3	57,45	39,04	22,91
3,5	64,92	41,73	27,82
4	67,06	46,89	29,02
4,5	76,71	49,82	28,16
5	88,02	51,22	28,97
5,5	98,87	53,66	28,42
6	100,00	61,10	35,49
6,5	-	63,53	34,68
7	-	60,85	36,44

FT II: Farinha de trigo tipo II; FT: Farelo de trigo.

O xarope produzido foi concentrado por evaporação até alcançar 20% de açúcar redutor. Considerando os relatos da literatura, se constata a superioridade da tecnologia desenvolvida no presente trabalho para a produção de amilase e aplicação para a conversão do amido em glicose. Os resultados indicaram que a amilase produzida é forte candidata para aplicações industriais.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvido um eficiente bioprocesso de cultivo em estado sólido utilizando-se farelo de trigo e o fungo *Rhizopus oligosporus*, tanto para a produção de amilases, como para a utilização destas enzimas na obtenção de xarope de glicose. Com a otimização das variáveis nutricionais e umidade, através da técnica de DCCR, bem como o aperfeiçoamento dos parâmetros tempo e temperatura de cultivo, foi possível aumentar expressivamente a produção enzimática de 180 U/g para mais de 600 U/g de substrato, resultando em grande economia na utilização de insumos nutricionais, quando comparados aos trabalhos da literatura. O extrato enzimático obtido se mostrou muito eficiente na produção de xarope de glicose a partir de amido ou resíduos amiláceos. Através da determinação dos parâmetros de pH e temperatura ótimos de atuação desse extrato foi possível manter mais 80% da atividade original nas faixas de maior estabilidade. Com isso, foi possível obter uma hidrólise total do amido puro em 6 horas, 83% dos carboidratos presentes na farinha de trigo tipo II em 6,5 h e 62% dos carboidratos do farelo de trigo em 7 h. Portanto, os resultados obtidos apontam para a viabilidade industrial e aplicabilidade da tecnologia aqui apresentada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B. S.; BHAVYA D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B. S.; VARALAKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 576-581, 2007.

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

AQUINO, A. C. M. M., JORGE, J. A., TERENCEZI, H. F., POLIZELI, M. L. T. M. Thermostable Glucose-Tolerant Glucoamylase Produced by the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiologica**, v. 46, p. 11-16, 2001.

APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 222-231, 2014.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 187-192, 2002.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.

BÖHMER, U.; FRÖMMEL, S.; BLEY T.; MÜLLER, M.; FRANKENFELD, K.; MIETHE, P. Solid-state fermentation of lignocellulosic materials for the production of enzymes by the white-rot fungus *Trametes hirsuta* in a modular bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, v.11, p. 395-401, 2011.

BORGIO, J. F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 380-386, 2008.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2010.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

CHEN, H. **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer, 2013.

CODA, R.; KÄRKI, I.; NORDLUND, E.; HEINIÖ, R.-L.; POUTANEN, K.; KATINA, K. Influence of particle size on bioprocess induced changes on technological functionality of wheat bran. **Food Microbiology**, v. 37, p. 69-77, 2014.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. 2005. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v.37, p. 243-250, 2012.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

DJEKRIF-DAKHMUCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 190-197, 2006.

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.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation Techniques. In: Ed. Deutscher, M. P. **Guide to protein purification**. San Diego: Academic Press, 1990.

ESCARAMBONI, B. **Produção de amilases fúngicas: comparação entre *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* em substratos de trigo e mandioca**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis/SP, 2011, 22p.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; REZENDE, J.L.; GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 344-352, 2008.

FREITAS, A. C.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; OLIVANETO, P. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. **Chemical Papers**, v. 68, p. 442-450, 2014.

FREITAS, A. C. **Desenvolvimento de Novas Tecnologias para Produção de Xarope de Glicose a partir de Amido**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro/SP, 2012.

FURLONG, E. B.; CACCIAMANI, J. L. M.; BUFFON, J. G. Fermentação fúngica: enriquecimento proteico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B1 e ocratoxina A. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 233-239, 2007.

GHOSH, B.; RAY, R. R. Saccharification of raw native starches by extracellular isoamylase of *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology**, v. 9, p. 224-228, 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p 136-145, 2007.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP, 2007.

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

GUPTA, A.; GUPTA, V. K.; MODI, D.R.; YADAVA, L. P. Production and Characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology**, v 7, p. 551-556, 2008.

HASHEMI, M.; RAZAVI, S.H.; SHOJAOSADATI, S.A.; MOUSAVI, S.M.; KHAJEH, K.; SAFARI, M. Development of a SSF process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 333-337, 2010.

HUANG, C.; CHEN, X-F.; XIONG, L.; CHEN, X-D.; MA, L-L.; CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 129-139, 2013.

IMMERZEEL, P.; FALCK, P.; GALBE, M.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E. N.; STÅLBRAND, H. Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 321-327, 2014.

JIN, B.; HANS, J. VAN LEEUWEN; PATEL, B.; DOELLE, H. W.; YU, Q. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, 34, p. 59–65, 1999.

JIN, B.; YAN, X.Q.; YU, Q.; VAN LEEUWEN, J.H. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p.179-189, 2002.

JOO, H-S.; CHANG, C-S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1263–1270, 2005.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5602-5609, 2008.

KANDRA, L. α -amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, v. 666-667, p. 487- 498, 2003.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Production of amylase and chlamydozoospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124-128, 2012.

LEONEL, M. O farelo, subproduto da extração da fécula de mandioca. In: Cereda, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

LIANG, H.; GAO, D-W.; ZENG, Y-G. Effects of phosphorus concentration on the growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v.107, p. 535-538, 2012.

LIU, X. D.; XU, Y. A novel raw starch digesting α - amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4315-4320, 2008.

MARYAN, A. S.; MONTAZER, M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 320-326, 2013.

MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da α -amilase pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, New York, v.31, p. 426-428, 1959.

MISZKIEWICZ, H.; BIZUKOJC, M.; ROZWANDOWICZ, A.; BIELECKI, S. Physiological Properties and Enzymatic Activities of *Rhizopus oligosporus* in Solid State Fermentations. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.7, 2004. Disponível em <<http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue1/biotechnology/art-03.html>>. Acesso em 13 de dezembro de 2013.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217–1224, 2006.

MOINHO NACIONAL. Disponível em: <<http://www.moinhonacional.com.br/produtos.php>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2014.

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

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; MOO YOUNG, M. Fungal glucoamylases, **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.

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

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**, 1^a ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760 p., 2005.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; SANDRIM, V. C.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 329-334, 2008.

PINTO, M. P. **Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica), Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization, **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 211-221, 2014.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 235-244, 2004

RAVINDAR, D. J.; ELANGO VAN, N. Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. **Journal oh Pharmacy Research**, v. 6, p. 426-430, 2013

RAY, R.C. Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. **Journal of Environmental Biology**, v. 25, p. 489-495, 2004.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K.H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, 2013.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 201-211, 2013.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2014.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. α -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, p. 173-184, 2006.

SOCCOL, C. R.; ILOKI, I.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. Comparative production of α -amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. **Journal of Food Science and Technology**, 31, p. 320-323, 1994.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amilase in industry – A review. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2005.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

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

VATTEM, D. A.; LIN, Y.-T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1939-1946, 2004.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 745–750, 2011.