

MICHELE RIGON SPIER

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS FÚNGICAS
 α -AMILASE e AMILOGLUCOSIDASE POR FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadoras:

Prof^a Dr^a Adenise L. Woiciechowski

Prof^a Dr^a Luciana P. S. Vandenberghe

CURITIBA

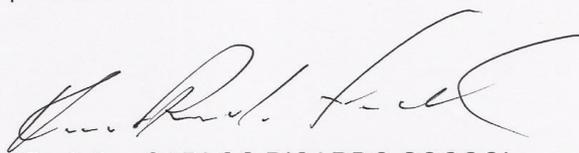
2005

MICHELE RIGON SPIER

PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS FÚNGICAS (α -
AMILASE E AMILOGUCOSIDASE) ATRAVÉS DA
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

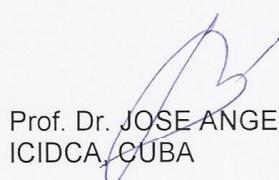
Orientador:



Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr.^a GISELLA MARIA ZANIN
Centro de Tecnologia, UEM



Prof. Dr. JOSE ANGEL RODRIGUES-LEON
ICIDCA, CUBA

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2005

Ao meu querido filho Miguel Arcádio Rigon.
Foi por você que cheguei até aqui, e é por você
que seguirei em frente.

A Deus, por acompanhar o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador Dr. Carlos Ricardo Soccol, pelo voto de confiança, incentivo e oportunidade de trabalhar na área de bioprocessos e biotecnologia industrial, agradeço também as discussões e contribuições científicas e o auxílio na correção dos trabalhos e deste manuscrito.

Ao meu querido e ilustre Eduardo Henrique Zamboni, agradeço seu amor, carinho, compreensão e sabedoria. As trocas de idéias, discussões e seus conselhos contribuíram muito para o meu crescimento nesse período.

Aos meus pais Wilson Elvânio Spier e Genoveva Aparecida Rigon Spier gostaria de agradecer os incentivos e conselhos constantes além de todos os esforços na vida em construir a pessoa que sou.

Aos meus queridos irmãos, não poderia citá-los em ordem de importância, pois cada um contribuiu de formas diferentes, mas igualmente importantes, por isto decidi fazê-lo em ordem alfabética. Muito obrigada Duda (Eduardo), Gabi (Gabriele) e Gi (Giovana), pelo respeito, paciência e ajuda. E ao meu cunhado Erik não poderia deixar de agradecer seu respeito e carinho transmitido nessa minha jornada.

À professora Dr^a. Adenise Lorenci Woiciechowski agradeço toda a atenção, disposição de ensinar e transmitir seu conhecimento sem esforços.

À professora Dr^a Luciana P. S. Vandenberghe, Prof. Dr^a. Adriane Medeiros e Prof. Dr. Júlio Carvalho pelo auxílio técnico e científico prestado durante o andamento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, representado pelos professores e funcionários agradeço todo o apoio e oportunidade para o bom andamento do curso. Em especial aos professores Dr. Renato João Sossela de Freitas, Dra. Nina Waszczynskyj, Dra. Maria Lúcia Masson, Prof. Paulo Sérgio Growski Fontoura e aos funcionários Paulo e Luciana.

À professora Dr^a. Márcia Rapacci (PUC-PR) e ao M^e. Guilherme de Almeida Souza Tedrus (SENAI-SP) agradeço os incentivos, o apoio e as orientações que durante a graduação e a iniciação científica contribuíram e me ensinaram a admirar a pesquisa científica.

À professora M^e. Elaine Berges da Silva (PUC-PR) e ao Prof. Dr. Rui Sérgio Santos Ferreira da Silva (UEL), pelas orientações estatísticas.

À estagiária Maura Sugai, pelo auxílio prestado, agradeço sua dedicação e interesse. Aos colegas Mitiyo, Débora, Flávera, Herta, Sônia, Elizete, Cristina, Bruno, André, Paulo, André, Ricardo, Gisele, Celso, Cristine, Rhadjis, Jayme, Letícia, Prof. Júlio e Adriane, Rômulo pelas contribuições técnicas e pelo constante apoio durante a realização do presente projeto de Mestrado.

Aos meus colegas de curso Ineuza, Thamy, Simone, Marcelo, Karin, Gisele, Bianca, Rodrigo, Marvina, Leonir, pela troca de experiências, apoio e companheirismo durante esta trajetória.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado.

*“O temor do Senhor é o princípio do saber,
mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino”.*

Provérbios 1:7

*Pouco conhecimento faz que as criaturas 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 a baixam para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo geral	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 ENZIMAS	5
2.1.1 DEFINIÇÃO DE ENZIMA	5
2.1.2 DENOMINAÇÃO DAS ENZIMAS	5
2.1.3 CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS	6
2.1.4 ENZIMAS AMIOLÍTICAS	7
2.1.4.1 α -Amilase	11
2.1.4.2 β -Amilase	13
2.1.4.3 Amiloglucosidase (Glucoamilase)	13
2.1.5 Produção de enzimas microbianas	16
2.1.6 Atividade enzimática	18
2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)	18
2.2.1 Definição e características gerais da FES	18
2.2.2 Tipos de fermentação no estado sólido	19
2.2.3 Aplicações da fermentação no estado sólido	22
2.2.4 Vantagens e Desvantagens da FES	23
2.2.5 Fermentadores	24
2.2.5.1 Fermentador do tipo bandeja	24
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS	25
2.3.1 Fonte de carbono	25
2.3.2 Fonte de nitrogênio	25
2.3.3 Fosfatos	26
2.3.4 Outros íons	26
2.3.5 pH	26
2.3.6 Temperatura	27
2.3.7 Agitação	27

2.4	MICROORGANISMOS EMPREGADOS NA FES	27
2.4.1	Fungos Filamentosos	28
2.4.1.1	Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	29
2.4.1.2	Fungos do gênero <i>Rhizopus</i>	31
2.5	MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS NA FES	32
2.5.1	Fécula de mandioca	34
2.5.2	Bagaço de cana-de-açúcar	38
2.6	PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS	41
2.6.1	Precipitação de enzimas	41
2.7	APLICAÇÕES DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS	43
2.7.1	Indústria de Detergentes e Produtos de Limpeza	43
2.7.2	Indústria Têxtil	44
2.7.3	Indústria de Papel e Celulose	44
2.7.4	Indústria de Alimentos	45
2.7.4.1	Liquefação e Sacarificação do Amido	45
2.7.4.2	Indústria de Panificação	46
2.7.4.3	Indústria de Cerveja	47
2.7.4.4	Alimentação Infantil	48
2.7.4.5	Alimentação Animal	48
2.7.4.6	Legislação sobre o uso de enzimas em produtos alimentícios	49
2.8	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	50
2.8.1	Planejamento Fatorial	50
2.8.2	Planejamento Fatorial Fracionário	50
2.8.3	Análise por Metodologia de Superfície de Resposta.....	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FES	54
3.1.1	Microrganismos	54
3.1.1.1	Relação das cepas estudadas	54
3.1.1.2	Conservação das cepas	55
3.1.1.3	Inoculação	55
3.1.1.4	Preparo da solução de esporos de <i>Aspergillus</i>	56
3.1.1.5	Preparo da solução de esporos de <i>Rhizopus</i>	56
3.1.1.6	Contagem de esporos de <i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i>	56
3.1.1.7	Seleção das cepas de <i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i>	57
3.1.2	COMPOSIÇÃO DA FERMENTAÇÃO FES	58
3.1.2.1	Substrato	58
3.1.2.2	Suporte	59
3.1.2.2.1	Pré-tratamento do suporte (bagaço de cana-de-açúcar)	59
3.1.2.3	Nutrientes das fermentações	60

3.1.2.3.1 Solução salina	60
3.1.2.3.2 Fonte de nitrogênio e cálcio.....	60
3.1.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO E DO SUPORTE	61
3.1.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)	62
3.1.4.1 Fermentação em Frascos Erlenmeyer	62
3.1.4.2 Fermentação em Bandejas	63
3.1.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)	64
3.1.6 ANÁLISE DO SUBSTRATO FERMENTADO	64
3.1.6.1 Umidade	66
3.1.6.2 pH	66
3.1.6.3 Dosagem de açúcares redutores	66
3.1.6.3.1 Preparo do reativo DNS	66
3.1.6.4 Dosagem de amido	67
3.1.6.5 Dosagem de atividade amilásica	67
3.1.6.5.1 α -Amilase	67
3.1.6.5.2 Amiloglicosidase	68
3.1.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS	69
3.1.7.1 Influência da proporção entre substrato e suporte	70
3.1.7.2 Influência da temperatura e da umidade inicial	70
3.1.7.3 Influência da concentração de CaCO_3 , KNO_3 e solução salina	71
3.1.7.4 Influência da suplementação com CaCO_3 e fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico	71
3.1.7.5 Influência da taxa de inoculação e da concentração de substrato	72
3.1.7.6 Influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação	73
3.1.7.7 Influência do pH inicial de fermentação	73
3.1.7.8 Influência da agitação no processo de extração das enzimas	74
3.1.7.9 Influência dos parâmetros de dosagem enzimática	75
3.1.8 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)	75
3.1.8.1 Influência da concentração de fécula de mandioca	75
3.1.9 ESTUDO COMPARATIVO DA FES CONDUZIDA EM FRASCOS E EM BANDEJAS	76
3.2 PRECIPITAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS	76
3.3 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE	77
3.3.1 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática da FES	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 Caracterização físico-química do substrato e suporte	78
4.2 Seleção das cepas de <i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i>	79
4.3 Seleção da cepa padrão através da FES em frascos	84
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES	88
4.4.1 Influência da proporção entre substrato e suporte	88
4.4.2 Influência da temperatura de fermentação e da umidade inicial	89

4.4.3	Influência da concentração de CaCO ₃ , KNO ₃ e solução salina	96
4.4.3.1	Influência do CaCO ₃ e KNO ₃ na produção da α -amilase	97
4.4.3.2	Influência do KNO ₃ e solução salina na produção da α -amilase	98
4.4.3.3	Influência do CaCO ₃ e KNO ₃ na produção da amiloglucosidase	100
4.4.3.4	Influência do KNO ₃ e solução salina na produção da amiloglucosidase	102
4.4.4	Influência da suplementação da FES com cálcio e fontes de nitrogênio (uréia e KNO ₃)	105
4.4.5	Influência da taxa de inoculação e da concentração de substrato	107
4.4.6	Influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação	113
4.4.7	Influência da taxa de inoculação	118
4.4.8	Influência do pH inicial da FES	119
4.4.9	Influência da agitação, tempo e temperatura no processo de extração das enzimas produzidas	122
4.5	Estudo da influência dos parâmetros de dosagem da atividade enzimática	124
4.5.1	Influência da temperatura e do pH de incubação das enzimas	124
4.6	Influência da concentração de substrato na produção das enzimas por fermentação submersa (FSm)	128
4.7	Estudo comparativo da FES conduzida em frascos e em bandejas	130
4.8	CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE	133
4.9	PRECIPITAÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE.....	136
5	ANÁLISE PRELIMINAR DOS CUSTOS DA PRODUÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FES	138
6	CONCLUSÕES	139
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	143
	REFERÊNCIAS	144
	ANEXO 1	155
	ANEXO 2	156
	ANEXO 3	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- PROPRIEDADES DE ALGUMAS AMILASES FÚNGICAS.....	15
TABELA 2	- COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	39
TABELA 3	- ENZIMAS PERMITIDAS PARA USO EM ALIMENTOS CONFORME O DECRETO Nº 3.029 DA ANVISA.....	49
TABELA 4	- CEPAS DE FUNGOS DO GÊNERO <i>RHIZOPUS</i>	54
TABELA 5	- CEPAS DE FUNGOS DO GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	55
TABELA 6	- COMPOSIÇÃO DO MEIO ÁGAR FÉCULA DE MANDIOCA UTILIZADO NO CRESCIMENTO RADIAL	58
TABELA 7	- MÉTODOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO E SUPORTE DAS FERMENTAÇÕES	61
TABELA 8	- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E UMIDADE INICIAL NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> LPB 28	70
TABELA 9	- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO ₃ , KNO ₃ E SOLUÇÃO SALINA	71
TABELA 10	- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO ₃ E DAS FONTES DE NITROGÊNIO (URÉIA E KNO ₃) NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO <i>A. NIGER</i> LPB 28	72
TABELA 11	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO <i>A. NIGER</i> LPB 28.....	72
TABELA 12	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO <i>A. NIGER</i> LPB 28.....	73
TABELA 13	- CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PRODUZIDAS POR FES PELO FUNGO <i>A. NIGER</i> LPB 28	74
TABELA 14	- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO PH DE INCUBAÇÃO DAS ENZIMAS PARA A DOSAGEM DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA POR <i>A. NIGER</i> LPB 28	75
TABELA 15	- ESTUDO COMPARATIVO DA FES CONDUZIDA EM FRASCOS E EM BANDEJAS NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PRODUZIDAS POR <i>A. NIGER</i> LPB 28	76
TABELA 16	- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FÉCULA DE MANDIOCA (MARCA YOKI)	78
TABELA 17	- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	79
TABELA 18	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS ATIVIDADES DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PRODUZIDAS POR CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i> E <i>ASPERGILLUS</i> PRÉ-SELECIONADAS POR FES	85

TABELA 19	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE OBTIDAS EM FES USANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE SUBSTRATO E SUPORTE	88
TABELA 20	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO NO DELINEAMENTO FATORIAL 3^2 COMPLETO.....	90
TABELA 21	- VARIAÇÃO DA UMIDADE DA FES EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	90
TABELA 22	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE	93
TABELA 23	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	95
TABELA 24	- RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTUDANDO A INFLUÊNCIA A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 , KNO_3 E SOLUÇÃO SALINA SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE	96
TABELA 25	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE	99
TABELA 26	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	104
TABELA 27	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS COM A SUPLEMENTAÇÃO DE CÁLCIO E FONTES DE NITROGÊNIO	105
TABELA 28	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO	108
TABELA 29	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE	110
TABELA 30	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	112
TABELA 31	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO	113
TABELA 32	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE	115
TABELA 33	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	117
TABELA 34	- RESULTADOS DA PRODUÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FES COM A. NIGER COM DIFERENTES TAXAS DE INOCULAÇÃO.....	118
TABELA 35	- RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE VARIANDO-SE O pH INICIAL DA FERMENTAÇÃO	120
TABELA 36	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS COM VARIAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO (EQUIPAMENTO, TEMPO E TEMPERATURA)	122
TABELA 37	- RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS VARIANDO-SE A TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E O pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO.....	124

TABELA 38	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE	126
TABELA 39	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	128
TABELA 40	- RESULTADOS DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA OBTIDA VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	129
TABELA 41	- RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DA FES EM FRASCOS, EM BANDEJAS PARA A PRODUÇÃO DAS ENZIMAS VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO (KNO_3) E O TEMPO DE FERMENTAÇÃO	131
TABELA 42	- VELOCIDADE E ATIVIDADE DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE EM REAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO.....	133
TABELA 43	- FOLHA DE BALANÇO DA PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	136
TABELA 44	- PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DA FES PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE	138

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	8
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE, β -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE	9
FIGURA 3	- REPRESENTAÇÃO DO ATAQUE INICIAL DA α -AMILASE SOBRE AS CADEIAS HELICOIDAIS α -1,4-GLUCAN DA AMIOSE E DA AMILOPECTINA	10
FIGURA 4	- REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE SOBRE AS FRAÇÕES DE AMIDO (AMILOSE E AMILOPECTINA)	11
FIGURA 5	- IMAGEM DE ESPORÂNGIOS DO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> OBTIDA ATRAVÉS DE MICROCULTIVO EM PDA VISTO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO	31
FIGURA 6	- IMAGEM DE ESPORÂNGIOS DO FUNGO <i>RHIZOPUS FORMOSA</i> OBTIDOS ATRAVÉS DE MICROCULTIVO EM PDA VISTO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO: (A) AUMENTO DE 20 X; (B) AUMENTO DE 10 X	32
FIGURA 7	- ETAPAS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE FÉCULA	37
FIGURA 8	- ATUAIS APLICAÇÕES DA FÉCULA DE MANDIOCA	38
FIGURA 9	- FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEPARAÇÃO DO BAGAÇO.....	40
FIGURA 10	- POSSIBILIDADES DE MODIFICAÇÃO DO AMIDO POR VIA ENZIMÁTICA ...	45
FIGURA 11	- TUBO CONTENDO MEIO PDA INCLINADO PARA REPICAGEM DAS CEPAS.....	55
FIGURA 12	- CÂMARA DE NEUBAUER (A) E QUADRÍCULOS (B) PARA A CONTAGEM DOS ESPOROS	57
FIGURA 13	- BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (SUPORTE) LAVADO E DESIDRATADO (A) E PRONTO PARA USO NA FES (MOÍDO COM GRANULOMETRIA PADRONIZADA (B)	60
FIGURA 14	- FES EM FRASCO ERLLENMEYER	62
FIGURA 15	- REPRESENTAÇÃO DA FES DE BAGAÇO DE CANA E FÉCULA DE MANDIOCA EM BANDEJAS COM ATMOSFERA SATURADA	63
FIGURA 16	- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DO SUBSTRATO FERMENTADO	65
FIGURA 17	- SEQUÊNCIA DOS PASSOS PARA A DOSAGEM DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	68
FIGURA 18	- CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i>	79
FIGURA 19	- CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>ASPERGILLUS</i> EM MEIO ÁGAR FÉCULA DE MANDIOCA	80
FIGURA 20	- CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i> (mm/h) – DIÂMETRO (mm) x TEMPO (h)	81
FIGURA 21	- CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>ASPERGILLUS</i> (mm/h) – DIÂMETRO (mm) x TEMPO (h)	82

FIGURA 22	- VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i> (mm/h).....83
FIGURA 23	- VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE <i>ASPERGILLUS</i>83
FIGURA 24	- ATIVIDADE DA α -AMILASE (U/g fécula de mandioca) DAS CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i> E <i>ASPERGILLUS</i> PRÉ-SELECIONADAS NO CRESCIMENTO RADIAL86
FIGURA 25	- ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE (U/g fécula de mandioca) DAS CEPAS DE <i>RHIZOPUS</i> E <i>ASPERGILLUS</i> PRÉ-SELECIONADAS NO CRESCIMENTO RADIAL87
FIGURA 26	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO (°C) E DA UMIDADE INICIAL (%) NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE.....92
FIGURA 27	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E UMIDADE PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE93
FIGURA 28	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO (°C) E UMIDADE (%) NA PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE94
FIGURA 29	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E UMIDADE PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE96
FIGURA 30	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DO CaCO ₃ E KNO ₃ NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE97
FIGURA 31	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DO KNO ₃ E DA SOLUÇÃO SALINA98
FIGURA 32	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO ₃ E KNO ₃ PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE100
FIGURA 33	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO ₃ e KNO ₃101
FIGURA 34	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE KNO ₃ E SOLUÇÃO SALINA NA PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE102
FIGURA 35	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO ₃ E KNO ₃ PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE.....103
FIGURA 36	- RESULTADOS OBTIDOS DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS POR FES MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DO CaCO ₃ E DAS FONTES DE NITROGÊNIO (KNO ₃ E URÉIA)106

FIGURA 37	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA109
FIGURA 38	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA E DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE110
FIGURA 39	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA111
FIGURA 40	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA E DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE113
FIGURA 41	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO114
FIGURA 42	- GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE115
FIGURA 43	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO116
FIGURA 44	- RESULTADOS OBTIDOS DE ATIVIDADE DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DO pH INICIAL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO121
FIGURA 45	- RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO123
FIGURA 46	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DO pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO125
FIGURA 47	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DO pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO127
FIGURA 48	- RESULTADOS DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FSm MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO130
FIGURA 49	- RESULTADOS DA FES EM FRASCOS E EM BANDEJAS PARA A PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE.....132
FIGURA 52	- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO CATALISADA PELA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE.....134

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- α -Amilase
AACC	- American Association of Cereal Chemists
AM	- Amiloglucosidase
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- American Type Culture Collection
DNS	- Ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$)
FES / SSF	- Fermentação no Estado Sólido / Solid State Fermentation
FSm / SmF	- Fermentação Submersa (Líquida) / Submerged Fermentation
LPB	- Laboratório de Processos Biotecnológicos
MUCL	- Micothèque de l'Université Catholique de Louvain
NRRL	- Northern Regional Research Laboratory
PDA	- Potato Dextrose Agar (Ágar Batata Dextrose)
PEAD	- Polietileno de Alta Densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

A.	- <i>Aspergillus</i>
Aa / Aw	- Atividade de água / Water Activity
Al ³⁺	- Alumínio
Ag ⁺	- Prata
α	- Alfa
β	- Beta
B.	- <i>Bacillus</i>
Ca ²⁺	- Cálcio
Cl ⁻	- Cloro
cm	- Centímetro
Cu ²⁺	- Cobre
CaCO ₃	- Carbonato de cálcio
g	- Gramas
g/l	- Gramas por litro
h	- Hora
Hg ²⁺	- Mercúrio
Kcal	- Quilocaloria
KDa	- QuiloDalton (unidade de massa molecular)
Kg	- Quilograma
Kg/hab/ano	- Quilograma por habitante por ano
K _M	- Constante de Michaelis-Menten
M	- Molar (Molaridade)
Mo ²⁺	- Molibdênio
Mn ²⁺	- Manganês
mg	- Miligrama
μ g	- Micrograma
μ m	- Micrômetro
μ mol	- Micromol
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mm	- Milímetros
NaCl	- Cloreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	- Sulfato de amônio
%	- Porcentagem
Pb ²⁺	- Chumbo
pH	- Potencial hidrogeniônico
MM	- Massa molecular
R.	- <i>Rhizopus</i>
rpm	- Rotação por minuto
[Substrato]	- Concentração de substrato
SO ₄ ²⁻	- Sulfato

sp.	- Espécie
spp.	- Espécies
ton	- Tonelada
U	- Unidade internacional de atividade enzimática
UR	- Umidade relativa
V	- Volume
$V_{\text{máx}}$	- Velocidade máxima de reação catalisada por uma enzima

RESUMO

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. Atualmente as amilases apresentam grande importância na biotecnologia com um amplo campo de aplicações. Na indústria de alimentos, as amilases são empregadas na liquefação do amido para a obtenção de glicose, em produtos de panificação, em cervejarias e bebidas fermentadas, em cereais para alimentação infantil como também são aplicadas na ração animal. Existem outras áreas para aplicação das amilases, tais como: indústria de papel e celulose, indústria têxtil, indústria de detergentes e produtos de limpeza, indústria química e farmacêutica, na produção de vitaminas e antibióticos. Embora enzimas de origem microbiana industriais sejam produzidas principalmente por fermentação submersa (FSm), a fermentação no estado sólido (FES) representa um método tradicional e preferido em alguns países, possuindo um grande potencial para a produção de enzimas amilolíticas, que exige baixa tecnologia e oferece maior economia. O objetivo do presente trabalho é apresentar alternativas para a produção das enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglucosidase por fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* através da fermentação no estado sólido. Um resíduo sólido da indústria açucareira, o bagaço de cana-de-açúcar, foi empregado como suporte inerte e a fécula de mandioca foi o substrato utilizado nas fermentações sólidas, suplementada com fonte de cálcio, fonte de nitrogênio e solução salina. Diferentes condições de processo foram otimizadas com o intuito de obter o máximo rendimento da produção de α -amilase e amiloglucosidase, através do emprego de delineamentos experimentais aplicados à Metodologia de Superfície de Resposta. A capacidade de produção das enzimas foi testada em 12 diferentes espécies de *Rhizopus* e em 8 diferentes cepas de *Aspergillus*. Uma linhagem de *Aspergillus niger* LPB 28 foi selecionada com maior capacidade de produção de α -amilase e amiloglucosidase. A taxa de inoculação estudada variou de 10^7 a 10^8 esporos/g MS. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer e em bandejas. O pH inicial estudado oscilou entre 4.0 e 8.0; a temperatura de incubação foi testada de 25° a 35°C; tempo de fermentação de 48, 54, 60 e 72 horas; umidade inicial da fermentação foi variada entre 80 e 90% e as proporções de substrato/suporte (fécula/bagaço) estudadas foram (1/1; 1,5/1; 2/1; 1/1,5; 1/2; 3/1; 1/3). Estudos foram realizados para verificar a diferença de produção dessas enzimas pela FES em frascos e em bandejas assim como através da FSm. A máxima produção de α -amilase e amiloglucosidase foram alcançadas com os seguintes parâmetros de processo: 30-32°C fermentação; proporção fécula/bagaço (2/1); 90% umidade inicial; 10% fonte de nitrogênio inorgânico (KNO_3); 30% solução salina, $\leq 5\%$ $CaCO_3$; 5% fécula e $1,0-5,5 \times 10^7$ esporos/g MS; 60 horas de fermentação; pH inicial=4,0. As melhores condições de extração foram: agitador tipo *shaker* à 30°C, 120 rpm e 60 minutos de agitação. Para a dosagem, a temperatura de incubação ideal foi de 55°C. Na FSm, a maior produção das enzimas foi alcançada com concentração de substrato de 1,0% porém a produção foi inferior à produção por FES. A FES conduzida em bandeja apresentou produção de amiloglucosidase 22,12% maior em relação à FES conduzida em frascos e a produção de α -amilase foi 19,9% superior.

ABSTRACT

Amylases are enzymes which hydrolyse starch molecules to give diverse products including dextrans and progressively smaller polymers composed of glucose units. Amylases are of great significance nowadays in biotechnology with a wide field of applications. In food industries, amylases are employed to hydrolyse starch molecules to obtain glucose, in bakery products, in beer industries and others fermented drinks, in baby foods and in animal feed too. There are others fields of amylases production, such as paper industry, textile industry, chemical and pharmaceutical industry to vitamins and antibiotic production. Though industrial enzymes of microbial origin are produced mainly by submerged fermentation (SF), solid state fermentation (SSF) represents a traditional and favored method in some countries and holds tremendous potential for the amylolytic enzymes production, improving economy and low technology. The objective of this work is to present alternatives for α -amylase and amyloglucosidase production under solid state fermentation by *Aspergillus* and *Rhizopus*. A solid residue from sugar industries, the sugar cane bagasse, has been used as inert support impregnated with starch cassava and supplemented with KNO_3 , CaCO_3 and salts solution. Different processes conditions were studied to achieved maximum yield of α -amylase and amyloglucosidase production, using experimental design applied to Surface Response Methodology. The capacity of α -amylase and amyloglucosidase production was tested in twelve different *Rhizopus* species and in eight different *Aspergillus*. A strain of *Aspergillus niger* has been selected as the great capacity to produce these enzymes. The spores concentration used was 10^7 - 10^8 spores/dried material. The experiments were carried in Erlenmeyer flasks and in tray-type bioreactor. The initial pH studied was 4.0 to 8.0; incubation temperature 25° to 35°C ; fermentation time (48, 54, 60 and 72 hours); initial moisture content of fermentation was varied between 80, 85 and 90% and the substrate/support proportion (cassava starch/sugar cane bagasse) studied were (1/1; 1.5/1; 2/1; 1/1.5; 1/2; 3/1; 1/3). Studies were realized to verify the difference between the enzymes production carried by SSF in flasks and in tray-type bioreactor such as by submerged fermentation (SF). The maximum yield of α -amylase and amyloglucosidase were achieved with the follows process parameters: fermentation temperature (30 - 32°C); proportion between starch/bagasse (2/1); initial moisture (90%); inorganic nitrogen source (10% KNO_3); 30% salts solution; $\leq 5\%$ of CaCO_3 ; starch concentration (5%); spores concentration: 1.0 - 5.5×10^7 spores/g dried material; fermentation time: 60 hours; pH initial=4.0. The best extraction conditions were: shaker agitator at 30°C , 120 rpm and 60 minutes of agitation. The enzymatic dosage the best incubation temperature was 45 - 55°C . In submerged fermentation (SF), the best α -amylase and amyloglucosidase production were achieved with 1.0% starch concentration but lower than SSF enzymes production. The SSF carried in tray-type bioreactor shows 19.9% superior α -amylase production and 22.12% superior amyloglucosidase production when compared to SSF carried in flasks.

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo, o homem utiliza enzimas para catalisar uma série de reações. A produção de vinho, pão e queijo antedata os tempos bíblicos, embora não se conhecesse o mecanismo das reações envolvidas (HARGER *et al*, 1982).

De acordo com LEADLAY (1993), as enzimas já eram utilizadas diariamente na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula, muito antes de se entender a sua natureza e função. O uso do malte da cevada para conversão do amido em açúcares fermentescíveis e o uso similar de preparações fúngicas brutas em países orientais são exemplos de alguns usos antigos de enzimas.

Com o gradual desenvolvimento do conhecimento da natureza das enzimas, extratos obtidos a partir de certos tecidos animais, como o pâncreas e a mucosa do estômago ou a partir de tecidos vegetais, como o malte e o mamão ou produzidas por bactérias, leveduras e fungos, foram encontradas muitas aplicações técnicas para as enzimas (LEADLAY, 1993). As amilases, por exemplo, encontram aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos), indústria química e farmacêutica (BRUCHMANN, 1980; WARD, 1989; QUAGLIA, 1991; LEADLAY, 1993; WAINWRIGHT, 1995; PANDEY *et al*, 1999; GUPTA *et al*, 2003; SURMELY *et al*, 2003; TUNGA & TUNGA, 2003; SZAKACS, 2004; PANDEY *et al*, 2005; SOCCOL *et al*, 2005).

SPIER *et al* (2004) também relatam vários exemplos da utilização das enzimas amilolíticas com o objetivo de modificar matérias-primas amiláceas e/ou obter produtos específicos, destacando-se os usos na indústria de alimentos (modificação de farinhas utilizadas em panificação, na modificação enzimática de materiais amiláceos para a obtenção de açúcares, na fabricação de bebidas fermentadas), na etapa de degomagem na indústria têxtil, na indústria de papel, na indústria química e farmacêutica além de seu emprego na indústria de ração animal.

Após a descoberta de que certos microrganismos produzem enzimas, foram desenvolvidos processos técnicos para a produção de enzimas microbianas em escala comercial. Desde essa época, reconhece-se que as enzimas têm composição protéica e são biocatalisadores responsáveis por uma gama de reações que

permitem que as células vivas sobrevivam (HARGER, 1982). Um exemplo histórico da ação das enzimas, citado por STRYER (1996), pode ser visto no século XVI, em cervejarias alemãs, onde a cevada era pisada em água por vários dias e em seguida deixada germinar em uma sala úmida e quente. As enzimas β -amilases e maltases, produzidas pelos germes digeriam então o amido a glicose que era posteriormente fermentada.

A produção de enzimas amilolíticas teve início no começo do século passado, em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Coube a Takamine o mérito de ter desenvolvido, no início do século passado, o primeiro método para a produção microbiológica de enzima em grande escala – a α -amilase fúngica Takadiastase (TAKAMINE, 1914) também citado por SOCCOL *et al* (2005). Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados. Também foram isolados ou desenvolvidos microrganismos capazes de produzir enzimas em altas concentrações (COSTA, 1996).

As α -amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas. As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas são designadas amilolíticas porque promovem a degradação do amido, foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982).

SZAKACS (2004) relata que as enzimas microbianas também são aplicadas na indústria de alimentos, em sabão em pó e detergentes, na fabricação de papel e tecidos, em sínteses orgânicas, diagnósticos e outros. Segundo o autor, apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por fermentação submersa (FSm), a fermentação no estado sólido (FES) representa um método tradicional e favorável em alguns países, também citado por PANDEY *et al* (2005). A fermentação no estado sólido é cada vez mais, considerada como uma alternativa da fermentação submersa para a produção de enzimas para aplicações industriais e em aplicações agrobiotecnológicas, pois requerem baixa tecnologia e maior economia de processo quando comparada ao processo de fermentação submersa.

Conforme PANDEY *et al* (2005), o mercado mundial de enzimas industriais está estimado ao redor de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares para 2005 e estima-se que a comercialização mundial de enzimas amilolíticas movimente aproximadamente 225 milhões de dólares.

A produção comercial de uma enzima envolve as etapas de produção, separação, recuperação e purificação da enzima. De acordo com RODRIGUES (1993), os equipamentos para os processos de separação e purificação podem representar até 90% do custo final de um produto obtido por fermentação. A possibilidade da obtenção de um produto enzimático, com alta concentração de α -amilase ou amiloglicosidase, e que dispense estas etapas (ou parte delas), pode vir a ser uma técnica economicamente vantajosa, podendo ser utilizada pela agroindústria que, diferentemente do campo farmacêutico, nem sempre necessita de produtos altamente puros.

A fermentação no estado sólido (FES) usando substratos facilmente disponíveis e de baixo custo vem sendo empregada, predominantemente, em países orientais, para a obtenção de produtos de importância comercial (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES, 1992).

Neste ponto cabe ressaltar a importância do bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto do processo de extração do caldo (destinado à produção de açúcar ou de álcool), representando um resíduo industrial disponível em grande escala e a baixo custo. De acordo com BARTHOLOMEU (2004), cada tonelada de cana-de-açúcar moída produz aproximadamente 260 quilos de bagaço. Em 2004, o valor da tonelada do bagaço, praticado por algumas usinas, oscilou entre R\$ 2,00 e R\$ 3,50, o que representa um baixo valor para a aquisição quando considerado um insumo para a produção industrial de enzimas usando a fermentação sólida.

Os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis. De acordo com SAUCEDO-CASTANEDA *et al* (1992), mesmo em laboratório, o sistema FES é afetado por diversos fatores, que incluem: (a) pré-tratamento do sólido; (b) composição do meio; (c) pH inicial do meio; (d) condições de autoclavagem; (e) forma, idade e quantidade de inóculo; (f) agitação; (g) aeração; (h) temperatura; (i) umidade do meio; (j) umidade no fermentador.

BOX *et al* (1987) afirmam que a decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta. O método também permite a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo a produção de enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglucosidase (glucoamilase) a partir de fungos filamentosos por fermentação no estado sólido de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1.1.2.1 Selecionar os fungos potenciais produtores das enzimas α -amilase e amiloglucosidase dentre as cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* disponíveis no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná;
- 1.1.2.2 Utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como suporte alternativo no processo de fermentação no estado sólido, reaproveitando este resíduo agroindustrial produzido em grande escala no território nacional;
- 1.1.2.3 Utilizar a fécula de mandioca como substrato das fermentações, produto disponível em abundância no nosso País apresentando baixo custo e alta disponibilidade;
- 1.1.2.4 Estudar as condições ideais para a produção dessas enzimas, pela otimização das condições físicas e químicas de cultivo;
- 1.1.2.5 Estudar as condições ideais para a extração das enzimas produzidas;
- 1.1.2.6 Estudar a caracterização cinética das enzimas α -amilase e amiloglucosidase bruta;
- 1.1.2.7 Realizar a precipitação do extrato enzimático produzido contendo as enzimas α -amilase e amiloglucosidase;
- 1.1.2.8 Realizar uma análise preliminar do custo de produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase;
- 1.1.2.9 Aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta para a obtenção de modelos que expliquem a influência das variáveis da FES para a produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase com auxílio do programa Estatística para Windows 5.0 versão estudantil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENZIMAS

2.1.1 DEFINIÇÃO DE ENZIMA

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Conforme HARGER (1982), enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos. Embora a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares e são excretadas para fora da célula viva, como por exemplo, as amilases fúngicas. Conforme LEADLAY (1993), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. Com sua ação, regulam a velocidade de muitas reações químicas presentes neste processo. A denominação *enzima*, proposto em 1867 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymç*, que significa “em fermentação”. Atualmente as enzimas identificadas ultrapassam 700 tipos (ROSAS, 2003).

2.1.2 DENOMINAÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação. As enzimas se denominam adicionando a terminação *ase* ao nome do substrato com o qual realizam reações (LAIDLER, 1954). De acordo com o mesmo autor, a enzima que controla a decomposição da uréia recebe o nome de urease; aquelas que controlam a hidrólise de proteínas denominam-se proteases assim como as que hidrolisam o amido são chamadas de amilases. Algumas enzimas como as proteases tripsina e pepsina, conservaram os nomes utilizados antes que se adotasse esta nomenclatura.

2.1.3 CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS

De acordo com HARGER (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases), de origem fúngica ou bacteriana.

Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. As principais aplicações das enzimas extracelulares que degradam o amido consistem na conversão do amido em monossacarídeos como a glucose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas. As enzimas que degradam o amido também são empregadas na obtenção de açúcares fermentescíveis utilizados nas indústrias cervejeiras, na produção de bebidas alcoólicas e na modificação de farinhas empregadas em panificação (WARD, 1989).

FELLOWS (1994) relata que a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas).

A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio.

As amilases fúngicas, que são carboidrases, parecem ser enzimas exocelulares, conforme cita HARGER (1982). Essas enzimas pertencem à classe das hidrolases que são responsáveis por reações hidrolíticas. A maioria das carboidrases é produzida por diferentes tipos de fungos e muitas espécies produzem diferentes carboidrases. Uma propriedade singular das enzimas hidrolíticas é a sua grande especificidade pelo substrato hidrolisando um substrato particular.

2.1.4 ENZIMAS AMIOLÍTICAS

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982).

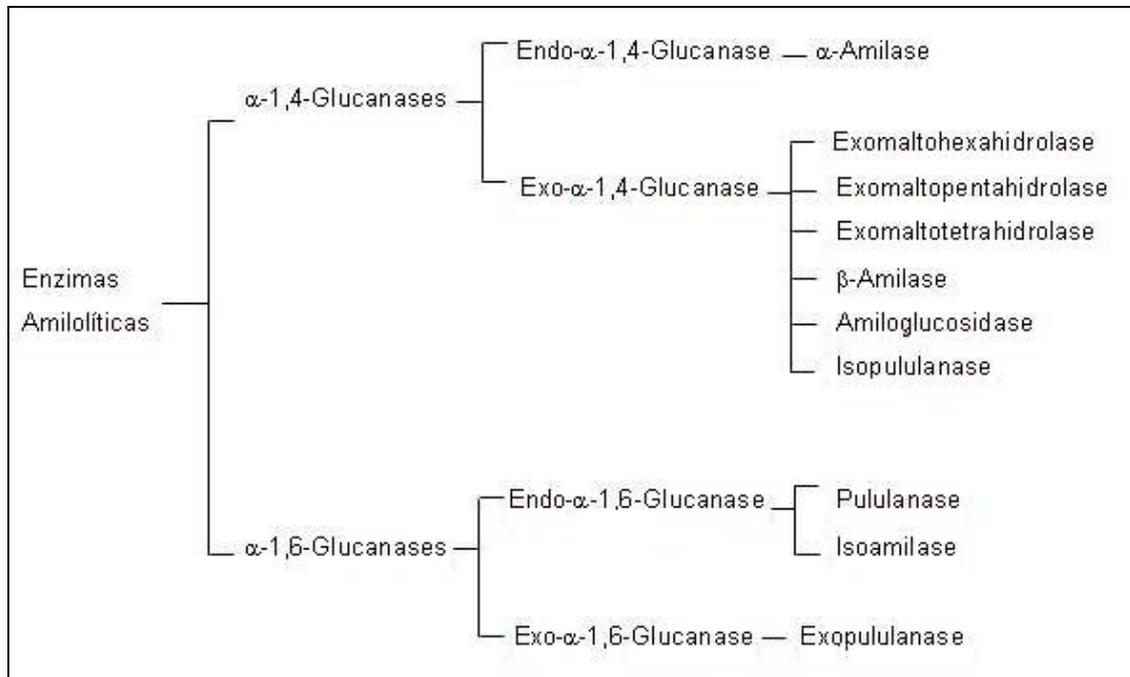
GUPTA *et al* (2003) e PANDEY *et al* (2005) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel. Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido.

Conforme conceituadas por REED (1975), as enzimas responsáveis pela degradação de amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas estão as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucoasidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Outro conceito dado por GUPTA *et al* (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido.

COSTA (1996) apresenta um esquema (Figura 1) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS



FONTE: NIGAM & SINGH (1995), CITADO POR COSTA, 1996.

A amilose, um dos componentes do amido e fécula, é formada por unidades de D-glucose unidas linearmente por ligações α -1,4 (CONN & STUMPF, 1975). Segundo os autores, possui uma extremidade redutora e uma não-redutora. A α -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao acaso as ligações α -1,4 por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glucose. A β -amilase, ataca a extremidade não redutora da amilose, dando sucessivas unidades de maltose.

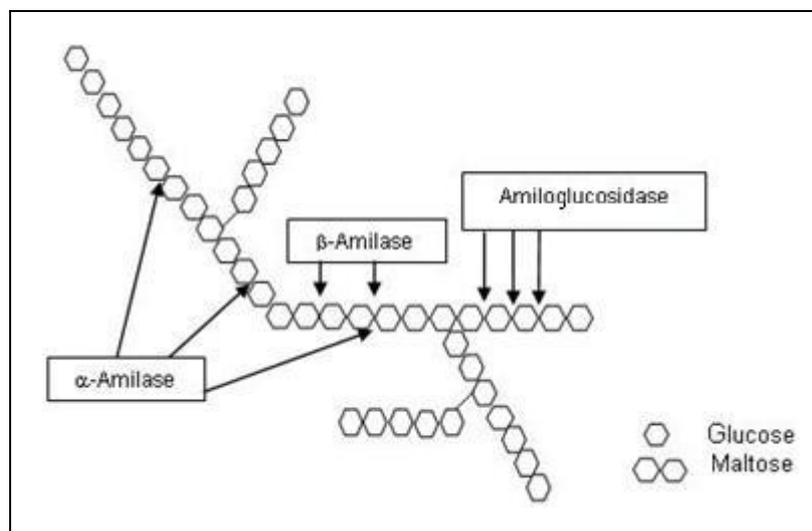
A amilopectina é um polissacarídeo ramificado; na sua molécula, cadeias mais curtas de glucose unidas por ligações α -1,4 são também unidas entre si por ligações α -1,6 (das quais se podem obter a isomaltose).

A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. Desse modo, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original – denominado dextrina limite – é o

produto dessas enzimas. Uma outra enzima, a α -1,6 glucosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glucose e maltose (CONN & STUMPF, 1975).

A Figura 2 mostra uma representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas sobre uma molécula de amido, que é considerada molécula polissacarídica.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS
 α -AMILASE, β -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE



FONTE: O AUTOR

2.1.4.1 α -Amilase

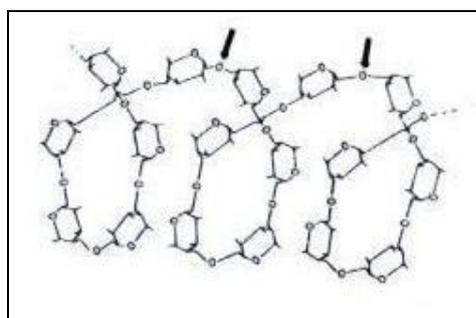
PANDEY *et al* (2005) definem α -amilase (1,4- α -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.) como sendo uma enzima que quebra as ligações $\alpha(1,4)$ dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união α -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva (tipo endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Isso representa um ataque preferencialmente sobre cada passo da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da amilopectina, como mostra a Figura 6. As setas em preto representam o local da ação das α -amilases, que após seu ataque rompendo as ligações representadas, originam fragmentos de 5 a 7 unidades de glicose (BRUCHMANN, 1980). Após a

ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. Atua, isolada ou simultaneamente, com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de sementes de cereais são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto as de origem microbiana são empregadas em processos onde é necessária a sacarificação e a liquefação do amido.

Apesar de nos últimos anos as α -amilases bacterianas terem recebido mais atenção dos pesquisadores devido à sua maior termoestabilidade, a liquefação do amido por aquelas enzimas tem se constituído na unidade operacional mais cara do processo de sacarificação, principalmente por serem produzidas por fermentação submersa (SOUZA *et al*, 1996). Assim, no campo da biotecnologia pesquisas sobre a produção de α -amilases termoestáveis de menor custo, são recomendadas (SOUZA *et al*, 1996).

O peso molecular da α -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 KDa (GUPTA *et al*, 2003), sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 KDa e as α -amilases fúngicas (41 a 69 KDa) de acordo com os resultados de diferentes autores citados por PANDEY *et al* (2005).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO ATAQUE INICIAL DA α -AMILASE SOBRE AS CADEIAS HELICOIDAIS α -1,4-GLUCAN DA AMIOSE E DA AMILOPECTINA.



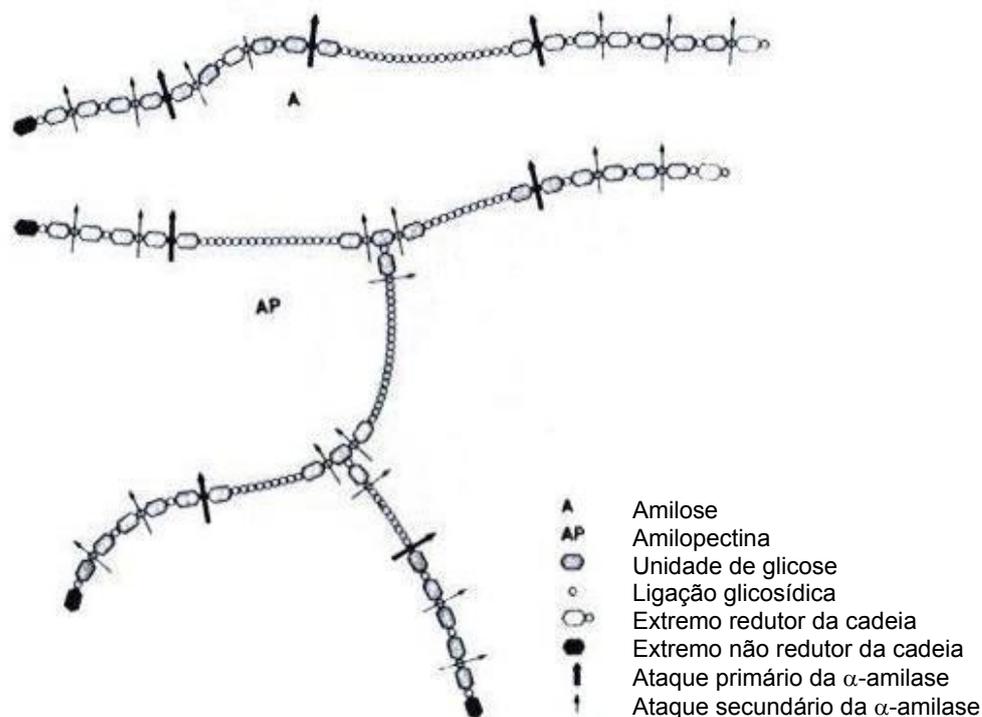
FONTE: BRUCHMANN (1980)

NOTA: (→ α -amilase).

As ligações α -1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela amilase, sendo o produto final do ataque da amilopectina pela amilase moléculas de isomaltose. A seguir é mostrada uma representação esquemática da ação da α -amilase sobre a

amilose e amilopectina. Para melhor visualização das cadeias de ambas as moléculas, são apresentadas na Figura 4 as moléculas na forma linear ao invés da forma espiral.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE SOBRE AS FRAÇÕES DE AMIDO (AMILOSE E AMILOPECTINA)



FONTE: BRUCHMANN (1980)

Segundo o mesmo autor, teoricamente a ação da α -amilase sobre a amilose conduz a 87% de maltose e 13% de glicose; e sobre a amilopectina 73% de maltose, 8% de isomaltose e 19% de glicose. Em um sistema fechado, no entanto, não se alcançam esses valores já que a maltose formada inibe competitivamente a α -amilase. No entanto, nas destilarias, por exemplo, trabalha-se com um “sistema aberto” já que a maltose formada é hidrolisada a glicose pelas enzimas das leveduras, que depois é fermentada a etanol e dióxido de carbono. A partir das amiloglicosidases produzidas pelas leveduras se consegue uma hidrólise total do amido.

Para a atividade da α -amilase é necessária a presença de Ca^{+2} como cofator; as amilases de origem diferentes se diferenciam pela força de ligação com o cálcio. Segundo BRUCHMANN (1980), tem sido demonstrado que as α -amilases privadas

deste íon carecem de atividade. O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH.

O cálcio não participa diretamente na formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade. Na prática, é importante a presença de cálcio para garantir que a enzima permaneça completamente ativa. Na verdade, traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar enzimas sem adição de cálcio. Entretanto, a adição de sais de cálcio é recomendada para alcançar máxima proteção das enzimas contra desnaturação pelo calor.

Conforme comenta o mesmo autor, na técnica de destilarias e cervejarias existe sempre quantidade de cálcio Ca^{2+} para que a atividade da α -amilase seja ótima. Os traços de cálcio presentes no amido são suficientes para saturar com este íon a enzima privada dele. De todas as formas a adição de Ca^{2+} é útil para assegurar uma estabilidade máxima da enzima frente à desnaturação pelo calor.

Assim como os íons Ca^{2+} representam o cofator para todas as α -amilases, os íons Cl^- são necessários para que as α -amilases de origem animal (saliva, pâncreas) e as bacterianas (*B. subtilis*), desempenhem sua total atividade, exceto para as α -amilases do malte e para as α -amilases fúngicas.

De acordo com HARGER (1982) as α -amilases podem ser encontradas nos mamíferos, vegetais superiores, fungos, bactérias e crustáceos. A α -amilase cristalina pode ser preparada a partir do sangue e pâncreas humanos, pâncreas do rato, cevada malteada, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, *Pseudomonas saccharophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, enquanto as enzimas purificadas são obtidas de sorgo malteado, soja, trigo maltado, pâncreas de alguns pássaros como o pombo além de crustáceos como o caranguejo.

O pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0. Possui caráter ácido e é solúvel em água. Sua atividade diminui rapidamente acima de 50°C, mas na presença de um excesso de íons cálcio a desativação pode ser diminuída. Íons de metais pesados, como o mercúrio, a prata e o chumbo inibem a α -amilase. A energia de ativação da α -amilase obtida por *Aspergillus oryzae* é 10,7 kcal, na faixa

de temperatura de 0 a 40°C; peso molecular de 52 kDa e o ponto isoelétrico é 4,2; o coeficiente de sedimentação é $4,7 \times 10^{13}$ e o coeficiente de difusão é $7,4 \times 10^7$ (HARGER, 1982).

A faixa ótima de temperatura para sua atividade é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte. A atividade aumenta consideravelmente de 0° a 40°C, entretanto, as amilases bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima ao redor de 70°C (REED, 1975). Miller *et al* (1953) citado por REED (1975) estudou a estabilidade da enzima com o aumento da temperatura até 80°C. As amilases fúngicas perderam sua atividade e em 80°C somente alcançou 1% de sua atividade, enquanto nessa mesma temperatura, as amilases bacterianas preservaram 92% de sua atividade.

2.1.4.2 β -Amilase

A β -amilase, cujo nome sistemático é α -1,4-glucan maltohidrolase, é também chamada sacarógena, encontrada, sobretudo nos vegetais superiores. A β -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão (HARGER, 1982).

Conforme cita o mesmo autor, as β -amilases são obtidas a partir de grãos de gramíneas não germinadas (pois com a germinação surge a α -amilase, que obriga a separação em meio ácido) A raiz da batata doce (*Ipomoea batatas*) contém somente β -amilase. A β -amilase cristalina é obtida a partir de grãos de trigo, cevada, batata e das sementes da soja. Segundo QUAGLIA (1991), a principal fonte de β -amilase é o extrato de malte, que é proveniente da cevada ou do trigo germinados. Da cevada malteada prepara-se a β -amilase separando-a da α -amilase por extração fracionada. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 a 50°C.

2.1.4.3 Amiloglucosidade (Glucoamilase)

A amiloglucosidase, ou glucoamilase, ou glicoamilase, (1,4) (1,6)- α -D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.3, conforme a “*Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*”) é uma enzima extracelular que rompe as ligações α -1,4 e α -

1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (LIN *et al*, 1993; PANDEY *et al*, 2005).

Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados pela enzima, que atua também sobre as ligações α -1,3. A amiloglucosidase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção. Entretanto, como a enzima é chamada de indução não típica, o microrganismo a sintetiza, mesmo se crescer em glicose como fonte de carbono (Reguly, 1991) citado por COSTA (1996). A enzima é encontrada no sangue, em meios de crescimento de bactérias e no malte de cevada; porém são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, assumindo importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK & SANTI, 1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose. Assim, a amiloglucosidase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

Segundo ZANIN (1989), a origem da amiloglucosidase é essencialmente fúngica (*Aspergillus* e *Rhizopus*), sendo encontrada na forma de duas isoenzimas, o que contribui para que apresentem diferentes especificidades. A maioria das linhagens de *Aspergillus niger* produz principalmente, duas isoenzimas: amiloglucosidase I e II normalmente presentes nas soluções comerciais em proporções diferentes.

Da mesma forma como acontece com outras enzimas fúngicas (celulases e pectinases, por exemplo), SCHMIDELL (1986) afirma que, quando se produz amiloglucosidase, não se obtém um só tipo de molécula. O autor cita uma série de referências a respeito da existência de duas isoenzimas, amiloglucosidase I (com peso molecular de 99 kDa) e amiloglucosidase II (112 kDa), resultantes da produção de *Aspergillus niger*. Para o cultivo de *Aspergillus awamori* é mencionada a presença das amiloglucosidases I, II e III.

As amiloglucosidasas provenientes de diferentes fontes apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 (COSTA, 1996) e entre 4,5-5,0 (SOCCOL *et al*, 2005) estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0 (REED, 1975). Essas

amiloglucosidasas incluem as produzidas por *A. niger* (Pandey, 1990) *A.oryzae* (Miah & Ueda, 1977) citados por SOCCOL *et al* (2005). ZANIN (1989) também ressalta que o pH em que a enzima amiloglucosidade de *A. niger* apresenta máxima atividade está entre 3,5 e 5,0.

A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60°C (REED, 1975; COSTA, 1996), que incluem a amiloglucosidase de *A. niger*, *A. oryzae*, *Monascus kaoliang*, *Mucor rouxinol*, *Penicillium oxalicum* (SOCCOL *et al*, 2005).

Segundo FELLOWS (1994) e PANDEY *et al* (2005), as enzimas α -amilases e amiloglucosidasas produzidas a partir de microrganismos são amplamente empregadas em indústrias e são produzidas, com condições mostradas na Tabela 1.

TABELA 1 – PROPRIEDADES DE ALGUMAS AMILASES FÚNGICAS

FONTE	ENZIMA	PM (kDa)	pH ótimo	TEMP ótima (°C)	INIB.	ESTAB.	REFERÊNCIAS
<i>A. niger</i>	AM	58,0	4,0-5,0	50	-	Ca ²⁺	GUPTA <i>et al</i> (2003)
<i>A. niger</i>	AM	56,23	5,0	60	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺	Ca ²⁺	RAMACHANDRAN <i>et al</i> (1979)
<i>A. niger</i>	AM	-	4,0	60	-	-	Pandey (1990) citado por SOCCOL <i>et al</i> (2005)
<i>A. niger</i>	AM	-	4,5	50	-	-	Takahasi <i>et al</i> (1985) citado por SOCCOL <i>et al</i> (2005)
<i>A. niger</i>	AM	-	3,5-5,0	30-60	-	-	FELLOWS (1994)
<i>A. niger</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)
<i>A. oryzae</i>	AM	52,0-53,0	5,0-6,5	50	-	-	YABUKI <i>et al</i> (1977)
<i>A. niger</i>	AA	-	5,0	55	-	Ativada por Ca ²⁺	SMITH (1991)
<i>A. niger</i>	AA	-	5,0	50	-	-	Bhumibhamon (1983) citado por PANDEY <i>et al</i> (2005)
<i>A. oryzae</i>	AA	-	5,0-6,0	30-40	-	-	SILLS <i>et al</i> (1983)
<i>A. oryzae</i>	AA	-	4-6,6	30-55	-	-	FELLOWS (1994)
<i>A. oryzae</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)
<i>A. awamori</i>	AM	54,0	4,8-5,0	50	Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , maltose	-	BHELLA & ALTOSAAR (1985)
<i>Rhizopus sp.</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)

NOTA: PM = Massa molecular; Temp = Temperatura; Inib = Inibidores; Estab = Estabilizantes.
AA = α -amilase
AM = amiloglucosidase

Como pode ser observado, a Tabela 1 apresenta algumas características da α -amilase e da amiloglucosidase produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e

Rhizopus como: pH ótimo, massa molecular, temperatura ótima, inibidores e estabilizantes dessas enzimas.

2.1.5 Produção de enzimas microbianas

Em relação à produção industrial de enzimas microbianas, FELLOWS (1994) recomenda que sejam observados os seguintes requisitos: os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em um ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

As enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, como por exemplo: farelo de trigo, milho, cascas de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha (FELLOWS, 1994; WARD, 1989) como também podem ser obtidas por cultivos submersos com o emprego de substratos líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, podem requerer também nutrientes específicos para o crescimento e determinados minerais para a produção de enzima. A produção de enzimas pelo cultivo submerso exige a preparação prévia de um inóculo que é preparado nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para a produção da enzima. Alguns exemplos de substratos de baixo custo e disponíveis em abundância são os melaços, hidrolisados de amido e água de maceração de milho (FELLOWS, 1994).

Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular. Quando é necessária a extração do restante da enzima intracelular, pode-se proceder à precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração. O êxito da fabricação industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é

alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (FELLOWS, 1994).

De acordo com PANDEY *et al* (1999) e PANDEY *et al* (2005), as enzimas amilolíticas também são produzidas por fungos filamentosos, sendo preferidas espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*. WAINWRIGHT (1995) e PANDEY *et al* (2005) descrevem que espécies como o *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* são espécies produtoras de α -amilase, e *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. saitri*, *A. terreus*, *A. foetidus* e *Rhizopus foetidus*, *R. delemere* são espécies de fungos utilizadas para a produção de amiloglucosidase, assim como SOCCOL *et al* (2005) destacam que a amiloglucosidase (glucoamilase), na maioria das vezes, é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Endomyces* sp.

Diversos são os microrganismos produtores de α -amilase e amiloglucosidase, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* que têm sido empregadas em processos industriais (COSTA, 1996; PANDEY *et al*, 2005). WARD (1989) afirma que, enquanto a maltose parece ser o melhor indutor para a α -amilase de *A. oryzae*; o amido, a maltose e a glucose estimulam a produção de amiloglucosidase por *A. niger*.

FELLOWS (1994) relata que as preparações comerciais de amilases fúngicas que contêm pequenas proporções de fosfatase, glucoamilase e protease, sacarificam mais profundamente o amido, que a amilase e dão lugar a quantidades substanciais de maltose que contem apenas glucose. São utilizadas para os seguintes processos: eliminam a turbidez produzida pelos amidos e reduzem a viscosidade dos sucos de frutas; transformam o amido de cacau em dextrinas reduzindo assim sua viscosidade e melhorando os xaropes de chocolate; reduzem a viscosidade da massa de panificação e aceleram a fermentação dessas massas pelas leveduras.

Dentre as amilases fúngicas as que apresentam maior interesse industrial são: α -amilase, β -amilase; amiloglucosidase e dextrinase limite (HARGER, 1982).

Já α -amilase recombinante é aproveitada na fabricação de xarope de milho com alto teor de frutose, usado como adoçante em refrigerantes e alimentos. Até mesmo a levedura usada na fermentação de cerveja é muitas vezes produzida por meio de microrganismos geneticamente modificados. Cerca de 50% das enzimas

utilizadas na produção de alimentos atualmente, são obtidas a partir de microrganismos recombinantes.

2.1.6 Atividade enzimática

A quantificação de uma determinada enzima presente em um meio é complexa, pois parte da enzima pode estar inativa, ou parcialmente ativa, além da possibilidade da existência de outras enzimas no mesmo meio. O parâmetro mais importante que deve ser considerado na quantificação de uma enzima é a sua atividade, ou seja, a atividade enzimática (CHAPLIN & BUCKE, 1992). Essa atividade geralmente é medida como uma unidade enzimática (U), unidade internacional, a qual é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto em condições definidas de teste. (temperatura com pH ótimo e concentração de substrato) (HENRY, 1964; SCOPES, 1988; CHAPLIN & BUCKE, 1992; SEGEL, 1976).

Por outro lado, SURMELY *et al* (2003) apresenta o *katal* (*kaf*) como a unidade internacional de atividade enzimática. O *katal* é definido como a quantidade de enzima que transforma um Mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões. Para uma unidade menor usa-se a quantidade de enzima que transforma 1 μ mol de substrato por minuto. Apesar dessa normatização, cada fabricante de enzima define as próprias unidades em condições experimentais particulares.

2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

2.2.1 Definição e características gerais da FES

A fermentação no estado sólido, tradução do inglês “*solid state fermentation*” ou “*solid state culture*” possui várias definições conforme propõem os seguintes autores: HESSELTINE (1977) descreveu como uma fermentação no qual o substrato não é líquido, MOO-YOUNG *et al.* (1983) designou como um processo onde os microrganismos utilizam materiais insolúveis para seu crescimento e metabolismo. Segundo AIDOO *et al* (1982) a fermentação em meio sólido engloba toda fermentação que ocorre sob substrato sólido bem como, em suporte sólido nutricionalmente inerte. RAIMBAULT & ALAZARD (1980), MAHEVA *et al* (1984), LONSANE *et al* (1985), TANGERDY (1985), MUDGETT (1986) e ORIOL (1987) definiram como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em

substratos sólidos ocorre na ausência de todo líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (SOCCOL, 1992).

O material sólido, utilizado em fermentação no estado sólido, é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial, no entanto os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados - 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL, 1992).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais (solos) de desenvolvimento desses fungos e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas. Elas são propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOU, 1987). A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em umidades muito baixas, da ordem de 12%, porém os níveis de umidade relativa variam de 12 a aproximadamente 80%. A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE *et al.*, 1985) suportando também pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), tais características não são encontradas nas leveduras e bactérias.

2.2.2 Tipos de fermentação no estado sólido

De acordo com Dufour (1990) citado por SOCCOL (1992), a fermentação em meio sólido é constituída por um sistema trifásico (sólido – líquido - gasoso) no qual a fase sólida está inteiramente ligada à fase líquida. A água encontra-se em três diferentes formas e em proporções variáveis no meio de cultura:

- a) Água ligada ao sólido (água de constituição);
- b) Água fracamente ligada ao sólido (água de solvatação);
- c) Água adsorvida por capilaridade ao sólido (água livre).

SOCCOL (1992) descreve que a fase sólida é constituída pelo suporte de crescimento e pelo reservatório de água que fornece os nutrientes e a fonte de

energia responsável pelo crescimento do microrganismo. A essa fase podem ser adicionados sais, vitaminas ou outras fontes de carbono em função das exigências do microrganismo ou produto de metabolismo desejado.

De acordo com o mesmo autor, a fonte de carbono é constituída, na maioria dos casos, por polímeros vegetais de alto peso molecular. A degradação dessas macromoléculas necessita da síntese de enzimas (amilases, celulasas, pectinases, xilanases, cafeinases, proteases) que permitam sua assimilação. Em fermentação líquida os substratos são muito mais simples e utilizados em concentrações bem menos importantes. A interface gás-líquido constitui uma barreira às transferências de calor e às trocas oxigênio - gás carbônico.

Segundo HESSELTINE (1977), as fermentações em meio sólido são classificadas em três diferentes categorias em função da tecnologia empregada:

- a) Fermentação estática;
- b) Com agitação ocasional;
- c) Com agitação contínua.

Em função da natureza do suporte, também pode se distinguir dois tipos de fermentação no estado sólido (FES), segundo (Saucedo-Castañeda, 1991) citado por SOCCOL (1992):

- *Cultura sólida em uma fase substrato-suporte*: Neste caso a fase sólida é constituída por um material que possui função de suporte e fonte de nutrientes.

Vários autores trabalharam utilizando essa metodologia, tais como: HESSELTINE (1972); RAIMBAULT & ALAZARD (1980); MOO-YOUNG *et al* (1983); STEINKRAUS (1984); TANGERDY (1985); SOCCOL (1992). Para exemplificar, SOUZA *et al* (1996) utilizaram farelo de trigo como substrato-suporte para a produção de α -amilase por *Rhizopus* sp.; COSTA (1996) produziu a enzima amiloglucosidase em FES de farelo de arroz (substrato-suporte) utilizando *Aspergillus niger*; VANDENBERGHE (2000) utilizou o bagaço de mandioca como substrato-suporte da FES para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*; BRAND *et al* (2002), utilizando também *Aspergillus niger* realizaram o processo de detoxificação biológica de cascas de café pela fermentação no estado sólido, utilizando cascas de café como sendo substrato e ao mesmo tempo

desempenhando a função de suporte da fermentação sólida. TUNGA & TUNGA (2003) produziram amilase extracelular a partir de *Aspergillus oryzae* pela FES com os seguintes substratos-suporte: farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz, farelo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. AZEVEDO (2004) obteve isoflavonas bioativas por fermentação no estado sólido empregando *Aspergillus soyae* e usando a farinha de soja como substrato-suporte.

- *Cultura sólida em uma fase suporte impregnada de um meio líquido*: Neste tipo de fermentação, a fase sólida é considerada como um suporte inerte, que não constitui uma fonte de nutrientes para os microrganismos, mas serve de reservatório para uma solução nutritiva que estará absorvida na matriz sólida. Os materiais utilizados são diversos, a maioria possui uma alta capacidade de retenção de água, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar, fibras de celulose, poliuretano, cinzas vulcânicas, esponjas, cascas de árvore, vermiculite, amberlite (resina trocadora de íons) (SOCCOL, 1992).

Esse processo de fermentação é menos utilizado podendo-se citar os trabalhos citados por SOCCOL (1992): Lakshminarayana *et al* (1975) que utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como suporte impregnado com solução de sacarose ou melaço de cana, enriquecido com fosfatos e nitratos inoculados com esporos de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico; Fujishima *et al* (1972) empregaram esponjas de nylon impregnadas com meio de cultura e produziram proteases, lípases e fosfatases alcalinas com cepas de *Aspergillus* e *Penicillium*; Sato *et al* (1982) realizaram estudos utilizando cascas de árvores impregnadas com uma solução de glucose para estudar o crescimento de microrganismos; Joshi & Yamazaki (1987) que cultivaram *Streptomyces* sobre pedaços de tecidos de algodão com o objetivo de produzir tienamicina e cefalosporina C; LARROCHE *et al* (1986) que estudaram a produção de esporos por *Penicillium roqueforti* sobre cinzas de vulcão; AURIA *et al* (1992) cultivaram *Aspergillus niger* sobre vermiculite e amberlite como suporte para estudar o crescimento de fungos filamentosos. MOHAN (2001) utilizou o bagaço de cana-de-açúcar como suporte inerte para a propagação vegetativa *in vitro*, estudando a fase de enraizamento de *Malus prunifolia* (macieira). ZILIOLI *et al* (2004) empregaram bagaço de cana-de-açúcar como suporte e

hidrolisado de bagaço de mandioca como efetivo substrato da fermentação sólida por *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana.

2.2.3 Aplicações da fermentação no estado sólido

A fermentação no estado sólido é amplamente utilizada para a obtenção dos seguintes produtos, conforme descrito por SOCCOL (1992):

- a) Queijos do tipo Roquefort (cepas de *Penicillium roqueforti*, um dos poucos fungos filamentosos que se desenvolve em condições limitadas de oxigênio, nos espaços livres no interior de leite qualhado) e queijos do tipo Camembert (cepas de *Penicillium camemberti* e *P. caseicolun* desenvolvem-se essencialmente na superfície do leite qualhado) RAIMBAULT & ALAZARD (1980);
- b) Fungos comestíveis: O champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) é produzido a partir de grãos de cereais como centeio, cevada, trigo e milho utilizados como substrato sólido umedecidos com água e acrescidos de CaCO_3 (Delmas, 1989) citado por SOCCOL (1992). A cultura de Shii-take (*Lentinus edodes*) é dominada por chineses e japoneses há mais de 900 anos. A *Volvariella volvacea* é outro champignon utilizado pelos chineses há séculos, que se desenvolve em palha de arroz (substrato).
- c) Alimentos orientais fermentados: tempeh, miso, shoyu, koji;
- d) Produção de enzimas: amilases, ligninases, proteases, xilanases, fitases, celulasas, pectinases;
- e) Enriquecimento protéico de produtos e resíduos agrícolas: uso de fungos para melhorar a digestibilidade, o gosto, a cor, o aroma, a textura. Na produção de proteínas, os fungos filamentosos apresentam vantagens quando comparados à utilização de bactérias e leveduras, pois os fungos possuem maior perfil protéico, com maior concentração de aminoácidos essenciais;
- f) Síntese de metabólitos primários e secundários por fermentação no estado sólido (ácido cítrico, ácido L(+) láctico, etanol, giberelinas, antibióticos, toxinas, alcalóides, aromas, produção de esporos).

2.2.4 Vantagens e desvantagens da FES

O uso da FES ou da fermentação submersa deve ser estudado de acordo com o microorganismo a ser utilizado e o produto que se deseja obter. A comparação da FES e das fermentações submersas foi freqüentemente realizada (MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1977; LONSANE *et al.*, 1985). Para a produção de amiloglucosidase (glucoamilase), SOCCOL (1992) demonstraram que cepas de *Rhizopus* foram capazes de produzir numa concentração 32 vezes superiores em meio sólido quando comparados aos obtidos em cultura submersa.

A fermentação no estado sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade de meio de cultura; redução dos efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações resultantes da baixa umidade do meio fermentativo; condições de cultura próximas ao dos meios naturais; para as fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor do que o da cultura líquida; baixa demanda de energia.

Além das vantagens, a FES também apresenta algumas desvantagens como: risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas); difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade); pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático); alta taxa de inoculação, quando não se utiliza a microflora natural; estimação precisa de biomassa; papel essencial da umidade e da atividade de água.

2.2.5 Fermentadores

Para a seleção de cultura e para a otimização das variáveis e do processo é indicado que a FES seja conduzida em frasco, com capacidade de trabalho de 50 a 1000 g (Lonsane *et al*, 1992) citado por COSTA (1996).

PANDEY (1991) apresenta os principais tipos de biorreatores usados em SSF (FES), citando uma série de estudos realizados em nível laboratorial em frascos erlenmeyer, béqueres e Garrafas de Roux. O autor enfatiza os fermentadores usados em escala maior (de bandejas ou de tambor) e o fermentador do tipo coluna; este, com emprego crescente, tanto em nível de laboratório, como em uma escala intermediária.

2.2.5.1 Fermentador do tipo bandeja

O fermentador de bandejas, usado, provavelmente, há mais de 3000 anos, é o equipamento mais simples utilizado nos processos SSF. A matéria-prima é umedecida, esterilizada, resfriada, inoculada e distribuída em bandejas. Estas são arranjadas uma sobre as outras, de maneira que fique um espaço apropriado entre elas para a aeração. A fermentação ocorre em uma estufa, que é aquecida até o processo entrar na fase exotérmica, a partir do que o ar insuflado trata de manter a temperatura e a umidade nos níveis desejados. O processo requer grande área operacional, e sua operação quase impede uma automação (PANDEY, 1991); (COSTA, 1996).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS

2.3.1 Fonte de carbono

A produção de α -amilase geralmente é induzida pela presença de amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose. Existem vários estudos mostrando que a atividade enzimática aumentou quando foram utilizados amido e maltose como indutores de α -amilase. Já a glucose e outros açúcares como xilose e frutose podem reprimir a sua produção (GUPTA *et al*, 2003).

As fontes de carbono amiláceas são os principais substratos para a sua produção. Resíduos agroindustriais como farelo de trigo também tem sido utilizado para produção econômica de α -amilase por FES como também na fermentação líquida em superfície (GUPTA *et al*, 2003; TUNGA & TUNGA, 2003). Ao estudar a produção de amilases extracelulares através da fermentação no estado sólido de farelo de trigo por *Aspergillus oryzae*, TUNGA & TUNGA (2003) verificaram que a suplementação do meio com diferentes fontes de carbono (glucose, sacarose, maltose e lactose) não contribuíram para o aumento da produção da enzima.

2.3.2 Fonte de nitrogênio

Fontes de nitrogênio orgânico têm sido preferidas para a produção de α -amilase por bactérias. Como exemplo o extrato de levedura a partir de *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. e *Halomonas meridiana*, que também tem sido utilizado em conjunto com outras fontes de nitrogênio, tais como bactopectona para a produção de α -amilase no caso de *Bacillus* sp., sulfato de amônio no caso de *Bacillus subtilis*, sulfato de amônio e caseína para *C. gigantea* e farinha de soja e extrato de carne para *A. oryzae*. Em contrapartida, vários sais inorgânicos tais como sulfato de amônio, nitrato de amônio têm sido relatados para a melhor produção de α -amilase por fungos (GUPTA *et al*, 2003).

2.3.3 Fosfatos

Fosfato tem um importante papel regulatório na síntese de metabólitos primários e secundários dos microrganismos assim como seus efeitos no crescimento do organismo e na produção de α -amilase. Um aumento significativo na produção dessa enzima por *A. oryzae* em níveis ao redor de 0,2 M tem sido relatado. Por outro lado, altas concentrações de fosfato foram inibidores da produção da enzima por *B. amyloliquefaciens* (GUPTA *et al*, 2003).

2.3.4 Outros íons

O magnésio (Mg^{2+}) é um elemento importante na produção de α -amilase, apresentando aumento da produção da enzima na sua presença. Sódio (Na^+) e magnésio (Mg^{2+}) mostraram ser ativadores da produção da enzima por *Bacillus* sp. Potássio (K^+), sódio (Na^+), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}), molibdênio (Mo^{2+}), cloreto (Cl^-) e sulfato (SO_4^{2-}) não apresentaram efeito sinérgico, enquanto o cálcio (Ca^{2+}) foi inibidor para a produção de amilase por *A. oryzae* (GUPTA *et al*, 2003).

2.3.5 pH

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de α -amilases bacterianas por fermentação submersa (FSm) apresentam pH ótimo entre 6 e 7, mas varia de acordo com o gênero e a espécie da bactéria ou do fungo produtor. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio em alguns casos elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA *et al*, 2003).

2.3.6 Temperatura

A maioria dos estudos de produção de amilases foi realizada a partir de fungos mesofílicos dentro da faixa de temperatura de 25 a 37°C. Rendimentos ótimos de α -amilase foram alcançados entre 30 e 37°C para *Aspergillus* sp., 30°C para *A. niger* na produção da amiloglicosidase (COSTA, 1996); 30°C para a produção de α -amilase por *A. oryzae* (TUNGA & TUNGA, 2003); 55°C pelo fungo termofílico *Thermomonospora* e a 50°C por *T. lanuginosus* na produção de α -amilase (GUPTA *et al*, 2003).

2.3.7 Agitação

A intensidade de agitação influencia a mistura de nutrientes e a taxa de transferência de oxigênio em muitas fermentações fúngicas, influencia também a morfologia micelial e a formação de produto. Estudos demonstraram que altas velocidades de agitação prejudicam a morfologia do micélio do fungo. Estudos mostraram que velocidades de agitação ao redor de 300 rpm são normalmente utilizadas para a produção de amilases a partir de vários microrganismos (GUPTA *et al*, 2003).

2.4 MICRORGANISMOS EMPREGADOS NA FES

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados nos processos no estado sólido, devido, principalmente, à grande capacidade de crescer na ausência de água livre e apresentarem versatilidade em suas aplicações, além de sua facilidade de adaptação e manipulação (COSTA, 1996). WARD (1989) salienta que os microrganismos que crescem bem nas fermentações sólidas são geralmente organismos que podem tolerar uma atividade de água (a_a ou a_w) baixa. Os microrganismos possuem respostas distintas frente à atividade de água, de forma que quando a a_w é inferior a 0,95, o crescimento bacteriano é inibido, enquanto os fungos e leveduras podem crescer a uma a_w de aproximadamente 0,7.

Segundo PANDEY (1992) a seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES. O autor apresenta como exemplo da importância da escolha do microrganismo o fato de que uma cultura de *Aspergillus niger* pode produzir cerca de vinte tipos diferentes de enzimas; assim como a enzima α -amilase pode ser obtida a partir do cultivo de mais de vinte e oito cepas distintas.

2.4.1 Fungos Filamentosos

PELCZAR (1998) define fungos como sendo organismos eucarióticos não-fotossintéticos, possuindo parede celular, com algumas exceções. Eles obtêm seu alimento por absorção e não possuem clorofila. Enquanto muitos fungos são unicelulares, alguns são multicelulares e macroscópicos. Os fungos formam esporos, que são dispersos por correntes de ar. Todos esses fungos se caracterizam pela nutrição através da absorção e, com exceção das leveduras (que são geralmente unicelulares), a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas. As células móveis não são encontradas em fungos terrestres. A reprodução assexuada ocorre pelo brotamento, fragmentação e produção de esporangiósporos ou conídios. A reprodução sexuada neste grupo culmina na produção de zigósporos, ascósporos ou basidiósporos.

Conforme NEDER (1992), os fungos se reproduzem por meio de esporos. Em condições favoráveis, o esporo absorve água, aumenta de tamanho e germina emitindo um tubo germinal, que se alonga por crescimento da extremidade distal e se tornam filamentosos longos que se ramificam. Cada filamento é chamado *hifa*.

De acordo com o mesmo autor, ao continuar o crescimento, a hifa pode ser dividida em uma cadeia de células pela formação de paredes transversais ou septos. Esses septos dividem as hifas em células uninucleadas e multinucleadas. As hifas que são divididas por septo são chamadas hifas septadas. Alguns fungos, entretanto, não desenvolvem paredes celulares, formando as hifas não-septadas. Em tais hifas o protoplasma corre livremente através dos filamentos e, neste caso, são chamadas cenocíticas.

Continuando o crescimento, as hifas podem se ramificar diversas vezes e se entrelaçar, formando uma estrutura chamada micélio. A parte do micélio que penetra no substrato, digerindo-o e absorvendo-o, é conhecida como micélio vegetativo; a parte que é responsável pela produção de esporo e usualmente se estende para o ar é chamado micélio reprodutivo. O micélio reprodutivo e seus esporos variam grandemente nas diferentes espécies de fungos e servem para classificá-los e identificá-los. Como resultado do crescimento, uma colônia filamentosa é formada. O tipo de micélio encontrado na colônia filamentosa é de grande importância para distinguir a classe de fungo (NEDER, 1992).

A estrutura produtora de esporo é chamada esporóforo. Quando a extremidade terminal do esporóforo forma um saco, esse é chamado esporângio e o esporóforo de esporangióforo. Os esporos contidos em tais estruturas são denominados esporangiósporos. Quando os esporangiósporos estão maduros, o esporângio se rompe pela pressão interna ou é dissolvido por enzimas secretadas, e então os esporangiósporos são libertados (NEDER, 1992).

De acordo com o mesmo autor, quando os esporos não estão contidos dentro de membranas, isto é, nascem livres, o esporóforo é chamado conidióforo. O esporo recebe o nome de conídio. Os conídios variam bastante em tamanho, forma, cor, número de septos, bem como as células dos conidióforos que os originam.

2.4.1.1 Fungos do gênero *Aspergillus*

Conforme WAINWRIGHT (1995) existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia.

Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Os *Aspergillus* spp. pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Pertencem também ao grupo dos hyalohyphomycetes os quais formam esporos. Suas colônias podem

apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A taxa de crescimento destes fungos é rápida a moderadamente rápida, exceto no caso do *A. nidulans* e *A. glaucus*. Enquanto estes crescem devagar e formam colônias de 0,5 a 1,0 cm quando incubados a 25°C e num período de 7 dias em meio Czapek ágar, as demais espécies formam colônias de 1 a 9 cm de diâmetro (UCSF, 2000; McGinnis & Rex, 2002) citados por PRADO (2002).

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentosso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2000) citado por PRADO (2002), o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos (Figura 8). Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *A. niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000).

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos.

PANDEY *et al* (1999) relataram que o *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulasas, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase, protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação. Outros autores também descrevem produtos do *A. niger* como: α -amilase (BRUCHMANN, 1980; SMITH, 1991); amiloglucosidase ou glucoamilase (REED, 1975; BRUCHMANN, 1980; KNORR, 1987; WARD, 1989; SMITH, 1991; PANDEY & RADHAKRISHNAN, 1992; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996); pectinases, hemicelulasas, poligalacturonase (WARD, 1989); ácido cítrico; (WAINWRIGHT, 1995; PRADO, 2002; pectinases, proteases, celulasas, invertase, lactase, hemicelulase, glucose oxidase, catalase, ácido glucônico (SMITH, 1991; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995); pectina esterase, pectina liase (SMITH, 1991).

A Figura 5 mostra a cultura de *Aspergillus niger* LPB 28, produtor de enzimas observado em microscópio óptico.

FIGURA 5 – IMAGEM DE ESPORÂNGIOS DO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* OBTIDA POR MICROCULTIVO EM PDA VISTO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO 20X)



FORNTE: O AUTOR.
NOTA: Aumento de 20x.

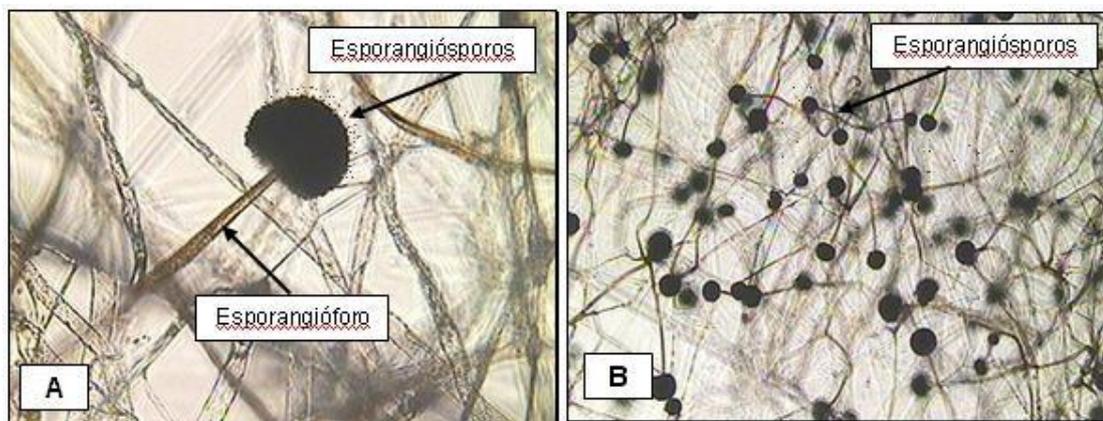
2.4.1.2 Fungos do gênero *Rhizopus*

O fungo do gênero *Rhizopus* pertence ao filo Eumycophyta. Fungos pertencentes a este gênero são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado que se chama micélio. O *Rhizopus* spp. pertence ao grupo dos ficomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta. Apresentam micélio ramificado e desorganizado, conforme mostra a Figura 10. O *Rhizopus* sp. pode ser encontrado no solo, em frutas e vegetais em decomposição, em fezes de animais e em pão velho. Apresentam melhor crescimento às temperaturas em torno de 45°C (EUA, 2004).

Estudos demonstraram que o fungo do gênero *Rhizopus* é utilizado para a produção de enzimas como a amiloglucosidase (REED, 1975; SMITH, 1991; SOCCOL, 1992; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996; SPIER *et al*, 2004); proteases ácidas (FELLOWS, 1994); ácido fumárico (SOCCOL, 1992) pectinases e lipases (WAINWRIGHT, 1995), na produção de tempeh, ácido L(+) láctico (SOCCOL, 1994).

A Figura 6 mostra a cultura de *Rhizopus formosa*, também produtora de enzimas amilolíticas, observada em microscópio óptico.

FIGURA 6 – IMAGEM DE ESPORÂNGIOS DO FUNGO *RHIZOPUS FORMOSA* OBTIDOS POR MICROCULTIVO EM PDA VISTO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO: (A) AUMENTO DE 20 X; (B) AUMENTO DE 10 X



FONTE: O AUTOR

FONTE: O AUTOR

2.5 MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS NA FES

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso do processo de fermentação sólida (FES), os substratos sólidos são constituídos basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos de origem agroindustrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES, 1992; COSTA, 1996).

PANDEY *et al* (1999) também citam que os resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para os processos em meio sólido (FES), não havendo exceções para o uso da fermentação no estado sólido na produção de enzimas. Vários substratos têm sido empregados para o cultivo de microrganismos para a produção de enzimas, tais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, casca de arroz, palha de trigo, bagaço de mandioca, farinha de trigo, farinha de mandioca, farinha de milho e amido.

O uso destes materiais agroindustriais deve-se ao fato de apresentarem as seguintes características: são recursos renováveis; sua produção depende de outra atividade produtiva, muitas vezes é um subproduto ou produto secundário; são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES, 1992).

Outra característica comum aos substratos utilizados em FES é sua necessidade de sofrer um tratamento físico e/ou químico prévio à fermentação, a fim de fornecer novas características físicas, principalmente o aumento da porosidade e da capacidade de retenção de água. Dentre estes pré-tratamentos, a redução de tamanho é a operação mais utilizada (ABRAHAM *et al*, 1989; ABRAHAM *et al*, 1987; LOPEZ-ULIBARRI *et al*, 1989; SANI *et al*, 1992; AMIN & ALLAH, 1992; SAUCEDO-CASTANEDA *et al*, 1992). Para o caso de materiais amiláceos, um pré-tratamento térmico é comum. O equilíbrio entre o aumento da porosidade (com o conseqüente aumento desejado da área de contato) e a possibilidade negativa da perda de textura é um dos grandes problemas a ser resolvido como conseqüência destes pré-tratamentos.

Em decorrência das características do processo, o conteúdo de água dos substratos para FES é limitado a pequenas quantidades. De acordo com LONSANE *et al* (1992), o teor de umidade ideal deve ser estabelecido, uma vez que valores acima ou abaixo do ótimo podem afetar, significativamente, a produtividade do processo.

PANDEY (1992) cita a importância do conteúdo adequado de umidade para cada processo, uma vez que a alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio e facilitando a contaminação por bactérias. Ao contrário, baixos níveis de umidade levam a um crescimento pobre e pequena acessibilidade ao nutriente. Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, o autor cita que altos valores para atividade de água (a_w) do meio favorecem a germinação de esporos ou o crescimento micelial, enquanto valores baixos de a_w estimulam a esporulação.

BEROVIC & LOGAR-DERENCIN (1993) observaram que conteúdos de umidade acima de 50% resultavam em menor produção de pectinase a partir de *Aspergillus niger* em meio sólido e que, a conteúdos abaixo de 38%, o tempo de fermentação era demasiadamente longo.

Com a perda de água do meio, decorrente da aeração forçada em reatores de coluna, manter a umidade do meio constitui um sério problema nos sistemas FES. SAUCEDO-CASTANEDA *et al* (1992) alertam para a importância do controle de umidade durante o curso da fermentação, citando o uso de um sistema integrado de controle de temperatura-umidade, no qual a vazão de aeração e um sistema de “*spray*” de água para repor umidade ao meio seriam controlados via computador. Os mesmos autores apontam a umidificação do ar, antes de sua alimentação no fermentador, como o método mais prático, eficiente e seguro de manter o valor da umidade dentro dos valores estipulados.

Sato *et al* (1982) citado por SOCCOL (1992) trabalhando com o crescimento de *Aspergillus oryzae* para a produção de amilases, conseguiram aumentar em duas vezes o consumo de oxigênio e, em três vezes a produção de esporos e enzimas pela adição de partículas de polpa de madeira úmida. As partículas de madeira, atuando como inerte, tiveram dupla finalidade: por um lado suprir a umidade ao meio que desidratava e, por outro, reduzir a densidade do meio, resultando em melhor aeração.

Diversos autores têm tratado de sistemas de FES, cujo substrato é absorvido em suportes inertes naturais (ORIOLE *et al*, 1988; SAUCEDO-CASTANEDA *et al*, 1992; HERNANDEZ *et al*, 1992) ou sintéticos (LARROCHE *et al*, 1986; AURIA *et al*, 1992), a fim de serem simplificados os pré-tratamentos.

2.5.1 Fécula de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), originária da América do Sul, é uma planta bastante cultivada em países de clima tropical. De acordo com PANDEY *et al* (2000) a cultura da mandioca é a sexta cultura mais importante do mundo e é básico para mais de 700 milhões de pessoas em muitos países.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, também conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. É cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (PANDEY *et al.*, 2000; PRADO, 2002). Em 2004, a produção nacional foi de 23,9 milhões de toneladas de mandioca segundo o IBGE e a previsão para 2005 é a colheita de 25 milhões de toneladas conforme estimativa da CONAB (PANDEY *et al.*, 2000; ABAM, 2004a)

Uma parte da produção é destinada à obtenção de farinha ou usada diretamente no consumo alimentar e o restante é destinado à industrialização, que consiste basicamente na extração de amido. O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca, participando com 12,7% do total. A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, assumindo destacada importância na alimentação humana e animal, além de ser utilizada como matéria-prima em vários produtos industriais.

De acordo com SURMELY *et al* (2003), o Brasil é um dos principais produtores mundiais de mandioca, com transformação industrial da raiz em farinha e fécula. Nos países europeus e nos Estados Unidos, mais de 50% da produção de amido é destinada à produção de hidrolisados como glicose, maltose, dextrinas e maltodextrinas. No Brasil, a *Corn Products* e a *Cargill*, duas multinacionais americanas, são as maiores produtoras de hidrolisados, e como as demais empresas mundiais do setor, utilizam apenas o amido de milho como matéria-prima.

Dentre os principais estados produtores destacam-se: Pará (17,9%), Bahia (16,7%), Paraná (14,5%), Rio Grande do Sul (5,6%) e Amazonas (4,3%), que em conjunto são responsáveis por 59% da produção do país. O consumo per capita mundial de mandioca e derivados em 1996 foi de 17,40 kg/hab/ano, enquanto o Brasil apresentou um valor de 50,60 kg/hab/ano (EMBRAPA, 2004).

A maior parte da mandioca de “mesa” é comercializada na forma *in natura*. A mandioca para a indústria tem uma grande variedade de usos, dos quais a farinha e a fécula são as mais importantes. A farinha tem essencialmente uso alimentar, que se encontra em duas formas: farinha temperada e não temperada (farofa). A fécula e seus produtos derivados têm competitividade crescente no mercado de produtos

amiláceos para a alimentação humana, ou como insumos em diversos ramos industriais tais como o de alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica (EMBRAPA, 2003).

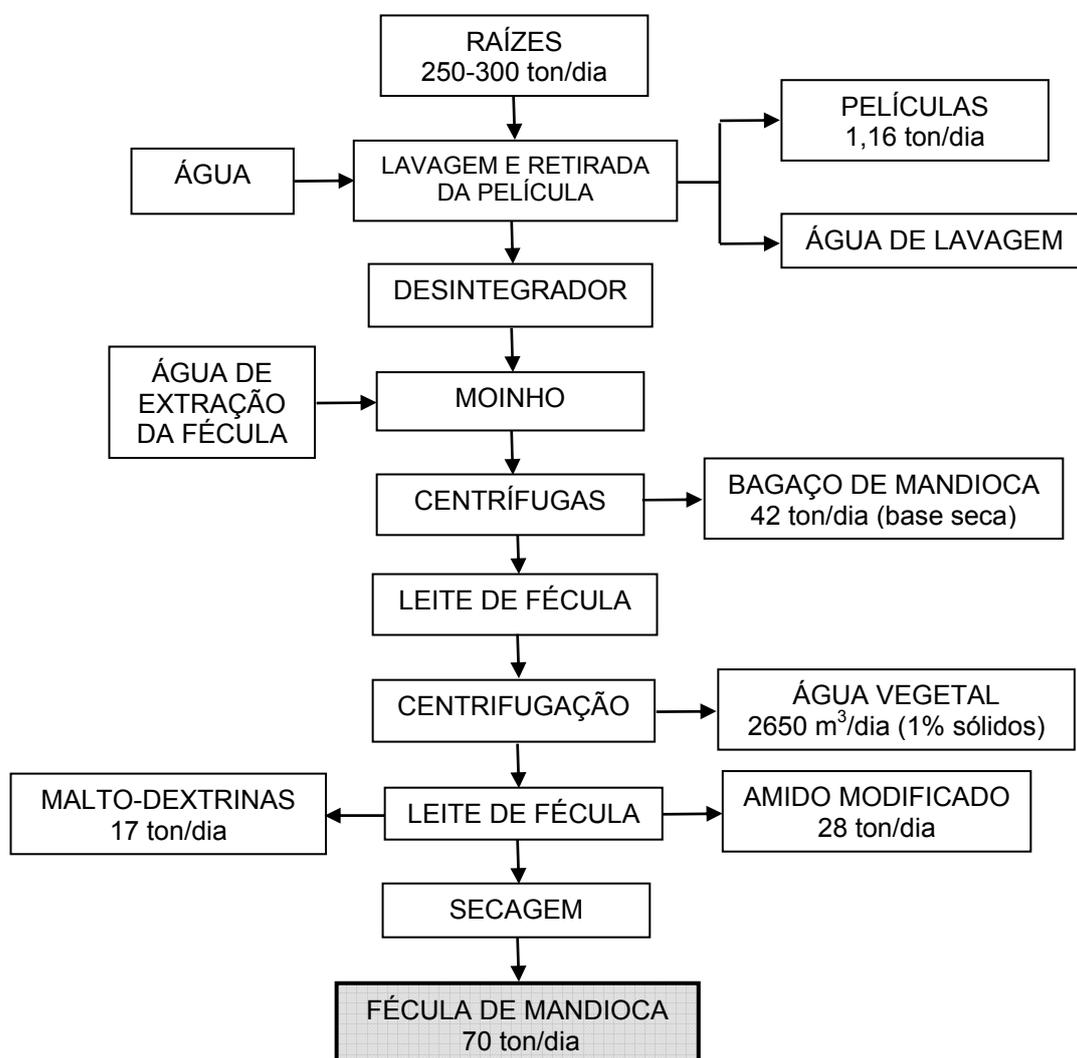
A legislação brasileira é uma das poucas do mundo a distinguir a fécula do amido. Nestas normas, considera-se amido a fração extraída da parte aérea das plantas e fécula é denominada a fração amilácea extraída de raízes, tubérculos e rizomas (LIMA, 2001).

Conforme citado por COELHO (2002), em tecnologia, a fécula é o amido de raízes e tubérculos, sendo que a fécula de mandioca é obtida a partir da mandioca lavada e descascada, ralada para a extração. O bagaço e o leite de fécula são separados, sendo o bagaço usado em ração animal e o leite purificado por decantação. A fécula é então embalada após a secagem. A produção de fécula de mandioca estima um aumento de 44% para 2004 (ABAM 2004b).

Desta forma, segundo CONN & STUMPF (1975), o amido é um polissacarídeo composto de dois componentes, onde 30% de seus grânulos se constituem de amilose e 70% de amilopectina. A fécula de mandioca apresenta uma variação na proporção de amilose e amilopectina quando comparada à composição geral do amido, possuindo 18-19% de amilose e 81-82% de amilopectina (COELHO, 2002); (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Geralmente, a amilose é composta de aproximadamente 1000 unidades de glicose e a amilopectina é composta de uma cadeia curta com ligações lineares (α -1,4) contendo de 10 a 60 unidades de glicose e um lado com uma cadeia contendo ligações α -1,6 com 15 a 45 unidades de glicose (SOCCOL *et al*, 2005).

A Figura 7 apresenta as etapas do processamento industrial da mandioca para a obtenção de fécula.

FIGURA 7 – ETAPAS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE FÉCULA

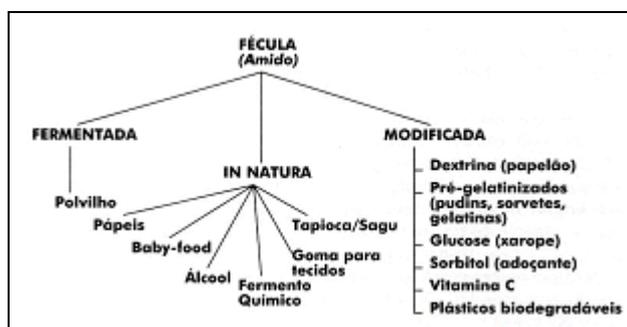


FONTE: (SOCCOL, 1992 ; PANDEY *et al.*, 2000; VANDENBERGHE, 2000).

Conforme SURMELY *et al* (2003), os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácidos, calor e pressão) ou por via enzimática. Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. Incluem desde dextrinas até os açúcares derivados de amido, passando pelas ciclodextrinas.

A Figura 8 apresenta as atuais aplicações da fécula de mandioca, desde a forma *in natura*, fermentada e modificada.

FIGURA 8 – ATUAIS APLICAÇÕES DA FÉCULA DE MANDIOCA



FONTE: EMBRAPA, 2003.

2.5.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, produzindo aproximadamente 24% do total produzido em aproximadamente quatro milhões de hectares (ha).

O bagaço da cana-de-açúcar é o resíduo sólido resultado da extração do caldo após esmagamento nas moendas, rico em conteúdo celular, que serve para fabricação de açúcar e álcool. Assim como qualquer outro resíduo, o bagaço da cana tem em sua composição química, os seguintes elementos:

- a) Celulose: A celulose é o composto químico orgânico que existe em maior abundância nas plantas e em toda a superfície terrestre;
- b) Lignina: O conteúdo nas plantas aumenta com a maturidade fisiológica. Está sempre relacionado com a indigestibilidade das fibras da dieta. Dependendo do grau de lignificação das paredes, dificulta o aproveitamento da celulose e hemicelulose;
- c) Hemicelulose: É passível de ser hidrolisada a pentoses (SOUZA, 2004).

O bagaço, resíduo lignocelulósico fibroso, remanescente dos colmos da cana-de-açúcar, obtém-se na saída do último moinho da usina açucareira e constitui um conjunto heterogêneo de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm. Nos últimos anos, nas usinas açucareiras, surgiu a tendência de aumentar o

grau de preparação da cana, com o objetivo de lhe extrair a maior quantidade de açúcar. De acordo com ABIPTI (1999), o bagaço de cana-de-açúcar é constituído por quatro frações, cuja percentagem média é apresentada na Tabela 2:

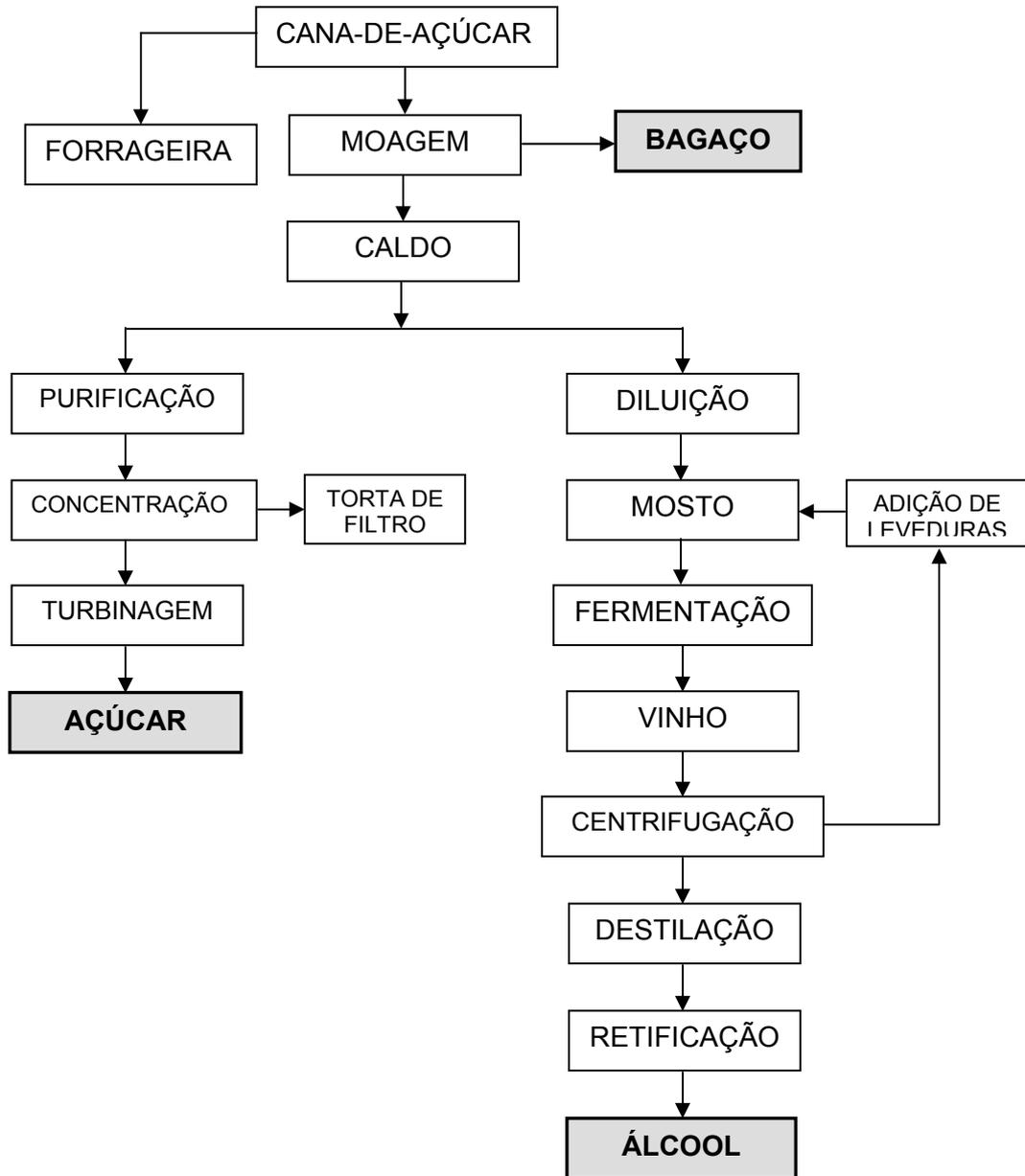
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO	%
<i>Fibra ou bagaço</i> : fração sólida orgânica insolúvel em água, composto de celulose, hemicelulose e lignina. Esta fração é portadora de elementos estruturais que permitem o uso do bagaço na indústria de derivados (produção de polpa, papel e produtos aglomerados; ração animal; combustível industrial)	45
<i>Sólidos insolúveis</i> : compostos orgânicos (terra, pedras e outras matérias estranhas) originários da colheita e do solo.	2-3
<i>Sólidos solúveis</i> : fração que se dissolve na água, composta por sacarose, não extraída na usina.	2-3
<i>Água</i> : retida no bagaço por mecanismos de adsorção e de capilaridade.	50

FONTE: ABIPTI, 1999.

A Figura 9 apresenta as etapas do processo de extração do caldo de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool, e a separação do bagaço após a moagem.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEPARAÇÃO DO BAGAÇO



FONTE: FUNDAÇÃO CARGILL , 1987.

2.6 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS

Após a produção de enzimas, é de suma importância o conhecimento dos processos de extração e purificação das proteínas, já que as enzimas são proteínas globulares. Existem diversos métodos utilizados para a separação de proteínas. LEHNINGER (1993) classifica os métodos da seguinte forma:

- a) Processos de separação baseados em peso molecular: diálise e ultrafiltração; centrifugação em gradiente de densidade; cromatografia de exclusão molecular;
- b) Processos de separação baseados nas diferenças de solubilidade: precipitação isoelétrica; solubilização e/ou precipitação das proteínas por salificação (*salting-in* e *salting-out*); fracionamento por solventes;
- c) Processos de separação baseados na carga elétrica da molécula;
- d) Separação de proteínas por adsorção seletiva;
- e) Separações baseadas na especificidade de ligantes: cromatografia por afinidade.

2.6.1 Precipitação de enzimas

O método de separação por precipitação de enzimas por salificação (*salting-out*) é um método acessível e de baixo custo. LEHNINGER (1993) descreve que nesse processo, os sais neutros têm efeitos pronunciados na precipitação das enzimas. Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas enzimas (proteínas), um fenômeno denominado solubilização por salificação (*salting-in*) (BELL *et al*, 1983); USA (2004a; 2004b). Por outro lado, à medida que a força iônica é aumentada, a solubilidade da proteína se reduz gradativamente. Em forças iônicas suficientemente elevadas, uma proteína pode ser quase completamente precipitada de sua solução, um efeito denominado precipitação por salificação (*salting-out*) (LEHNINGER, 1993; BELL *et al*, 1983).

Segundo os mesmos autores, são complexas as bases físico-químicas dessa precipitação. Um dos fatores é que a concentração elevada de sais pode remover a água de hidratação das moléculas protéicas que constituem as enzimas, reduzindo sua solubilidade. CHEFTEL *et al* (1989) explicam que esse efeito é resultado da

competição da enzima e do sal pelas moléculas de água necessárias para sua solubilização. Com alta concentração salina, não há moléculas de água suficientes para a solubilização da proteína, porque a maior parte da água está fortemente ligada ao sal. Nessas condições, as interações proteína-proteína são mais importantes que as interações proteína-água, resultando a uma agregação seguida de precipitação de moléculas protéicas.

CHEFTEL *et al* (1989) define que o processo *salting-out* ocorre quando as concentrações dos sais neutros são superiores a 1 M e a solubilidade das proteínas decresce resultando em sua precipitação.

Os íons da esquerda da série a seguir favorecem o processo *salting-out* enquanto os íons da direita favorecem o processo *salting-in* (CHEFTEL *et al*, 1989).



FONTE: CHEFTEL *et al*, 1989.

A solubilização e a precipitação por salificação são processos importantes para a separação de misturas protéicas, uma vez que proteínas diferentes variam quanto à sua resposta à concentração de sais neutros. Os precipitados protéicos resultantes da precipitação mantêm sua conformação nativa e podem ser dissolvidos novamente, sem haver desnaturação (LEHNINGER, 1993).

2.7 APLICAÇÕES DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS

2.7.1 Indústria de Detergentes e Produtos de Limpeza

Atualmente as enzimas constituem um dos ingredientes empregados na constituição dos detergentes. A principal vantagem da aplicação de enzimas em detergentes é a de proporcionar condições mais suaves de uso do que em detergentes que não contêm enzimas. Os recentes detergentes para lavadoras de louças automáticas eram muito fortes causando lesão quando ingerido e não eram compatíveis com os delicados jogos de prato e utensílios de cozinha. Isso induziu as indústrias de detergentes à pesquisa de soluções mais suaves e ao mesmo tempo eficientes (VAN EE, 1992; NOVOZYMES, 2004a,b).

Em função da presença de enzimas permitirem temperaturas mais baixas de lavagem, as α -amilases têm sido usadas em detergentes em pó para lavanderias desde 1975. Atualmente, 90% de todos os detergentes líquidos contêm α -amilase (KOTTWITZ *et al*, 1994) então a demanda por α -amilases para uso em detergentes em pó para lavanderias tem crescido nos últimos anos. Alguns tipos de α -amilases selvagens são sensíveis a oxidantes os quais geralmente são componentes da formulação de detergentes. A estabilidade contra os oxidantes em detergentes de uso doméstico foi alcançada pela utilização de estratégias bem sucedidas seguidas do uso com outras enzimas assim como as proteases.

Recentemente cientistas das duas maiores fabricantes de enzimas, *Novozymes* e *Genencore International* utilizam a engenharia protéica para melhorar a estabilidade das α -amilases em alvejantes (SVENDSEN, 1994; TIERNY *et al*, 1995; BISGAARD-FRANTZEN *et al*, 1995) citados por GUPTA *et al* (2003). Eles, independentemente, substituíram um aminoácido sensível à oxidação por outro aminoácido. A substituição corresponde à posição 197 por *leu* em amilase de *Bacillus licheniformis* obtendo uma amilase com maior resistência contra componentes oxidantes. Isso aperfeiçoou a estabilidade de oxidação resultando em melhor estabilidade de armazenamento e no desempenho das enzimas mutante em alvejantes contidos na formulação de detergentes. *Genencore International* e *Novozymes* introduziram estes novos produtos no mercado com os nomes *Purafect OxAm*® e *Duramyl*®, respectivamente.

2.7.2 Indústria Têxtil

Na indústria têxtil o uso de amilases para a quebra de amido é conhecido desde 1910 e serve para a eliminação, de gomas de amido ou gomas de derivados de amido ao invés do uso de oxidantes, ácidos ou bases, que danificam em maior proporção a celulose protegendo as fibras. As enzimas relevantes para o acabamento de têxteis têm origem bacteriana ou fúngica. Por exemplo, as α -amilases são empregadas na desengomagem de tecidos e na desengomagem de jeans (NOVOZYMES, 2004c), assim como são empregadas historicamente na limpeza de tecidos (TIMAR-BALÁZSY & EASTOP, 1998).

GUPTA *et al* (2003) citando HENDRIKSEN *et al* (1999), descrevem que no acabamento têxtil modernos processos de produção podem provocar deformações durante a tecelagem. O fio deve, por isso, ser prevenido de rompimento durante o processo. Por esse motivo, uma camada protetora removível é aplicada nas linhas e fios. O material mais comum é o amido, um produto atrativo, barato, facilmente disponível em várias regiões do mundo, e pode ser facilmente e completamente removível. O bom acabamento de tecidos ou roupas contendo a camada de amido é alcançado pela aplicação de α -amilases, as quais removem seletivamente a cobertura de amido e não atacam as fibras dos tecidos. As α -amilases também cindem o amido em dextrinas e maltoses que são solúveis em água e podem ser removidas pela lavagem (TIMAR-BALÁZSY & EASTOP, 1998).

2.7.3 Indústria de Papel e Celulose

O uso da α -amilase para a remoção da cobertura de amido usada no processamento de papel é descrito por TIMAR-BALÁZSY & EASTOP (1998) e NOVOZYMES (2004c). Como ocorre com os produtos têxteis, a cobertura do papel é feita para proteger o papel contra danos mecânicos durante o processamento além de melhorar a qualidade final do papel. De acordo com GUPTA *et al* (2003), na indústria de papel, a cobertura é feita com amido, que aumenta a resistência do papel como também melhora a apagabilidade. É adicionado ao papel por pressão, restando o amido pela passagem do papel por dois cilindros, formando um filme após a evaporação da água. A temperatura desse processo ocorre em torno de 45 e

60°C. Para a reprodutibilidade dos resultados nesse estágio, é importante que o filme de amido possua viscosidade constante, podendo ser variada de acordo com o tipo de papel. A viscosidade natural do amido é muito alta para a cobertura no papel, sendo ajustada pela parcial degradação do polímero com o emprego das α -amilases tanto em batelada como em processos contínuos. As condições dependem freqüentemente da fonte de amido e do uso da α -amilase (TOLAN, 1996).

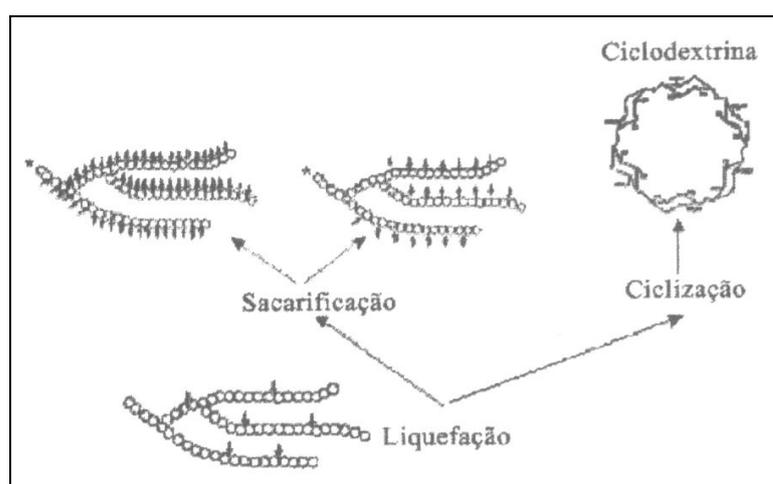
GUPTA *et al* (2003) também apresentam algumas amilases comerciais disponíveis para o uso na indústria de papel. São elas: *Amizyme*® (PMP *Fermentation Products*, Peoria, EUA), *Termamyl*®, *Fungamyl*, *BAN*® (*Novozymes*, Dinamarca) e α -amilase G9995 (*Enzyme Biosystems*, EUA).

2.7.4 Indústria de Alimentos

2.7.4.1 Liquefação e Sacarificação do Amido

A Figura 10 apresenta as possibilidades de modificação do amido por via enzimática. Na sacarificação do amido, a α -amilase atua na cadeia rompendo as ligações liberando em maior proporção dissacarídeos expressos em maltose. Por outro lado, a amiloglucosidase age sobre a cadeia liberando monossacarídeos (glicose).

FIGURA 10 – POSSIBILIDADES DE MODIFICAÇÃO DO AMIDO POR VIA ENZIMÁTICA



FONTE: ALVAREZ, 1997 CITADO POR SURMELY *et al*, 1997.
 NOTA: As setas representam os pontos de clivagem.

O maior mercado para a aplicação das α -amilases é na produção de amido hidrolisado na forma de glicose e a frutose. O amido é convertido em xaropes de milho com alto teor de frutose (HFCS ou *High Fructose Corn Syrups*). Por sua alta propriedade adoçante, a glicose e a frutose são usadas como adoçantes na indústria de bebidas carbonatadas (refrigerantes). O processo de liquefação do amido requer o uso de α -amilase juntamente com a glucoamilase que necessariamente devem apresentar elevada termoestabilidade. O uso destas enzimas na liquefação do amido tem sido amplamente estudado e comentado (WARD, 1989; PANDEY *et al*, 2000; VAN DER MAAREL *et al*, 2002) citados por GUPTA *et al* (2003).

2.7.4.2 Indústria de Panificação

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura do miolo de pães. O emprego de enzimas na preparação do pão pode retardar o processo de envelhecimento mantendo o pão “fresco” por mais tempo (NOVOZYMES, 2004). A α -amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglicosidase confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração (GRANOTEC, 2004); (NOVOZYMES, 2004).

De acordo com MYLNER (2004), as enzimas α e β -amilase atuam sobre a farinha de trigo, mais especificamente sobre as moléculas de amido. Essas enzimas aceleram o processo de fermentação, ocorrendo a hidrólise do amido gerando dextrinas, maltose e glicose. Dessa forma ocorre a redução da viscosidade da massa de pão, acelerando o processo de fermentação e conseqüentemente a liberação de gás carbônico, um dos metabólitos produzidos durante a fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como também em processos de fermentação natural (WANG, 1979; QUAGLIA, 1991; MYLNER, 2004; VAN DAN, 1992) citado por GUPTA (2003). Além das contribuições, essas enzimas aumentam o teor de açúcares na massa, proporcionando melhora do sabor, coloração da crosta do pão e melhora as características na etapa de assamento da massa. GUPTA *et al* (2003) salientam que alguns tipos de farinhas para panificação são suplementados com α -amilases, que também contribuem para prolongar a vida útil dos produtos panificáveis, pois diminuem o teor de amido no produto e como conseqüência diminuem o processo de retrogradação do amido.

Apesar de que a fonte principal da β -amilase é a farinha ou melhor, o extrato de malte (cevada ou trigo germinados), as α -amilases são produzidas atualmente por bactérias (*B. subtilis*) e por fungos do gênero *Aspergillus*. A α -amilase proveniente de fungos é a que apresenta melhor reação em pH levemente ácido (pH=5) enquanto a α -amilase bacteriana tem seu pH ótimo ao redor de 7,0. Como o pH das massas de panificação tem valor ao redor de 5,0, é observado que as amilases de origem fúngica são mais apropriadas para o uso em panificação (QUAGLIA, 1991).

2.7.4.3 Indústria de Cerveja

Durante a germinação da cevada para a produção de malte, que constitui um dos ingredientes para a produção de cerveja, são produzidas enzimas amilolíticas e proteolíticas, que são importantes durante a fermentação. As amilases degradam as frações de amilose e amilopectina do amido em uma mistura de maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e dextrinas, importantes para a fermentação da cerveja pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (REED, 1975; WAINWRIGHT, 1995).

As amilases fúngicas na indústria cervejeira convertem substratos amiláceos a açúcares antes da fermentação alcoólica. As amilases fúngicas além de controlarem a turbidez devido ao amido, são utilizadas na produção de cervejas livres de dextrinas (denominadas cervejas de baixa caloria ou cervejas *light*) (WAINWRIGHT, 1995). Conforme WARD (1989), nas cervejas tradicionais, de um terço a um quarto dos carboidratos do mosto se encontram na forma de dextrinas limite, que não fermentam e permanecem no produto final. Então a amiloglucosidase de *A. niger* hidrolisa essas dextrinas em açúcares fermentáveis, permitindo a obtenção de um mosto mais diluído, com menor conteúdo calórico produzindo o mesmo teor de álcool que a cerveja normal.

2.7.4.4 Alimentação Infantil

Outro mercado para as amilases é o processo de fabricação dos cereais para alimentação infantil, tais como farinha láctea (à base de trigo), mingau de milho, arroz e misturas de cereais. As amilases são adicionadas para diminuir a viscosidade da mistura de cereais durante o processo de pré-gelatinização facilitando o escoamento pela tubulação. De acordo com SURMELY *et al* (2003), a α -amilase é considerada uma enzima liquidificante, porque reduz drasticamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido. As amilases são inativadas com o aquecimento durante a etapa final do processo de secagem desses cereais, por isso são consideradas coadjuvantes tecnológicas de fabricação (ALLBRANS, 2004).

2.7.4.5 Alimentação Animal

As amilases também são empregadas para aumentar a digestibilidade das rações no sistema digestivo dos animais, diminuindo a quantidade de estrume e gases liberados ao meio ambiente bem como contribui para o desenvolvimento e crescimento dos animais, porque é possível a sua introdução na dieta logo após o desmame (NOVOZYMES, 2004). Os animais novos não dispõem de sistema digestivo capaz de digerir a ração animal, então enzimas como amilases são adicionadas na ração animal para auxiliar no metabolismo de carboidratos, assim como as proteases auxiliam no metabolismo protéico e as lipases, no metabolismo lipídico.

EDC (2004) complementa que alguns tipos de amilases são direcionadas para o uso em alimentação animal ou na agricultura, tendo como aplicações na produção de silagem, por exemplo. As enzimas são usadas como aditivos alimentares sendo que a escolha da enzima depende do tipo de ração e da espécie animal. Como exemplos podem ser citados os produtos enzimáticos produzidos nos EUA para aplicação em ração animal. Um dos produtos deriva dos fungos *A. oryzae* e *B. subtilis* combinando principalmente amilases, proteases e β -glucanases com outras enzimas, para aplicação em inoculantes de silagem, aditivos para compostagem e em ração animal. Outra enzima produzida é a α -amilase, derivada do fungo *Aspergillus* sp. disponível na forma líquida ou em pó.

Também oferecem produtos contendo amilases, proteases, lipases e celulasas para uso em compostagem, para assepsia de tanques e tratamentos de resíduos e efluentes (EDC, 2004).

2.7.4.6 Legislação sobre o Uso de Enzimas em Produtos Alimentícios

O Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova a utilização de enzimas na indústria de alimentos, considerando que o uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado. A ANVISA definiu que o limite de uso das enzimas deve ser em quantidade “*quantum satis*”, ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito desejado no alimento. A Tabela 3 apresenta as enzimas autorizadas para uso em alimentos.

TABELA 3 – ENZIMAS PERMITIDAS PARA USO EM ALIMENTOS CONFORME O DECRETO Nº 3.029 DA ANVISA

ENZIMAS DE ORIGEM ANIMAL	
ENZIMA	FONTE
Catalase	Fígado bovino
Lactoperoxidase	Leite bovino
Fosfolipase A2	Pâncreas suíno
Lisozima	Clara de ovos
Tripsina	Pâncreas bovino e suíno
ENZIMAS DE ORIGEM VEGETAL	
Lipoxigenase	Farinha de soja
Peroxidase	Raiz forte, farinha de soja, farinha de trigo
ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA	
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>
β -Glucanase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Humicola insolens</i> <i>Trichoderma reseei</i>
Celulase	<i>Trichoderma reseei</i>
Hemicelulase	<i>Trichoderma reseei</i>
Lactase	<i>Fluyveromyces lactis</i>
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i>
Transglutaminase	<i>Streptovercillum mobaraense</i>
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i>

FONTE: ANVISA, 2004.

2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

2.8.1 Planejamento Fatorial

É usado para estudar como certos fatores influenciam sobre uma determinada resposta, sendo de grande importância prática. Pode ser ampliado para resultar em outro planejamento mais sofisticado. Tal técnica consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis escolhidas requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Assim, para n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, e n_k do fator k, o planejamento terá no mínimo $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos e será chamado de fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. O planejamento em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis (superior + e inferior -) é o mais simples e mais utilizado dos fatoriais. O planejamento de dois níveis, havendo k variáveis em estudo, irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes. Tal planejamento é, assim, chamado de fatorial 2^k . Já o planejamento estudado em três níveis (-1, 0,+1) , onde k é o número de variáveis, é chamado de fatorial 3^k (BARROS-NETO *et al*, 1995).

2.8.2 Planejamento Fatorial Fracionário

O número de experimentos necessários para um planejamento fatorial completo 2^k aumenta, geometricamente, com k. Se k for grande, e os experimentos realizados forem de duração considerada, sua realização prática fica inviabilizada. O fato de poderem-se estimar todos os efeitos de um fatorial completo não implica que todos eles possuam magnitudes semelhantes. Assim, interações de ordem mais elevadas tendem a tornarem-se pequenas, podendo, muitas vezes, ser negligenciáveis. Além disso, quando um número relativamente grande de variáveis é escolhido para ser estudado, é comum acontecer de algumas não possuírem efeito global significativo, e as informações poderem ser obtidas pela realização de somente uma fração do fatorial. Havendo necessidade, o fatorial será completado pela realização de experimentos complementares (BARROS-NETO *et al*, 1995).

Por definição (KHURI & CORNELL, 1987), um fatorial fracionário 2^{k-m} é um planejamento que consiste de uma fração correspondente a $1/2^m$ do fatorial completo 2^k , onde “m” deve ser um número inteiro não negativo tal que $2^{k-m} \geq k+1$.

Como o número de ensaios não é completo, existe uma perda de informações e de precisão na análise dos resultados. Assim, as respostas obtidas não são valores dos efeitos isolados, mas sim mistura (“*confounded*”) deles (KHURI & CORNELL, 1987). Para analisar esta mistura de efeitos, BOX *et al* (1978) apresentaram o conceito de Resolução do Fracional: “um fracional de resolução R é aquele em que nenhum efeito de ordem p é misturado com qualquer outro efeito que possua ordem menor que R-p. Logo, para um fatorial de resolução IV (quatro) os efeitos principais (primeira ordem) não são confundidos com os de 2ª ordem, porém, os efeitos de 2ª ordem são confundidos com outros de segunda ordem”.

2.8.3 Análise por Metodologia de Superfície de Resposta

BOX *et al* (1978) definem a metodologia por superfície de resposta como um grupo de técnicas usadas no estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas com as variáveis de entrada que deram origem às respostas. Também conhecida por RSM (*Response Surface Methodology*), é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G.E.P Box na década de 1950, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS-NETO *et al*, 1995).

De acordo com o mesmo autor, a metodologia de superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

KHURI & CORNELL (1987), por sua vez, apontam que este grupo de técnicas possibilita:

- a) Escolher uma série de experimentos que produzam medidas confiáveis e adequadas da resposta de interesse;
- b) Determinar um modelo matemático que melhor se adapte aos dados coletados;
- c) Determinar as condições ótimas para que as variáveis produzam um máximo (ou mínimo) valor na resposta.

Os estudos usando superfície de resposta são, por natureza, seqüenciais. Desta forma, as informações adquiridas em uma série de experimentos servem para planejar a série seguinte.

Segundo KHURI & CORNELL (1987), o processo começa com a hipótese a respeito de quais fatores influenciam uma resposta de interesse particular. Isto leva ao planejamento de experimentos que forneçam dois tipos de informações: quais fatores dentre os escolhidos são realmente importantes para ser estudados e quais podem ser eliminados por não terem uma influência significativa na resposta estudada. Os experimentos são realizados e os resultados podem levar a novas hipóteses. Um segundo grupo de experimentos é concebido e conhecimentos adicionais são adquiridos a respeito de como os fatores influenciam na resposta. Num terceiro e, em geral, definitivo estágio, a resposta ao porque dos fatores serem importantes e um conhecimento global do sistema são geralmente obtidos. Assim, o planejamento e a análise dos dados obtidos na metodologia por superfície de resposta podem levar ao conhecimento de quais fatores são importantes, que papel cada fator exerce sobre o sistema e porque da importância desses fatores.

Uma das grandes vantagens da metodologia por superfície de resposta é o fato de ela poder ser finalizada, a qualquer tempo, sem experimentações futuras que pareçam improdutivas ou antieconômicas (CORNELL, 1990).

Diversos são os planejamentos que podem ser usados para montar a série de experimentos adicionais que possibilite o cálculo dos coeficientes. BOX & WILSON citados por KHURI e CORNELL (1987) criaram o chamado Planejamento Composto Central. Tal planejamento consiste de um fatorial completo 2^k , replicatas no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável a uma distância $\pm \alpha$ do ponto central.

ZANGIROLAMI (1992), citando BOX *et al* (1978), indica que a avaliação estatística, a respeito dos modelos empíricos obtidos que apresentam ou não um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, pode ser feito utilizando-se o coeficiente de correlação e o teste F. Quanto mais próximo o coeficiente de correlação estiver de 1,0 (correlação perfeita), melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F de significância consiste em verificar se os modelos propostos explicam uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, realizada pela comparação do valor F estimado a partir dos resultados da equação (1) com o tabelado para uma distribuição de referência $F_{\alpha, p-1, N-p}$. Para o modelo ser considerado válido, o valor de F calculado deve ser superior ao tabelado (RODRIGUES, 1993).

$$F = \frac{SQR/(p-1)}{SQE/(N-P)} \quad (1)$$

Onde:

SQR = soma dos quadrados devido à regressão;

SQE = soma dos quadrados devido ao erro;

p-1 = graus de liberdade associado a SQR;

N-p = graus de liberdade associado a SQE.

Os tratamentos estatísticos dos dados citados anteriormente, em conjunto recebem o nome de análise de variância (ANOVA).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) e nas instalações do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

3.1 PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FES

3.1.1 Microrganismos

A primeira etapa do trabalho de pesquisa foi definir quais cepas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e *Aspergillus* eram potenciais produtores de enzimas α -amilase e amiloglucosidase. Para isso foram utilizadas cepas de *Rhizopus* spp. e *Aspergillus* spp. disponíveis no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná originalmente provenientes de bancos de cultura internacionais, tais como:

- NRRL (Northern Regional Research Laboratory), U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA;
- MUCL (Mycothèque de Université Catholique de Louvain), Bélgica;
- ATCC (American Type Culture Collection), Rocckeville, Maryland, USA.

3.1.1.1 Relação das cepas estudadas

As cepas de fungos do gênero *Rhizopus* e *Aspergillus* disponíveis na Micoteca do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e de Biotecnologia Industrial provenientes dos bancos de culturas internacionais descritos anteriormente que foram testadas nesse estudo estão descritas na Tabela 4 e Tabela 5 respectivamente.

TABELA 4 - CEPAS DE FUNGOS DO GÊNERO *RHIZOPUS*

CÓDIGO	DESCRIÇÃO DA CEPA
LPB 267	<i>Rhizopus oligosporos</i>
LPB 472	<i>Rhizopus delemar</i>
LPB 582	<i>Rhizopus arrhizus</i>
LPB 627	<i>Rhizopus oryzae</i>
LPB 422	<i>Rhizopus formosa</i>
LPB 425	<i>Rhizopus arrhizus</i>
LPB 612	<i>Rhizopus delemar</i>
LPB 975	<i>Rhizopus</i> sp.
LPB 168	<i>Rhizopus oryzae</i>
LPB 475	<i>Rhizopus circicans</i>
LPB 179	<i>Rhizopus arrhizus</i>
LPB 395	<i>Rhizopus oryzae</i>

FONTE: UFPR - Laboratório de Eng^a. de Bioprocessos e de Biotecnologia Industrial, 2003.

TABELA 5 - CEPAS DOS FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*

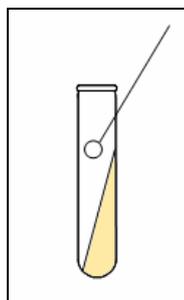
CÓDIGO	DESCRIÇÃO DA CEPA
LPB 99	<i>Aspergillus niger</i>
LPB 34	<i>Aspergillus niger</i>
LPB 28	<i>Aspergillus niger</i>
LPB 21	<i>Aspergillus niger</i>
LPB 12	<i>Aspergillus niger</i>
W 12	<i>Aspergillus niger</i>
IZ9	<i>Aspergillus niger</i>

FONTE: UFPR - Laboratório de Eng^a. de Bioprocessos e de Biotecnologia Industrial, 2003.

3.1.1.2 Conservação das cepas

O método utilizado para a conservação das cepas foi repicagem em ágar dextrose batata (PDA) marca BIOBRÁS. Após preparo do meio diluindo-o em água destilada, foi ajustado o pH do meio a 5,8. O meio foi distribuído em tubos de 20 ml a razão de 10 ml por tubo, autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi solidificado dentro dos tubos em posição inclinada conforme mostra a Figura 11. Os tubos inoculados foram incubados a 30°C por 10 dias (*Rhizopus*) e 8 dias (*Aspergillus*) e posteriormente conservados a 4°C por até 3 meses.

FIGURA 15 – TUBO CONTENDO MEIO PDA INCLINADO PARA REPICAGEM DAS CEPAS



FONTE: O AUTOR

3.1.1.3 Inoculação

O inóculo usado para o *screening* das cepas bem como as inoculações das fermentações para a produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase foram feitas utilizando-se uma suspensão de esporangiósporos (solução de esporos) na concentração de 10^6 a 10^8 esporos / ml preparadas conforme o item 3.1.1.4. As concentrações da suspensão de esporos estudadas foram: $1,0 \times 10^7$, $5,5 \times 10^7$ e $1,0$

x 10^8 esporos / g fécula de mandioca, a fim de verificar a melhor taxa de inoculação para a máxima produção das enzimas.

3.1.1.4 Preparo da solução de esporos de *Aspergillus*

Os esporos dos fungos do gênero *Aspergillus* foram produzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio PDA. O meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Depois de resfriado (45-55°C) o meio foi inoculado em superfície a partir de uma cepa repicada, incubada por 8 dias à 30°C até completa esporulação conforme SOCCOL (1992); COSTA (1996) e PRADO (2002).

Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 30 ml de água destilada estéril contendo 0,2% de Tween 80 e pérolas de vidro (COSTA, 1996; PRADO, 2002). A solução adicionada sobre os esporos foi mantida sob agitação por 15 minutos. A suspensão obtida foi conservada a 4°C por até 30 dias.

3.1.1.5 Preparo da solução de esporos de *Rhizopus*

Após a distribuição e solidificação do PDA esterilizado em placas de Petri previamente esterilizadas, procedeu-se a semeadura das cepas nas placas que posteriormente foram incubadas a 30°C por 10 dias.

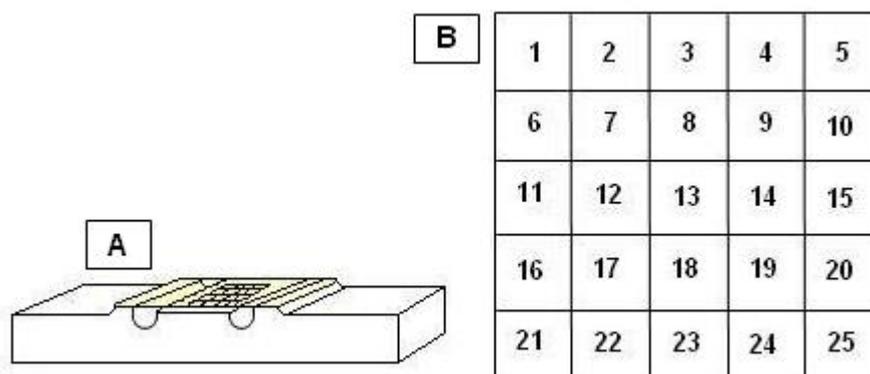
Após este período, a biomassa de fungo formada (micélio) na superfície do meio contido na placa foi totalmente retirada com auxílio de uma alça de platina, adicionando-a em tubos contendo 30 ml de água deionizada estéril, 0,2% de Tween 80 e pérolas de vidro, que foram agitados por 15 minutos.

3.1.1.6 Contagem de esporos de *Aspergillus* e *Rhizopus*

A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer (Raimbault & Alazard, 1981) citado por COSTA (1996) também realizada por SOCCOL *et al* (1995); PRADO (2002); TUNGA & TUNGA (2003). Para a contagem, foram preparadas diluições sucessivas da suspensão de esporos e adicionada sobre a Câmara de Neubauer, mostrada na Figura 12 (A), com uma pipeta de Pasteur. Foram contados todos os esporos presentes nos quadrículos ímpares, conforme a Figura 12 (B). A contagem foi realizada em triplicata para cada diluição preparada e os cálculos são mostrados no

Anexo 1. A contagem de esporos é válida quando sua quantidade atingir entre 10 e 30 unidades por quadrículo (VANDENBERGHE, 2000)

FIGURA 12 – CÂMARA DE NEUBAUER (A) e QUADRÍCULOS (B) PARA A CONTAGEM DOS ESPOROS



FONTE: O AUTOR.

O resultado foi obtido usando a equação (2) e expresso em número de esporos por ml de suspensão.

$$N = \frac{n_e \cdot F}{n_q \cdot V_q} \quad (2)$$

Onde:

F = fator de diluição (inverso da diluição);

N = número de esporos por ml de suspensão (esporos/ml);

n_e = número total de esporos contados;

n_q = número de quadrículos contados;

V_q = volume do quadrículo: 4×10^{-6} ml

3.1.1.7 Seleção das cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus*

Para a seleção das cepas produtoras de α -amilase e amiloglucosidase, foram realizados *screenings* observando-se o crescimento radial das cepas em meio ágar fécula de mandioca conforme composição mostrada na Tabela 6 sugerida para esse presente trabalho.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DO MEIO ÁGAR FÉCULA DE MANDIOCA UTILIZADO NO CRESCIMENTO RADIAL

COMPONENTES	QUANTIDADE (g/l)
Fécula de mandioca (polvilho doce)	20,0
Farelo de soja desengordurado moído em pó	2,0
Agar-ágar	15,0

O pH do meio foi ajustado para pH 6,8 e então autoclavado a 121°C por 15 minutos. Distribuiu-se 15 ml do meio em placas de Petry mantendo-as em repouso até a completa solidificação do meio. No centro de cada placa foi adicionada uma gota da solução de esporos (10^7 a 10^8 esporos/ml) da cepa, com o auxílio da pipeta de Pasteur, e posteriormente incubadas a 30-32°C. Mediu-se o crescimento radial (mm), que representa o diâmetro do halo de crescimento do fungo, com auxílio de um paquímetro em intervalos de quatro horas até o completo crescimento do micélio nas placas. Um gráfico de coluna Crescimento radial (mm) x Tempo (h) foi construído para avaliar o comportamento das cepas de *Rhizopus* e outro para a avaliação das cepas de *Aspergillus*. O critério utilizado para a escolha das cepas foi a velocidade de crescimento no meio ágar fécula de mandioca, ou seja, quais cepas atingiram primeiramente o crescimento de seu micélio ocupando o diâmetro total da placa de Petry.

Posteriormente foi realizada uma segunda seleção das cepas que atingiram maior velocidade de crescimento comparando a produção das enzimas por FES em frascos erlenmeyer.

3.1.2 COMPOSIÇÃO DA FERMENTAÇÃO FES

3.1.2.1 Substrato

O substrato utilizado foi a fécula de mandioca, conhecida tradicionalmente por polvilho doce. Nesse estudo foi utilizado polvilho doce da marca YOKI, sendo que a quantidade desse substrato no meio foi otimizada a fim de se obter uma máxima produção das enzimas α -amilase e amiloglicosidase.

3.1.2.2 Suporte

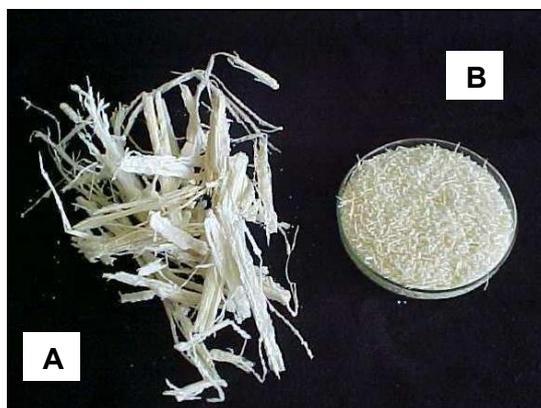
O suporte utilizado nesse estudo foi o bagaço de cana-de-açúcar, coletado em pontos de venda de caldo de cana-de-açúcar na cidade de Curitiba. As coletas foram feitas em diferentes pontos sendo utilizada a mistura dessas coletas. A mistura de bagaço de cana coletado foi preparada para utilização na FES como suporte inerte, conforme descrito no item 3.1.2.2.1. A quantidade de suporte nas fermentações foi otimizada, testando-se diferentes proporções entre a fécula de mandioca e o bagaço de cana-de-açúcar.

3.1.2.2.1 Pré-tratamento do suporte (bagaço de cana-de-açúcar)

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi o resíduo sólido da extração do caldo da cana. O bagaço foi submetido a sucessivas lavagens em água corrente para a retirada de açúcares. Posteriormente manteve-se o bagaço submerso em água morna para facilitar a retirada do residual de açúcares e em seguida lavou-se em água corrente para a garantia da remoção de todo o açúcar residual.

O bagaço lavado foi secado em estufa de bandeja com circulação de ar a 65°C durante 24 horas. Após desidratado foi embalado em saco de polietileno e estocado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e de Biotecnologia Industrial para ser utilizado neste trabalho. Para utilização, o bagaço de cana foi moído em moinho elétrico e posteriormente o material moído foi classificado em peneiras de acordo com a sua granulometria: fração grossa [maior que 2,0 mm (reprocessada)]; fração média: entre 0,8 e 2,0 mm (usada como suporte nas fermentações); fração fina: menor que 0,8 mm (descartada). O suporte moído e peneirado proporciona melhor porosidade e absorção para facilitar a oxigenação e transporte de nutrientes, conforme George (1993) e Kukreja *et al* (1986) citados por MOHAN (2001). A Figura 13 mostra o bagaço de cana-de-açúcar desidratado (A) e moído com granulometria padronizada em fração média (0,8 – 2,0 mm) (B):

FIGURA 13 – BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (SUPORTE) LAVADO E DESIDRATADO (A) E PRONTO PARA USO NA FES (MOÍDO COM GRANULOMETRIA PADRONIZADA (B)).



FONTE: O AUTOR.

3.1.2.3 Nutrientes das fermentações

3.1.2.3.1 Solução Salina

A solução salina usada nas fermentações possuía a seguinte composição: biotina (5,0 ml/l a $2 \times 10^{-4}\%$); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,4 g/l); MgSO_4 (2,5 g/l); KH_2PO_4 (1,5 g/l); água q.s.p 1000 ml de acordo com SOCCOL (1992). Após o preparo a solução foi esterilizada a 121°C por 15 minutos. A porcentagem da solução salina foi variada e a porcentagem definida foi calculada em relação à quantidade de substrato adicionado (fécula de mandioca).

3.1.2.3.2 Fonte de cálcio e nitrogênio

Além da solução salina, outros nutrientes foram adicionados para o enriquecimento das fermentações, tais como: carbonato de cálcio (CaCO_3) e nitrato de potássio (KNO_3), fonte de nitrogênio inorgânico, em diferentes porcentagens para avaliar a influência desses elementos na produção das enzimas α -amilase e amiloglicosidase. Também foram realizados testes de FES com fonte de nitrogênio orgânico (uréia). Salienta-se que as porcentagens desses nutrientes foram calculadas em relação à quantidade de fécula de mandioca (substrato) adicionada no meio de fermentação.

3.1.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO E DO SUPORTE

Com o objetivo de determinar as características físico-químicas do bagaço de cana-de-açúcar e da fécula de mandioca (polvilho doce marca YOKI), foram determinados os teores de umidade, teor de cinzas, proteínas, lipídeos, fibras e carboidratos, além do teor de amido, conforme observado na Tabela 7:

TABELA 7 – MÉTODOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO E SUPORTE DAS FERMENTAÇÕES

DETERMINAÇÃO	DESCRIÇÃO	MÉTODO
Umidade	Método termogravimétrico, usando estufa a 105°C durante 24 horas	AACC N° 44-20 (1983)
Cinzas	Método termogravimétrico, após calcinação do material em mufla a 660°C por 24 horas.	
Lipídeos	Determinado por gravimetria após extração com acetato de etila, refluxado por duas horas em extrator Soxhlet.	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz (1985)
Fibras	Método gravimétrico	
Proteínas	Fração protéica determinada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl	
Carboidratos	Método da diferença de 100 (subtraindo o teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade)	
Amido	Método enzimático	<i>National Starch Chemical Corporation (1985)</i>

3.1.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

Na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, foram utilizados dois tipos de fermentação sólida: fermentação em frascos Erlenmeyer e fermentação em bandejas, onde ocorre aeração por difusão ou aeração natural.

3.1.4.1 Fermentação em frascos Erlenmeyer

O bagaço de cana-de-açúcar (suporte) foi esterilizado individualmente em frascos Erlenmeyer de 250 ml. O substrato (fécula de mandioca), a água, a solução salina, o CaCO_3 e o KNO_3 foram misturados em outro recipiente de vidro de modo a obter uma umidade inicial em torno de 90%, ajustando-se o pH, para posteriormente serem esterilizados a 121°C por 15 minutos para ocorrer a gelatinização da fécula. Essa mistura foi inoculada com a suspensão de esporos a uma taxa de 10^7 esporos/g MS. Após ser homogeneizado e misturado no Erlenmeyer contendo o bagaço, foi incubado à temperatura de 30°C durante 48 horas. A Figura 14 mostra uma FES conduzida em frasco Erlenmeyer.

FIGURA 14 – FES EM FRASCO ERLENMEYER



FONTE: O AUTOR.

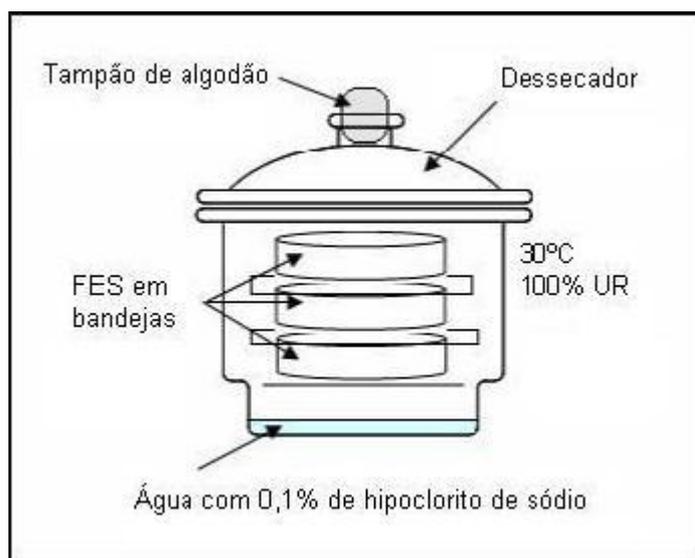
3.1.4.2 Fermentação em Bandejas

As fermentações FES de bagaço de cana e fécula de mandioca por *Rhizopus* e *Aspergillus* foram conduzidas em bandejas colocadas dentro de um dessecador com umidade saturada (UR=100%), incubado em uma estufa com circulação de ar a 30°C durante 48 horas. Para cada fermentação, foram sobrepostas três bandejas, cujas laterais são feitas de PEAD (polietileno de alta densidade) e seu fundo constituído de tela de nylon com aberturas de aproximadamente 0,2 mm.

Para serem utilizadas nas fermentações, as bandejas foram lavadas e mantidas em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 1 hora. Posteriormente mantidas no fluxo laminar para a secagem natural em ambiente estéril.

O suporte pré-tratado foi impregnado com a fécula pré-gelatinizada contendo os nutrientes de modo a obter uma umidade inicial de 90%. O pH foi ajustado e inoculado a uma taxa de 10^7 esporos/g MS com uma suspensão de esporos. Depois de homogeneizado, o substrato foi distribuído nas bandejas de modo a obter uma espessura de 2 cm. Na Figura 15 apresenta-se um esquema da FES conduzida em bandejas.

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DA FES DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FÉCULA DE MANDIOCA POR FUNGOS EM BANDEJAS COM ATMOSFERA SATURADA



FONTE: O AUTOR.

3.1.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)

A fermentação submersa ou líquida, foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 ml em duas condições: sob agitação e em repouso.

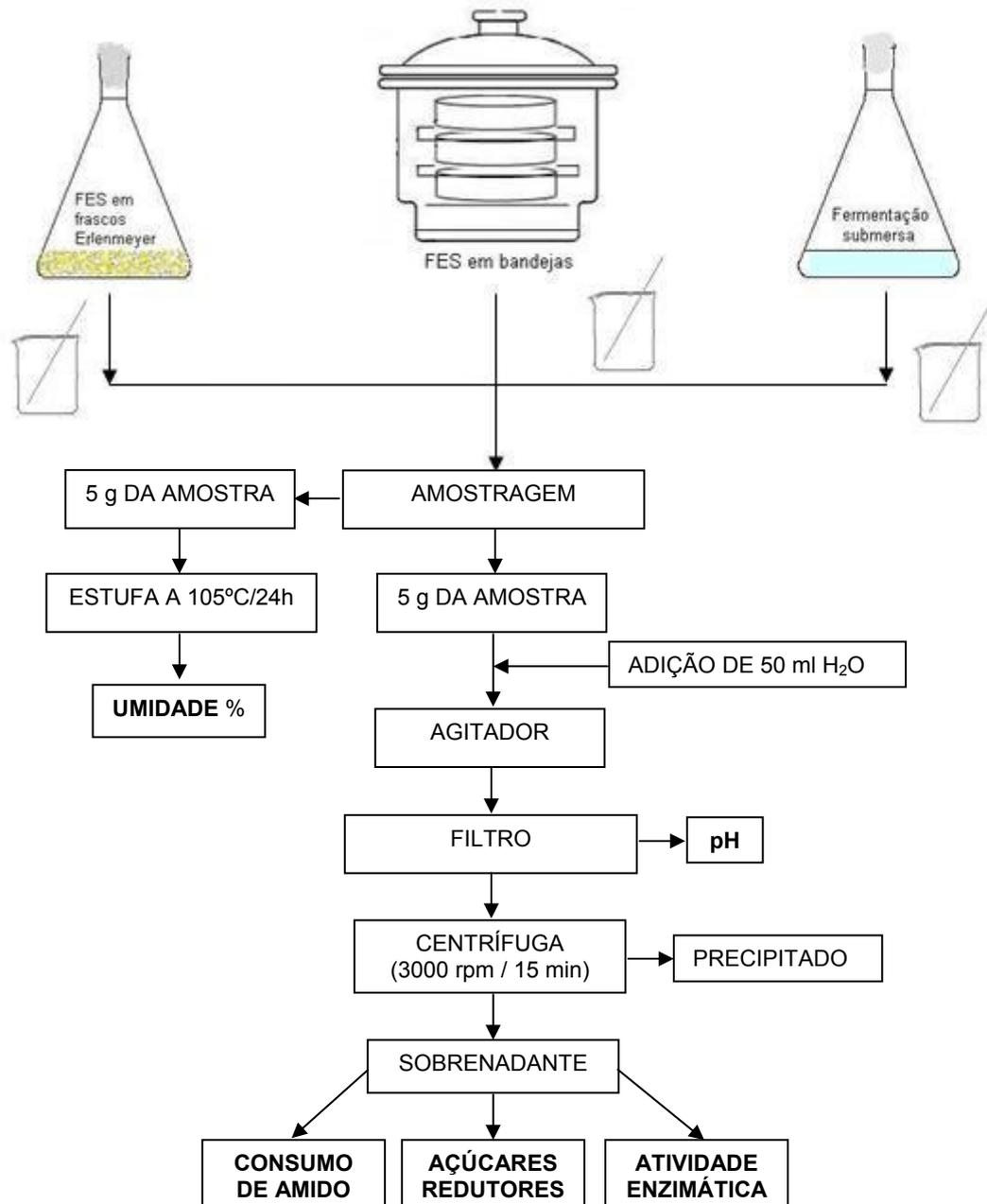
A fermentação submersa sob agitação foi realizada em agitador do tipo *shaker* em velocidade de 120 rpm, a 30°C durante 48 horas, enquanto a fermentação em repouso observou as mesmas condições químicas e físicas porém permaneceu em repouso em estufa, também a 30°C durante 48 horas. O volume de fermentação utilizado foi 20% da capacidade volumétrica do frasco Erlenmeyer. Cabe ressaltar que na FSm foi dispensado o uso do bagaço de cana-de-açúcar, já que este desempenhava o papel de suporte inerte das FES. Os componentes da fermentação submersa foram: fécula de mandioca, CaCO₃, KNO₃, solução salina, água deionizada e o inóculo, que foi adicionado após a esterilização do meio.

3.1.6 ANÁLISE DO SUBSTRATO FERMENTADO

Inicialmente foram retiradas 5 g de amostra, a qual permaneceu em estufa a 105°C durante 24 horas para a determinação da umidade do meio fermentado. Também foram separadas 5 g de amostra a qual foi misturada a 50 ml de água deionizada. Esta suspensão permaneceu sob agitação contínua durante 30 minutos. Em seguida foi filtrada para a remoção dos sólidos obtendo-se um extrato claro, usado para a determinação de pH. O extrato obtido foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e a atividade enzimática.

A Figura 16 mostra as etapas do preparo do substrato fermentado para posteriormente ser realizada a determinação da atividade enzimática da α -amilase e da amiloglucosidase.

FIGURA 16 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DO SUBSTRATO FERMENTADO



3.1.6.1 Umidade

O substrato fermentado (± 5 g) foi pesado em cadinho de porcelana e seco durante 24 h em uma estufa a 105°C , em seguida resfriados dentro de um dessecador contendo silicagel; após pesados, a matéria seca foi calculada com auxílio da equação 3.

$$\boxed{\text{Peso seco} = \frac{A \times 100}{P}} \quad (3)$$

Onde:

A = peso da amostra seca (g);
P = peso inicial da amostra (g).

3.1.6.2 pH

O pH foi medido sobre uma suspensão obtida após homogeneização de 5 g de fermentado em 50 ml de água destilada a qual permaneceu em agitação contínua durante 30 minutos.

3.1.6.3 Dosagem de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico "DNS" (SOCCOL, 1992). Em meio básico e a temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico passa a 3-amino-5-nitrosalicílico. Desenvolve-se uma coloração amarelo café que absorve a 540 nm.

3.1.6.3.1 Preparo do reativo DNS

Dissolveu-se por aquecimento 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 ml de NaOH a 2 N. Separadamente dissolveu-se também com aquecimento, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 ml de água destilada. As duas soluções foram misturadas e completou-se o volume para 500 ml com água destilada. Conservou-se em temperatura de refrigeração em embalagem de vidro âmbar envolvida em papel alumínio.

Para dosagem, as amostras foram diluídas de modo a se obter um teor equivalente em glucose inferior a 1 g/l. Adicionar 0,5 ml da amostra convenientemente diluída a 0,5 ml do reativo DNS. Adicionar 2 ml de água destilada. Homogeneizar. Elaborar uma reta padrão a partir de uma solução de glucose com concentração inferior a 1 g/l e ler à 540 nm. Medir a densidade ótica das amostras nesse mesmo comprimento de onda. Os teores em glucose – equivalente (g/l) são obtidos por projeção sobre a reta padrão.

3.1.6.4 Dosagem do amido

Trata-se de um método colorimétrico baseado na coloração azul desenvolvida quando da formação do complexo amido-iodo conforme SOCCOL (1992). O reativo iodo-iodeto é preparado por diluição a 4% da seguinte solução de base: KI 30g/l e I₂ 3g/l. A reação colorida é obtida adicionando-se 0,3 ml da amostra convenientemente diluída a 7,2 ml desse reativo (quantidade suficiente para a leitura no espectrofotômetro). A reta padrão atinge uma concentração de 10 g/l de amido solúvel de mandioca marca SYNTH. A densidade ótica é lida a 620 nm.

3.1.6.5 Dosagem de atividade amilásica

3.1.6.5.1 α -amilase

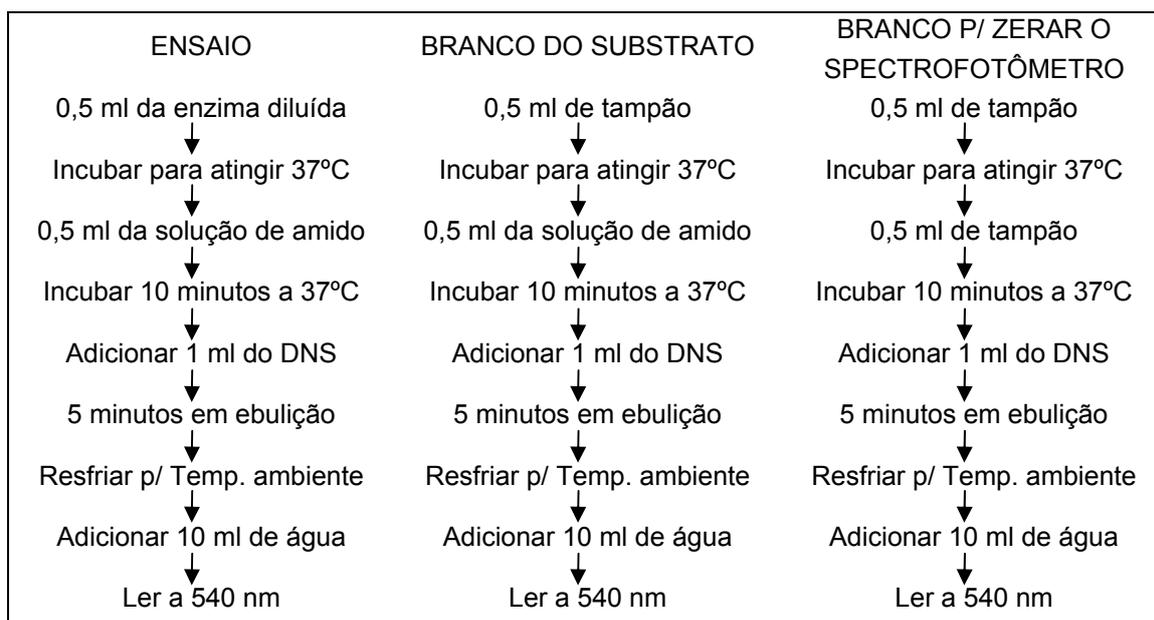
A atividade da α -amilase foi medida a partir do sobrenadante obtido segundo roteiro da Figura 21. Adicionou-se em tubos 0,2 ml do sobrenadante e 1,6 ml de uma solução de amido de mandioca solúvel a uma concentração de 10 g/l, tamponado em pH 6,5 com auxílio de fosfato 1/15M, seja KH₂PO₄: 6,389 g/l e Na₂HPO₄.2H₂O: 3,1595 g/l (SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al*, 1991). A incubação foi conduzida a 40°C por diferentes tempos: 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de NaOH 1N. A atividade da α -amilase é determinada medindo a concentração de amido pela dosagem de iodo. Uma unidade de α -amilase é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos dentro das condições descritas por Oteng-Gyang (1979) citado por SOCCOL (1992) também descrito por PANDEY *et al* (2005). Os cálculos para a determinação da atividade da α -amilase são apresentados no ANEXO 2.

3.1.6.5.2 Amiloglucosidase

A atividade amiloglucosidase é determinada pela através da liberação de açúcares redutores, dosados pelo método DNS (Miller, 1959) citado por COSTA (1996), descrito por SOCCOL (1992) e por PANDEY *et al* (2005). Os açúcares são expressos em glucose equivalente. Uma unidade de amiloglucosidase é definida como sendo a quantidade de enzima liberada por 1 μmol de açúcar redutor (expresso como glucose) por minuto nas condições de ensaio (Alazard & Raimbault, 1981) citado por SOCCOL (1992).

A atividade da amiloglucosidase foi determinada a partir do sobrenadante (Figura 16) seguindo os passos descritos na Figura 17:

FIGURA 17 - SEQÜÊNCIA DOS PASSOS PARA A DOSAGEM DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE



NOTA: Temp.=Temperatura (°C)

Os cálculos para a determinação da atividade da amiloglucosidase são apresentados no ANEXO 3.

3.1.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES

Após a seleção das cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus* capazes de produzir maiores quantidades das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, foram realizados testes de otimização das condições físicas e químicas de cultivo. A otimização foi realizada primeiramente em frascos erlenmeyer utilizando a cepa selecionada.

Por meio de planejamentos experimentais, elaborados com o auxílio do programa Estatística para Windows 5.0 versão estudantil, ensaios foram realizados com o objetivo de estudar os possíveis efeitos das variáveis do processo, além de estabelecer modelos estatisticamente válidos para descrever as interações existentes entre as variáveis do processo e os resultados, utilizando para a análise destes resultados a Metodologia de Superfície de Resposta (BARROS-NETO *et al*, 1995). Delineamentos fatoriais 3^2 completos (2 fatores, 3 níveis e 9 ensaios) foram aplicados em vários estudos de otimização.

As influências das seguintes variáveis independentes foram estudadas: proporção entre fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar; temperatura de fermentação ($^{\circ}\text{C}$), umidade inicial do meio (%), pH inicial do meio fermentativo; tempo de fermentação (h); concentração de fécula no meio fermentativo (%); concentração de CaCO_3 (%), KNO_3 (%) e solução salina (%). Posteriormente foi realizada a otimização das condições de extração das enzimas e a otimização das condições de dosagem enzimática.

Após a otimização, as enzimas foram precipitadas pelo processo de precipitação por salificação (*salting-out*). O sulfato de amônio é preferido para a precipitação de enzimas, indicado por LEHNINGER (1993) e utilizado por SOUZA (1996), em consequência de sua solubilidade acentuada em água, que lhe permite produzir forças iônicas muito elevadas e precipitar proteínas.

Por fim, um estudo foi realizado para a caracterização enzimática da α -amilase e da amiloglucosidase.

As dosagens dos extratos enzimáticos obtidos das fermentações foram realizadas de acordo com o esquema apresentado nas Figuras 21 e Figura 22, e os procedimentos descritos nos itens 3.1.6.5.1 e 3.1.6.5.2.

Todos os ensaios de otimização foram realizados utilizando a cepa do gênero de fungo previamente selecionado pelo crescimento radial e dos testes iniciais da produção das enzimas por fermentação no estado sólido (FES) em frascos.

3.1.7.1 Influência da proporção entre substrato e suporte

Para o estudo da influência da proporção entre fécula de mandioca (substrato) e bagaço de cana-de-açúcar (suporte) na produção das enzimas, foram realizados sete experimentos utilizando-se as seguintes proporções de FM/BC (fécula/bagaço): 1/1 ; 1,5/1 ; 1/1,5 ; 1/2 ; 2/1 ; 1/3 e 3/1, e as fermentações foram realizadas nas seguintes condições de cultivo: temperatura de fermentação 30°C, 48 horas de fermentação, 85% de umidade inicial, taxa de 10^7 esporos/ g MS e os nutrientes (4,6% CaCO₃, 6% KNO₃ e 30% solução salina, porcentagem calculada em relação a quantidade de fécula utilizada).

3.1.7.2 Influência da temperatura e da umidade inicial

Para o estudo da influência da temperatura e da umidade inicial da fermentação FES foi utilizado um delineamento fatorial 3^2 completo para estudar o efeito destas variáveis independentes. Este delineamento é composto de nove ensaios, 3 níveis e 2 fatores. As temperaturas de fermentação estudadas e as umidades iniciais são mostradas na Tabela 8.

TABELA 8 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E UMIDADE INICIAL NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	25	30	35
Umidade inicial (%)	80	85	90

3.1.7.3 Influência da concentração de CaCO₃, KNO₃ e solução salina

Um delineamento fatorial 3⁽³⁻¹⁾ fracionado foi utilizado para estudar a influência dos fatores: concentração de CaCO₃, concentração de KNO₃ e concentração da solução salina na produção das enzimas por FES. Os três níveis que compõem o planejamento referem-se aos respectivos valores das variáveis CaCO₃ e KNO₃: 0, 5 e 10% ; 0, 30 e 60%; e 0, 30 e 60% as concentrações da solução salina estudadas, conforme a Tabela 9. Salienta-se que estas porcentagens são calculadas em relação à quantidade de fécula utilizada nas fermentações e não ao total da formulação. As demais condições de fermentação foram: temperatura de fermentação (30°C), umidade inicial (90%); proporção fécula:bagaço (1:1); taxa de inoculação (1,0 x 10⁷ esporos/g MS).

TABELA 9 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO₃ , KNO₃ E SOLUÇÃO SALINA NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α-AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3 ⁽³⁻¹⁾ FATORIAL FRACIONADO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
CaCO ₃ (%)	0	5	10
KNO ₃ (%)	0	5	10
Solução salina (%)	0	30	60

3.1.7.4 Influência da suplementação com CaCO₃, com fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico

Para avaliar a influência do CaCO₃, bem como avaliar a produção das enzimas suplementando o meio com fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico na FES. Cinco ensaios foram realizados com as seguintes concentrações de CaCO₃, KNO₃ e uréia, respectivamente: Ensaio 1 (0; 0; 0%); Ensaio 2 (10; 0; 0%); Ensaio 3 (0; 10; 0%); Ensaio 4 (10; 10; 0%) e o Ensaio 5 (0; 0; 10%). Neste estudo, o ensaio 1 não apresentou nenhuma suplementação, para que fosse possível a comparação da FES sem estas fontes com a FES contendo esses nutrientes (Tabela 10). As demais condições de fermentação foram: temperatura de fermentação (30°C), umidade

inicial (90%), proporção fécula:bagaço (1:1), tempo de fermentação (48 horas), taxa de inoculação ($1,0 \times 10^7$ esporos/g MS).

TABELA 10 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 E DAS FONTES DE NITROGÊNIO ORGÂNICO (URÉIA) E INORGÂNICO (KNO_3) NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

ENSAIOS	FATORES		
	CaCO_3 (%)	KNO_3 (%)	URÉIA (%)
1	0	0	0
2	10	0	0
3	0	10	0
4	10	10	0
5	0	0	10

3.1.7.5 Influência da taxa de inoculação e da concentração de substrato

As variáveis independentes (fatores) taxa de inoculação e concentração de substrato foram estudadas para verificar a influência na produção das enzimas pela FES, empregando-se também o delineamento fatorial 3^2 completo. A combinação dos níveis e fatores totaliza 9 experimentos, constando os seguintes valores para as variáveis: $1,0 \times 10^7$; $5,5 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos/g MS para a taxa de inoculação e para a concentração de fécula de mandioca: 0,5; 5,0 e 9,5%. As demais condições de processo foram: temperatura de fermentação (30°C), umidade inicial (90%), proporção fécula:bagaço (1:1), tempo de fermentação (48 horas) (Tabela 11).

TABELA 11 – INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Taxa de inoculação ($\times 10^7$ esporos/g MS)	1,0	5,5	10
Concentração de substrato (%)	0,5	5,0	9,5

3.1.7.6 Influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação

Para o estudo da influência da taxa de inoculação bem como do tempo de fermentação para a produção de α -amilase e amiloglucosidase por FES pela cepa de fungo selecionada, utilizou-se o delineamento 3^2 completo, pois este oferece um maior número de combinações além de utilizar mais um nível, quando comparado ao delineamento 2^k . Os valores estudados para a taxa de inoculação são equivalentes ao item anterior (3.1.7.4) e os valores do tempo de fermentação foram: 48, 54 e 60 horas, conforme a Tabela 12. As demais condições de processo foram: temperatura de fermentação (30°C), umidade inicial (90%), proporção fécula:bagaço (1:1), tempo de fermentação (48 horas).

TABELA 12 – INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Taxa de inoculação ($\times 10^7$ esporos/g MS)	1,0	5,5	10
Tempo de fermentação (horas)	48	54	60

3.1.7.7 Influência do pH inicial de fermentação

Para estudar a influência do pH inicial na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, as FES foram preparadas em frascos ajustando-se os seguintes valores de pH inicial : 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 para verificar a preferência do fungo pelo pH do meio para a produção enzimática. As demais condições de processo foram: temperatura de fermentação (30°C); umidade inicial (90%); proporção fécula:bagaço (1:1); taxa de inoculação ($1,0 \times 10^7$ esporos/g MS)

3.1.7.8 Influência da agitação no processo de extração das enzimas

As condições de extração têm importância na recuperação das enzimas produzidas no meio da FES. Por este motivo foram estudadas algumas condições de extração. O meio fermentado amostrado foi diluído em água, a uma razão 1:10 (p/p), em frascos Erlenmeyer quando utilizado o *shaker* e em béquer quando utilizado o ultra turrax . As seguintes condições de extração foram estudadas: equipamento de agitação; tempo de agitação e temperatura de agitação, a fim de avaliar as melhores condições de extração para obter máxima recuperação das enzimas produzidas. Os equipamentos empregados foram: agitador tipo *shaker* a 30°C a 120 rpm nos seguintes tempos de extração (30, 60, 90 e 120 minutos) e o agitador ultra turrax em velocidade intermediária, à temperatura ambiente nos seguintes tempos (15, 30, 45 e 60 minutos).

A Tabela 13 apresenta as condições de extração estudadas para a recuperação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase produzidas pela FES por *Aspergillus niger* LPB 28.

TABELA 13 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLICOSIDASE PRODUZIDAS POR FES PELO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

EQUIPAMENTO DE AGITAÇÃO	CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO	TEMPO DE AGITAÇÃO (min)
SHAKER (a 30°C)	Temperatura: 30°C Agitação: 120 rpm	30
		60
		90
		120
ULTRA TURRAX (à temp. ambiente)	Temperatura ambiente Velocidade média de agitação	15
		30
		45
		60

3.1.7.9 Influência dos parâmetros de atividade enzimática

Influência da temperatura e do pH de incubação das enzimas

Um delineamento fatorial 3^2 completo foi utilizado para estudar a influência da temperatura e do pH de incubação das enzimas na dosagem de atividade amilásica. As temperaturas de incubação testadas foram: 30; 55 e 80°C enquanto os valores de pH (da solução de amido adicionada no teste de dosagem) foram: 5,0; 6,0 e 7,0 conforme a Tabela 14.

TABELA 14 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH DE INCUBAÇÃO DAS ENZIMAS PARA A DOSAGEM DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA POR *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

Planejamento experimental 3^2 completo			
Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura de incubação (°C)	30	55	80
pH de incubação	5,0	6,0	7,0

3.1.8 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)

3.1.8.1 Influência da concentração de fécula de mandioca

Para avaliar a influência da concentração de fécula de mandioca na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase pelo fungo selecionado por FSm, as fermentações foram conduzidas com as seguintes concentrações de fécula: 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0%, realizadas em triplicata.

3.1.9 ESTUDO COMPARATIVO DA FES CONDUZIDA EM FRASCOS E EM BANDEJAS

Para avaliar a diferença da FES em frascos e em bandejas, foram realizados nove testes, modificando algumas condições de processo, onde foi variado o tempo de fermentação (48 e 72 horas) e a concentração da fonte de nitrogênio inorgânico (10; 20 e 30% de KNO_3). Todos os ensaios foram conduzidos nas seguintes condições fixadas: 90% de umidade, temperatura de fermentação (30°C), proporção fécula/bagaço (1,5/1), pH inicial (4,5), (5% CaCO_3 e 30% solução salina, porcentagens em relação à quantidade de fécula adicionada) de acordo como mostra a Tabela 15.

TABELA 15 – ESTUDO COMPARATIVO DA FES CONDUZIDA EM FRASCOS E EM BANDEJAS NA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR *ASPERGILLUS NIGER* LPB 28

ENSAIO	BIOREATOR	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)	KNO_3 (%)
1	frasco	48	10
2	frasco	48	20
3	frasco	48	30
4	Bandeja	48	10
5	Bandeja	48	20
6	Bandeja	48	30
7	Bandeja	72	10
8	Bandeja	72	20
9	Bandeja	72	30

3.2 PRECIPITAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS

A partir do extrato enzimático obtido, procedeu-se a precipitação das enzimas produzidas pelo processo de precipitação por salificação, também conhecido por *salting-out*. O sal empregado para a precipitação foi o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O procedimento foi baseado de acordo com SOUZA *et al* (1996), onde o extrato enzimático bruto foi saturado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80%, permanecendo em repouso por 24 horas e em seguida centrifugado a 16.000 rpm por 12 minutos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE

O meio fermentado obtido durante o estudo da FES foi utilizado para a caracterização cinética da α -amilase e amiloglucosidase bruta, conforme o item 3.3.1 descrito a seguir:

3.3.1 Influência da concentração de substrato na atividade da α -amilase e amiloglucosidase por FES, com fécula de mandioca e bagaço de cana

Para o estudo da influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática da fermentação obtida foi usada a técnica descrita por PARK (1972), com algumas alterações. Foram preparadas soluções de amido comercial solúvel (marca SYNTH) nas seguintes concentrações: 0 g/l ; 1,5g/l; 3g/l ; 6g/l ; 9 g/l ; 10 g/l ; 12 g/l ; 15 g/l ; 18 g/l; 20 g/l e 25 g/l dissolvidos em tampão fosfato pH 6,5. A partir de então foi utilizado 0,5 ml de cada solução de amido, adicionado 0,5 ml do extrato enzimático obtido conforme descrito nos passos da Figura 22. Para cada concentração de substrato era feito um branco, com 0,5 ml de tampão fosfato pH 6,5 no lugar da enzima. O procedimento usado para a determinação das atividades enzimáticas é o mesmo descrito no esquema das Figuras 21 e 22. Foram calculadas a Constante de Michaelis-Menten (K_M) e a Velocidade Máxima (V_{max}) da α -amilase e da amiloglucosidase, segundo LEHNINGER (1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do substrato e suporte

A composição centesimal da fécula de mandioca (FM) e do bagaço de cana-de-açúcar (BC) foi feita com o objetivo de se determinar as características do substrato e do suporte, respectivamente, utilizados neste estudo. As determinações foram feitas em triplicata e as médias dos resultados obtidos, em g/100g de FM e em g/100 g de BC, respectivamente, são apresentadas nas Tabelas 16 e 17.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FÉCULA DE MANDIOCA (MARCA YOKI)

CONSTITUINTE	MÉDIA (g/100g de FM)
Umidade	3,12 ± 0,23
Amido	96,27 ± 0,38
Proteínas	ND
Lipídeos	ND
Cinzas	0,21 ± 0,07
Fibras	ND

NOTAS: Média ± desvio padrão. FM= fécula de mandioca
ND = não determinado

Conforme apresentado na Tabela 16, o elevado teor de amido torna a fécula de mandioca uma excelente fonte de carbono além de ser excelente fonte amilácea, indispensável para a síntese de amilases realizada por fungos. Conforme KOLICHESKI (1995) citada por PRADO (2002), algumas cepas de *A. niger* produzem enzimas que são capazes de hidrolisar o amido liberando glucose. Outros autores também afirmam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer a indução da produção de amilases por fungos, leveduras e bactérias FELLOWS (1994), PANDEY *et al* (1999) e (GUPTA *et al*, 2003). Os microrganismos não assimilam diretamente moléculas complexas como é o caso do amido, um polissacarídeo. Não havendo outro componente assimilável no meio, o microrganismo passa a sintetizar aquelas enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples - neste caso as amilases - para que estas convertam o amido (fécula) em açúcares assimiláveis garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

A Tabela 17 apresenta os resultados da composição centesimal obtida para as amostras do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado para as FES. As determinações foram realizadas de acordo com as técnicas oficiais apresentadas na Tabela 7.

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

CONSTITUINTE	MÉDIA (g/100g de BC)
Umidade	3,84 ± 0,37
Amido	ND
Proteínas	ND
Lipídeos	ND
Cinzas	0,09 ± 0,02
Fibras	95,21 ± 0,53

NOTA: Média ± desvio padrão. BC= bagaço de cana-de-açúcar
ND = não determinado

4.2 Seleção das cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus*

O crescimento radial realizado como método para a seleção das cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus* produtoras de α -amilase e amiloglucosidase está mostrado nas Figuras 23 e 24. A Figura 18 apresenta o comportamento das 12 cepas de *Rhizopus* durante o crescimento radial a 30°C em meio ágar fécula de mandioca.

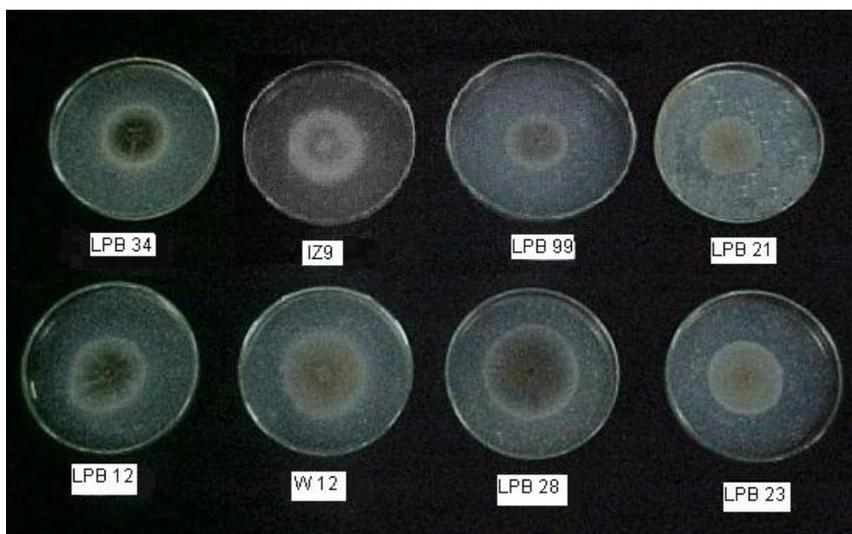
FIGURA 18 – CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *RHIZOPUS*



FONTE: O AUTOR.

A Figura 19 mostra as oito cepas de *Aspergillus* durante o crescimento radial a 30°C em meio ágar fécula de mandioca.

FIGURA 19 – CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *ASPERGILLUS* EM MEIO ÁGAR FÉCULA DE MANDIOCA

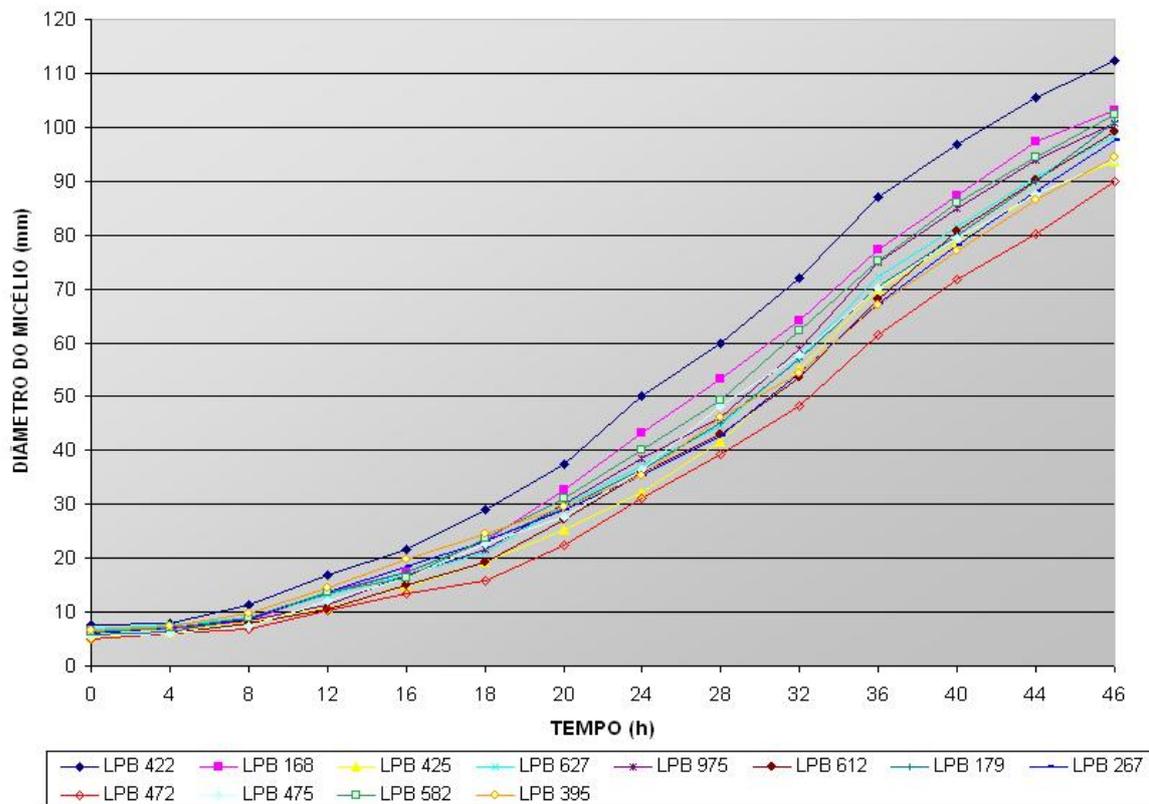


FONTE: O AUTOR.

Os gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21 mostram os resultados do crescimento radial analisado pelo aumento do diâmetro do micélio das cepas (mm) em função do tempo (h) à temperatura de 30°C. Ao estudar a influência da temperatura no crescimento radial de *Rhizopus oryzae* LPB 627, SOCCOL (1992) obteve a mais alta velocidade de crescimento à temperatura de 30°C após testar as seguintes temperaturas (22°, 25°, 30°, 36° e 41°C). Em função disso foi definido que a temperatura de incubação das cepas fosse mantida a 30°C.

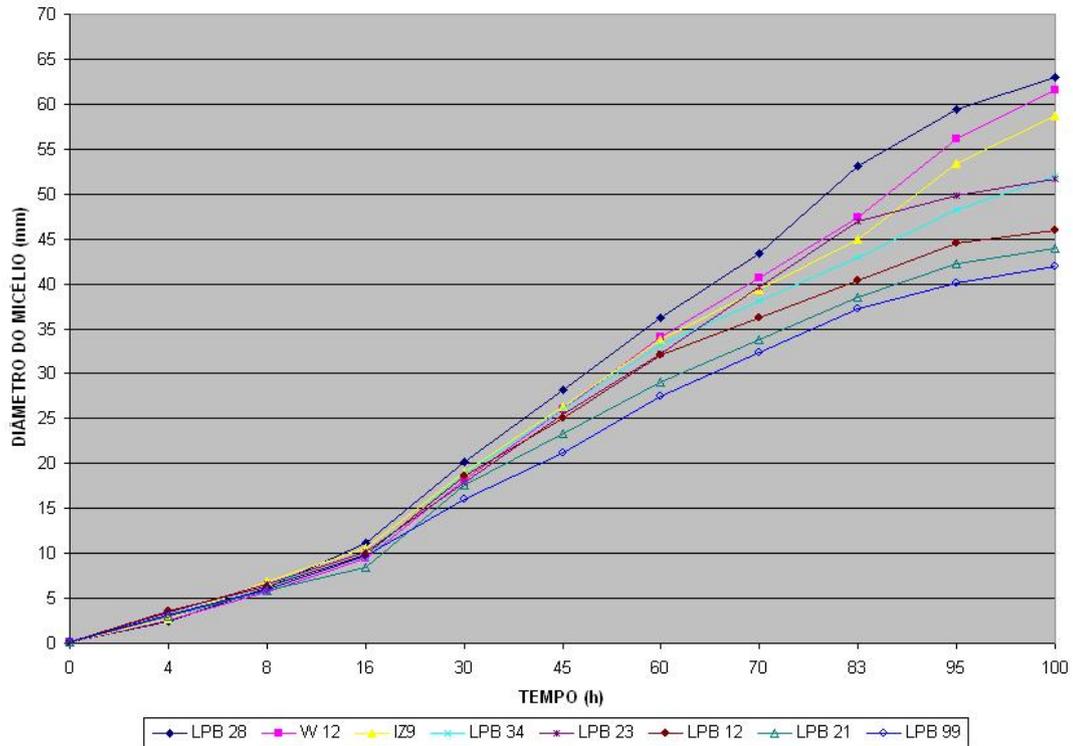
Observa-se que as 12 cepas de *Rhizopus* apresentaram crescimento no meio ágar fécula de mandioca. O tempo total de monitoramento do crescimento foi de 46 horas, momento em que o micélio da cepa LPB 422 (*Rhizopus formosa*) preencheu completamente o diâmetro da placa de Petry, com (112 mm ou 11,2 cm) de diâmetro. Dentre as cepas testadas, observou-se que a cepa de *Rhizopus formosa* LPB 422 apresentou a mais alta velocidade de crescimento (2,44 mm/h), seguida por *R. oryzae* LPB 168 (2,24 mm/h) e *R. arrhizus* LPB 582 (2,04 mm/h), conforme a Figura 20.

FIGURA 20 – CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *RHIZOPUS* (mm/h) - DIÂMETRO (mm) X TEMPO (h)

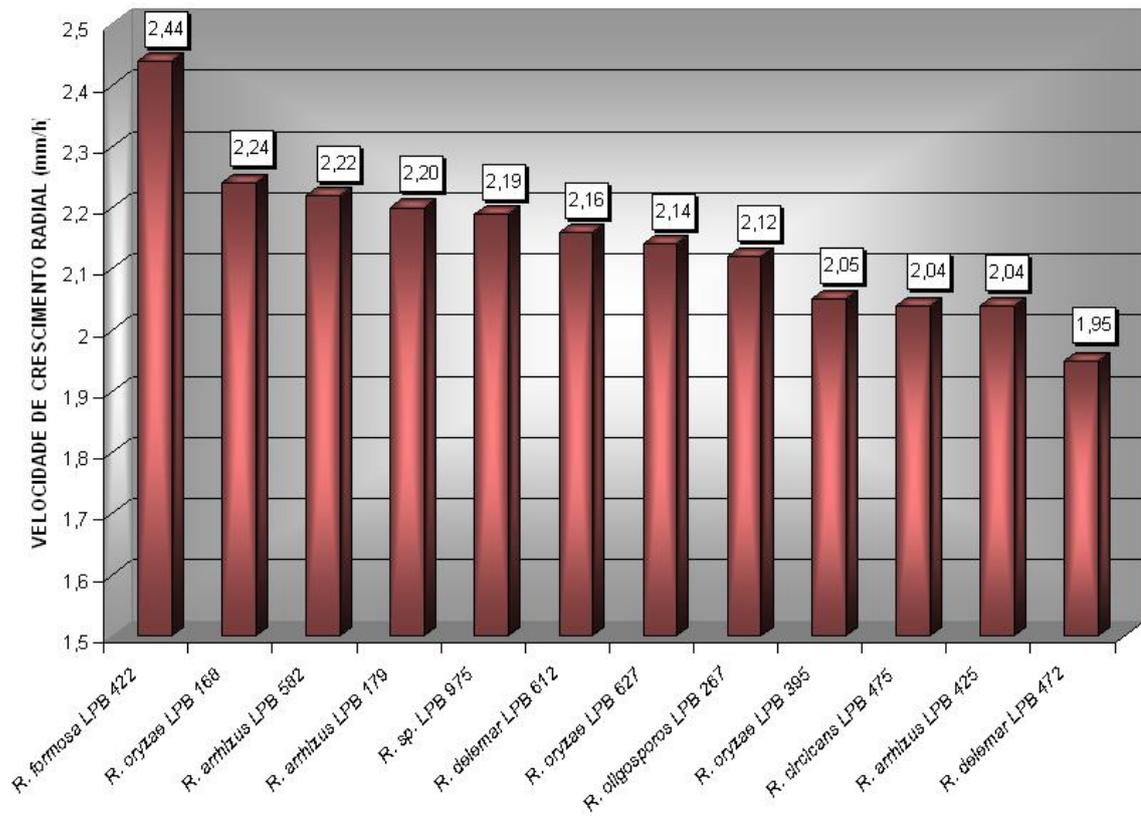
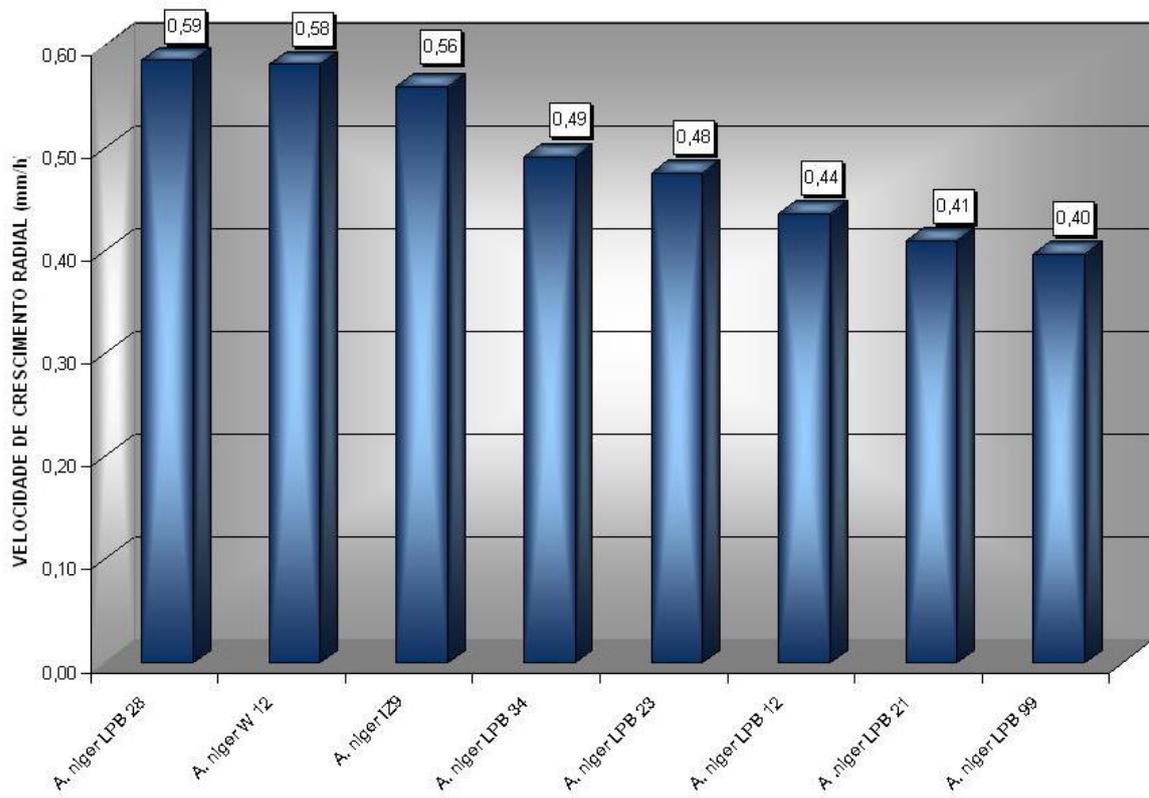


Dentre as cepas de *Aspergillus* estudadas, observou-se que todas as cepas testadas apresentaram crescimento no meio ágar fécula de mandioca, destacando-se com maior velocidade de crescimento a cepa *A. niger* LPB 28 (0,59 mm/h), seguido da cepa selvagem de *Aspergillus niger*. W12 (0,58 mm/h) e de *Aspergillus niger* IZ9 (0,56 mm/h) conforme pode ser visualizado na Figura 21. Em testes preliminares, foi observado que as cepas de *Aspergillus* demonstraram crescimento mais lento quando comparado ao crescimento das cepas de *Rhizopus*, no mesmo meio. Por este motivo o monitoramento foi acompanhado em intervalos de tempo maiores até o tempo de 100 horas, quando a cepa de *Aspergillus niger* LPB 28 apresentou maior diâmetro, equivalente a 65,57 mm.

FIGURA 21 - CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *ASPERGILLUS* (mm/h) - DIÂMETRO (mm) x TEMPO (h)



A seleção das cepas que apresentaram maior velocidade de crescimento radial demonstrou a capacidade de degradação do meio ágar fécula de mandioca pela produção de enzimas que degradam o amido.

FIGURA 22 – CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *RHIZOPUS* (mm/h)FIGURA 23 – CRESCIMENTO RADIAL DAS CEPAS DE *ASPERGILLUS* (mm/h)

Conforme as Figuras 28 e 29, compararam-se as duas melhores cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus*, ficando evidenciado que a cepa de *R. formosa* LPB 422 apresentou uma velocidade de crescimento radial 4,13 vezes maior que a velocidade de crescimento radial da cepa de *A. niger* LPB 28.

Portanto as melhores cepas de *Rhizopus* (*R. formosa* LPB 422, *R. oryzae* LPB 168 e *R. arrhizus* LPB 582) bem como as melhores cepas de *Aspergillus niger* (LPB 28, W12, e IZ9) foram testadas em fermentação no estado sólido de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar para avaliar e confirmar a capacidade de produção de amilases.

4.3 Seleção da cepa padrão de *Rhizopus* e *Aspergillus* por FES em frascos

A FES em frascos Erlenmeyer foi realizada com o intuito de avaliar quais cepas de *Rhizopus* pré-selecionadas a partir do crescimento radial são maiores produtoras de α -amilase e amiloglucosidase, e definir uma cepa padrão para a continuidade desse trabalho de pesquisa.

As fermentações foram conduzidas em estufa a 30°C por 48 horas, com pH no início da fermentação igual a 6,0. Posteriormente foram feitas dosagens de atividade de α -amilase e amiloglucosidase conforme apresentado no item 3.1.6.5.

A Tabela 18 apresenta os resultados da produção de enzimas α -amilase e amiloglucosidase obtidas por FES em frascos para cepas de *Rhizopus* e *Aspergillus*.

TABELA 18 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS ATIVIDADES DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE PRODUZIDAS POR CEPAS DE *RHIZOPUS* E *ASPERGILLUS* PRÉ-SELECIONADAS POR FES

CEPA	AR μ moles maltose/ml ext. enzim.	AR μ moles glicose/ml ext. enzim.	AR g maltose/ g FM	AR g glicose/ g FM	α -AMILASE U/ g FM	AMILOGLUCOSIDASE U/ g FM
<i>R. oryzae</i> LPB 168	3,04	4,77	0,10	0,158	25,46 \pm 1,94	352,54 \pm 18,46
<i>R. formosa</i> LPB 422	0,16	0,58	0,005	0,0194	24,60 \pm 1,77	43,09 \pm 9,23
<i>R. arrhizus</i> LPB 582	2,55	4,06	0,08	0,135	20,38 \pm 3,21	300,31 \pm 3,69
<i>A. niger</i> LPB 28	10,76	15,64	0,36	0,521	530,55 \pm 11,85	770,66 \pm 17,22
<i>A. niger</i> IZ9	8,77	12,75	0,29	0,424	432,35 \pm 5,08	628,01 \pm 7,38
<i>A. niger</i> W 12	6,24	9,07	0,21	0,302	307,79 \pm 5,08	446,85 \pm 6,35

NOTAS: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

AR=açúcar redutor; FM=fécula de mandioca; BC=bagaço de cana-de-açúcar;

MS=matéria seca (FM+BC).

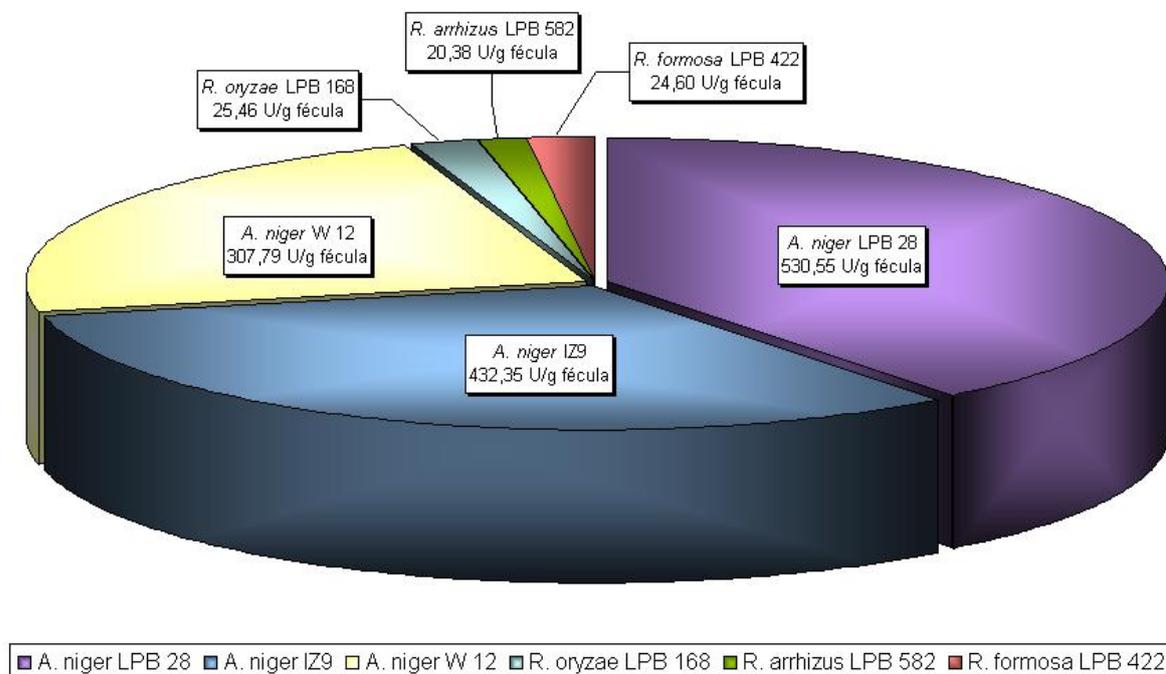
Ext. enzim.= extrato enzimático

Condições de cultura: taxa de inoculação: 10^7 esporos/ g MS; temperatura 30°C; 48 hs de fermentação; relação FM/BC 1,5/1; 85% umidade; pH 6,5; 3,0% fécula de mandioca, 6% de CaCO_3 , 4,6% de KNO_3 e 30% de solução salina. As porcentagens de CaCO_3 , KNO_3 e solução salina adicionadas foram calculadas em relação à quantidade de fécula de mandioca.

No ensaio realizado de medição do crescimento radial foi observado que todas as cepas de *Rhizopus* spp. apresentaram altas taxas de velocidade de crescimento radial (em média: 2,149 mm/h) em relação às cepas do gênero *Aspergillus*, que apresentaram velocidade média de 0,494 mm/h. As três melhores cepas de cada gênero foram selecionadas para a produção de enzimas em fermentação no estado sólido de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar em frascos Erlenmeyer.

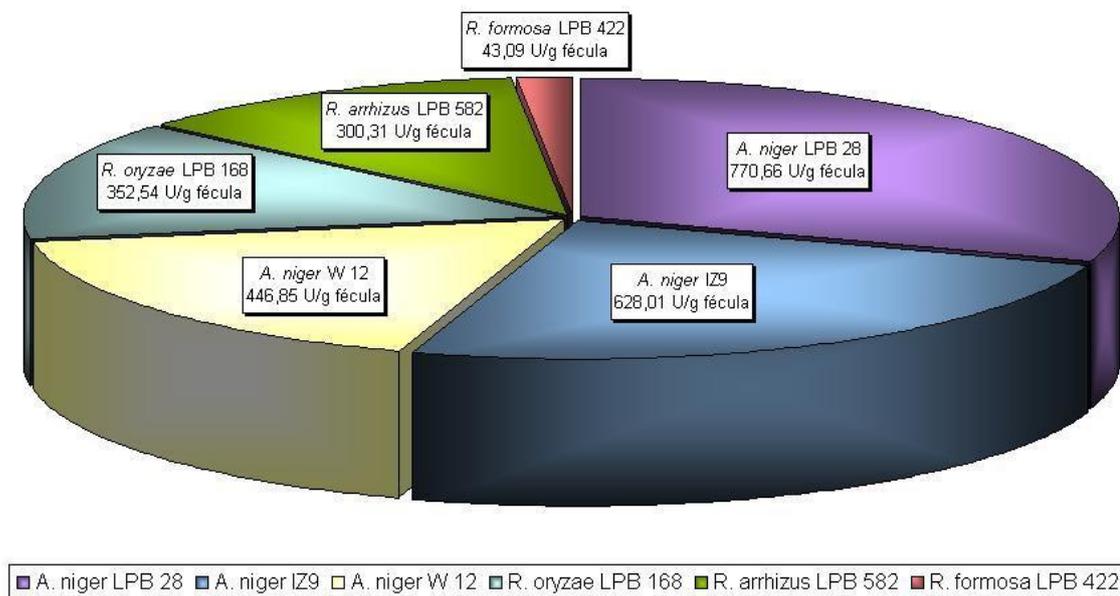
Observou-se que os resultados da produção de α -amilase (Figura 29) foram semelhantes para *R. oryzae* LPB 168 (25,46 U/g fécula de mandioca), *R. formosa* LPB 422 (24,60 U/g fécula) e *R. arrhizus* LPB 582 (20,38 U/g fécula). Por outro lado, a produção de amiloglucosidase para estas espécies foi maior e apresentou maior variação. Observou-se que a espécie *R. oryzae* LPB 168 demonstrou produção de amiloglucosidase mais elevada, com atividade de 352,54 U/g fécula; em seguida *R. arrhizus* LPB 582 com 300,31 U/g fécula e *R. formosa* com produção de apenas 43,09 U/g fécula. As cepas de *Rhizopus* mencionadas não apresentaram produção de α -amilase satisfatórias quando comparada à produção de amiloglucosidase.

FIGURA 24 - ATIVIDADE DA α -AMILASE (U/g fécula de mandioca) DAS CEPAS DE *RHIZOPUS* E *ASPERGILLUS* PRÉ-SELECIONADAS NO CRESCIMENTO RADIAL



Comparando-se as Figuras 24 e 25, pode-se observar que a produção de amiloglucosidase expressa em atividade (U/g fécula de mandioca) foi superior à produção de α -amilase na FES por todas as cepas de *Aspergillus* e *Rhizopus* pré-selecionadas. As cepas de *Aspergillus niger* LPB 28, IZ9 e W12 demonstraram maior produção das enzimas tanto α -amilase como amiloglucosidase quando comparada à produção das enzimas pelas cepas de *Rhizopus*.

FIGURA 25 - ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE (U/g fécula de mandioca) DAS CEPAS DE *RHIZOPUS* E *ASPERGILLUS* PRÉ-SELECIONADAS NO CRESCIMENTO RADIAL



A melhor cepa produtora de α -amilase e amiloglucosidase foi *Aspergillus niger* LPB 28 com produção expressa em atividade enzimática equivalente a α -amilase 530,55 U/g fécula e amiloglucosidase 770,66 U/g fécula de mandioca por FES em frascos nas condições de cultura detalhadas da Tabela 18.

Os cálculos das atividades enzimáticas são expressos em U/ g de fécula de mandioca não incluindo a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar pois este componente tem apenas a função de suporte das fermentações FES.

A cepa de *Aspergillus niger* LPB 28 foi selecionada para a seqüência dos estudos de otimização das condições físicas e químicas da fermentação no estado sólido bem como nos estudos de extração das enzimas, dosagem enzimática, caracterização enzimática e precipitação do extrato enzimático.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES

A seqüência de estudos de otimização das propriedades químicas e físicas foi realizada para verificar a influência das variáveis no processo de produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase pela FES pelo fungo *Aspergillus niger* LPB 28, selecionado de acordo com os resultados apresentados nos itens 4.2 e 4.3.

4.4.1 Influência da proporção entre substrato e suporte

A Tabela 19 apresenta os resultados da influência da proporção entre fécula de mandioca (substrato) e bagaço de cana-de-açúcar (suporte) na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase.

TABELA 19 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE OBTIDAS EM FES USANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE SUBSTRATO E SUPORTE

ENSAIO	PROPORÇÃO FM / BC	ATIVIDADE DA α -AMILASE		ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE	
		U/g FM	U/ g MS	U/g FM	U/ g MS
1	1 / 1	323,683 \pm 12,11	161,787 \pm 8,54	725,453 \pm 12,43	362,604 \pm 7,58
2	1,5 / 1	407,2842 \pm 6,22	239,578 \pm 4,54	755,225 \pm 6,26	405,39 \pm 8,04
3	1 / 1,5	308,705 \pm 5,82	154,357 \pm 11,46	591,271 \pm 14,11	295,635 \pm 13,73
4	1 / 2	289,497 \pm 9,57	96,639 \pm 5,24	470,354 \pm 10,17	157,012 \pm 6,09
5	2 / 1	467,459 \pm 14,64	311,306 \pm 11,54	781,672 \pm 17,76	520,556 \pm 18,21
6	1 / 3	137,349 \pm 15,52	34,356 \pm 2,64	326,177 \pm 8,22	81,589 \pm 9,81
7	3 / 1	299,222 \pm 17,52	224,536 \pm 13,37	475,4754 \pm 16,07	356,7958 \pm 16,43

NOTAS: FM / BC: Proporção entre fécula de mandioca (FM) e bagaço de cana (BC).

Média das atividades obtidas de dosagens realizadas em triplicata.

Média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

Quando a fermentação no estado sólido (FES) foi conduzida com a proporção FM/BC igual a 2/1, obteve-se uma maior produção (expressa em atividade enzimática) das enzimas estudadas. A proporção 1/1 também resultou em uma produção satisfatória assim como a proporção 1,5/1 atingiu valores próximos aos alcançados com 1/1, porém aumentando-se a quantidade de fécula em relação à quantidade de bagaço (3/1) verificou-se que a produção enzimática (expressa em atividade enzimática) diminuiu consideravelmente. Isto pode estar relacionado com as características do meio de fermentação, pois com o aumento da concentração de fécula, maior é a viscosidade do meio em virtude da gelatinização durante o

tratamento térmico (esterilização antes da inoculação), impedindo a transferência de gases e a incorporação de oxigênio facilitada pelo suporte (BC). Durante os experimentos as proporções de FM/BC superiores a 3/1 (4/1; 5/1; 6/1; 8/1 e 10/1) resultaram na formação de um meio fermentativo com aspecto viscoso, sendo que nestas condições o suporte (bagaço de cana) perde sua função estrutural na FES. Conforme PANDEY *et al* (1999), o acúmulo de substrato pode interferir na respiração microbiana bem como na aeração do meio. WARD (1989) relatou a importância da otimização dos espaços vazios interpartículas para facilitar as transferências de gases e calor, sendo de grande importância a seleção do tamanho das partículas e a constituição do meio da fermentação em substratos sólidos. Ao suplementar um meio composto de farelo de trigo com amido de milho, PANDEY (1990) conseguiu obter maior produção de glucoamilase por fermentação com culturas de fungos. Ao estudar vários substratos dentre eles o bagaço de cana para a produção de amilases extracelulares por *A. oryzae* por fermentação no estado sólido, TUNGA & TUNGA (2003) obtiveram atividade amilásica de 255 U/g bagaço de cana (72 horas de fermentação, aproximadamente 80% de umidade à 30°C e taxa de inoculação de $\sim 10^5$ esporos/g bagaço) sem suplementação de fonte de carbono.

4.4.2 Influência da temperatura de fermentação e da umidade inicial

Um delineamento fatorial 3^2 completo (2 fatores, 3 níveis e 9 experimentos) foi empregado para estudar a influência da temperatura de fermentação (°C) e umidade inicial (%) na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase. A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos dos nove ensaios realizados combinando-se os valores dos fatores temperatura e umidade e a Tabela 21 apresenta as variações na composição dos meios testados em função do teor de umidade inicial do meio.

TABELA 20 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3² COMPLETO

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES		VARIÁVEIS DEPENDENTES	
	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE (%)	ATIVIDADE DA α -AMILASE (U/ g FM)	ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE (U/ g FM)
1	25 (-1)	80 (-1)	336,650 \pm 7,16	510,245 \pm 7,71
2	25 (-1)	85 (0)	403,425 \pm 12,53	581,240 \pm 13,29
3	25 (-1)	90 (+1)	472,032 \pm 8,04	634,243 \pm 16,23
4	30 (0)	80 (-1)	609,524 \pm 13,26	919,057 \pm 8,05
5	30 (0)	85 (0)	1156,027 \pm 14,11	1211,063 \pm 11,83
6	30 (0)	90 (+1)	1352,425 \pm 21,63	1622,802 \pm 14,31
7	35 (+1)	80 (-1)	366,401 \pm 6,47	928,768 \pm 10,91
8	35 (+1)	85 (0)	684,264 \pm 11,28	1137,254 \pm 14,28
9	35 (+1)	90 (+1)	1042,272 \pm 19,26	1267,520 \pm 9,25

NOTAS: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

Ativ. = Atividade enzimática

Valores das variáveis descodificadas e em parênteses os níveis codificados (-1, 0, +1)

FM = fécula de mandioca

Condições de cultura: Taxa de inoculação: 10⁷ esporos/g MS; 4% CaCO₃; 10% KNO₃; 30% solução salina; tempo de fermentação: 48 horas.

TABELA 21 – VARIAÇÃO DA UMIDADE DA FES EM FRASCOS ERLLENMEYER

COMPOSIÇÃO DO MEIO	80% UMIDADE		85% UMIDADE		90% UMIDADE	
	g	%	g	%	g	%
Fécula de mandioca	0,90	2,37	0,90	2,37	0,90	2,37
CaCO ₃ (6%)	0,054	0,14	0,054	0,14	0,054	0,14
KNO ₃ (4,6%)	0,041	0,11	0,041	0,11	0,041	0,11
Solução salina (30%)	0,270	0,71	0,27	0,71	0,27	0,71
Solução de esporos *	0,135	0,36	0,135	0,36	0,135	0,36
H ₂ O deionizada	7,175	93,93	10,335	27,27	16,66	43,96
Bagaço de cana (0,85 -2mm)	0,90	2,37	0,90	2,37	0,90	2,37
TOTAL	9,475	100,0	12,635	100,0	18,96	100,0
Umidade total	7,580	80,00	10,740	85,00	17,065	90,00

NOTA: A taxa de inoculação da solução de esporos foi de 10⁷ esporos/ g MS

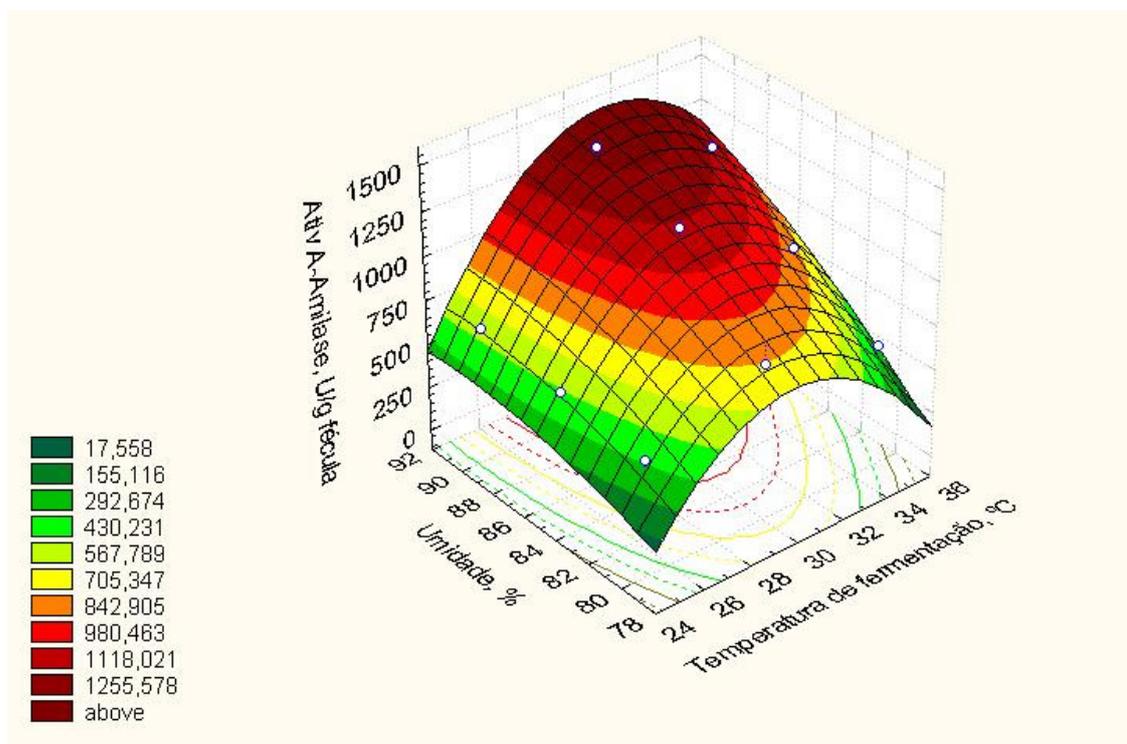
As porcentagens de CaCO₃ e KNO₃ foram calculadas em relação à quantidade de fécula

A produção da α -amilase expressa em atividade enzimática apresentou variação de 366,40 a 1352,42 U/g de fécula de mandioca dependendo do ensaio realizado. Os resultados obtidos mostram que o ensaio 6 com 90% de umidade e 30°C de temperatura de fermentação foi a combinação que demonstrou maior produção da enzima α -amilase.

A Figura 26 apresenta a superfície de resposta do efeito das variáveis: temperatura de fermentação e a umidade inicial sobre a produção de α -amilase, expressa em U/g fécula de mandioca. Observou-se que a produção da α -amilase foi maior com o aumento da umidade inicial do meio de fermentação (%), especialmente acima de 85% de umidade. Entretanto, a umidade de 90% foi o teor máximo de umidade pré-testado em que não foi evidenciada a presença de água livre (conteúdo de água não absorvida). Por esse motivo, umidades acima de 90% não foram testadas pois nestas condições a fermentação deixa de ser considerada sólida (FES).

Em relação à temperatura de fermentação, a região ótima (escura) é a região que indica os melhores resultados de produção de α -amilase, com atividades acima de 1255 U/g fécula, nas faixas de temperatura entre 30° e 32°C. Observou-se que a temperatura de fermentação em torno de 30-32°C é a mais adequada para a produção de α -amilase assim como o teor de umidade ideal é de 90%. De acordo com Ueno *et al* (1987) e Kundu *et al* (1973) citados por PANDEY *et al* (2005), foram alcançados ótimos rendimentos de α -amilase em temperaturas entre 30 e 37°C. BHUMIBHAMON (1983) citado por PANDEY *et al* (2005) obteve maior produção de α -amilase por *A. niger* à temperatura de 30°C.

FIGURA 26 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO (°C) E DA UMIDADE INICIAL (%) NA PRODUÇÃO DA α -AMILASE (EXPRESSA EM ATIVIDADE U/g FÉCULA DE MANDIOCA)



Os dados experimentais foram ajustados pela equação 4, demonstrando que as variáveis significativas (ao nível de confiança de 95%) que mais afetaram a resposta foram a umidade e a temperatura de fermentação, sendo que o termo linear da umidade apresentou maior coeficiente absoluto (+259,025).

$$\text{ATIV. } \alpha\text{-AMILASE (TEMP, UMID)} = +1073,562 + 146,805(\text{TEMP}) - 488,484(\text{TEMP})^2 + 259,02(\text{UMID}) - 51,35(\text{UMID})^2 + 135,12(\text{TEMP})(\text{UMID})$$

(4)

Onde:

ATIV. α -AMILASE = atividade da α -amilase, U/ g fécula de mandioca

TEMP = temperatura de fermentação, °C

UMID = umidade inicial do meio de fermentação, %

Os resultados da análise de variância para a produção da α -amilase (expressa em atividade U/g fécula) mostram que as duas variáveis de processo estudadas foram significativas ($p < 0,05$): Temperatura (Q) e Umidade (L), conforme apresentado na Tabela 22 e no Gráfico de Pareto da Figura 27.

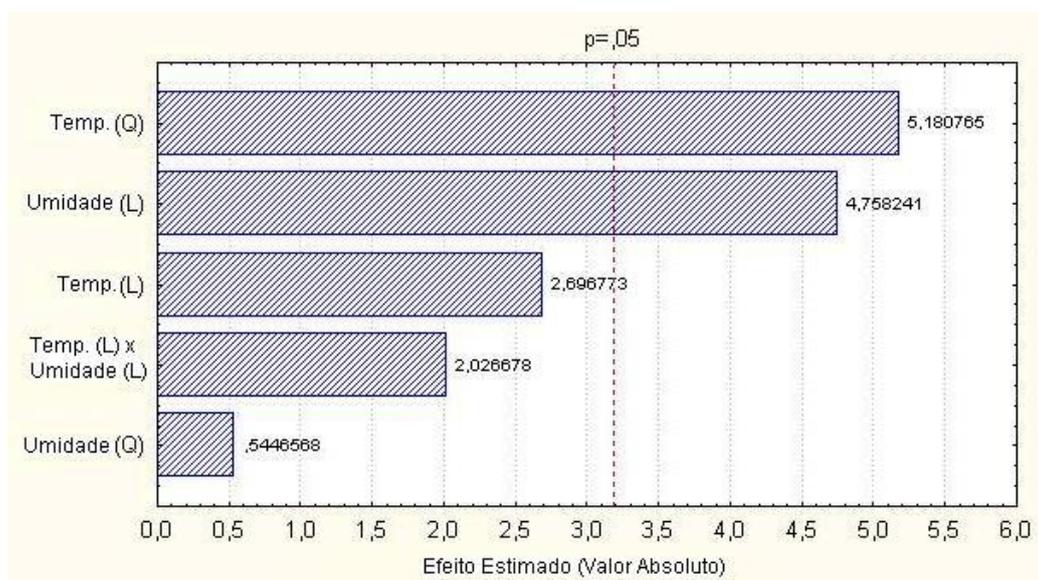
De acordo com a Tabela 22, a modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,9532$ e $R^2_{aj} = 0,8753$, podendo ser utilizada para fins preditivos.

TABELA 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Temp. de fermentação (°C) (L)	129310	1	129310,2	7,27259	0,073988
Temp. de fermentação (°C) (Q)*	477235	1	477234,5	26,84033	0,013961*
Umidade (%) (L)*	402566	1	402565,8	22,64085	0,017622*
Umidade (%) (Q)	5275	1	5274,6	0,29665	0,623867
Temp. de fermentação (°C) (L+Q)	606545	2	303272,4	17,05646	0,022982
Umidade (%) (L+Q)	407840	2	203920,2	11,46875	0,039336
Temp. (L) x Umid (L)	73032	1	73032,1	4,10743	0,135778
Temp. (L+Q) x Umid (L+Q)	73032	1	73032,1	4,10743	0,135778
Erro experimental	53342	3	17780,5		
Total Soma quadrados	1140759	8			
R^2	0,95322				
R^2 ajustado	0,87531				

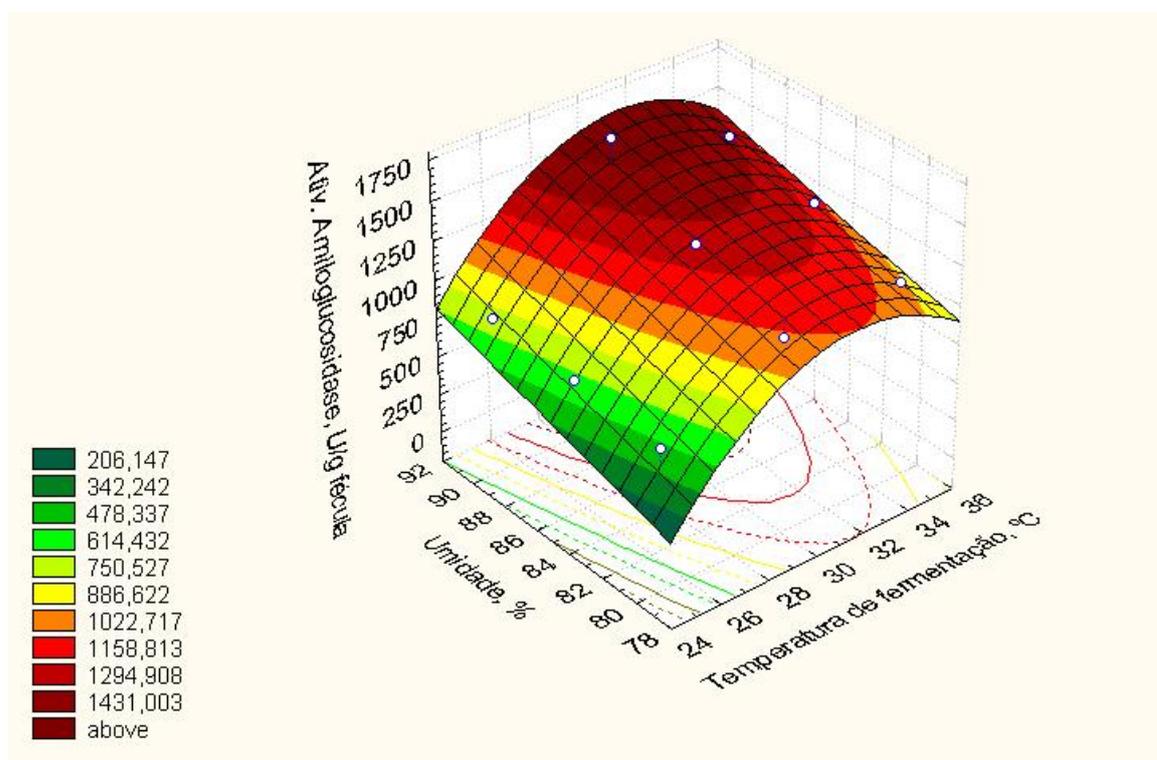
NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

FIGURA 27 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E UMIDADE PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE



A produção de amiloglucosidase variou de 510,24 a 1622,80 U/g fécula, respectivamente para as condições mais drásticas de tratamento (menor temperatura de fermentação e menor porcentagem de umidade inicial) e menos drásticas (maior porcentagem de umidade e temperatura de fermentação intermediária), conforme mostra a Figura 28.

FIGURA 28 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO (°C) E UMIDADE (%) NA PRODUÇÃO DA AMILOGLUCOSIDASE, EXPRESSA EM U/g FÉCULA DE MANDIOCA



A equação 5 foi ajustada aos dados experimentais, demonstrando que a variável significativa (ao nível de confiança de 95%) que mais afetou a resposta foi a temperatura de fermentação apresentando maior coeficiente absoluto (+267,97).

$$\text{ATIV. AMILOG. (TEMP, UMID)} = + 1248,36 + 267,97(\text{TEMP}) - 407,76(\text{TEMP})^2 + 194,42(\text{UMID}) + 3,92(\text{UMID})^2$$

(5)

Onde:

ATIV. AMILOG. = Atividade da amiloglucosidase (U/ g fécula de mandioca)

TEMP = Temperatura de fermentação (°C)

UMID = Umidade inicial do meio de fermentação (%)

Os resultados da análise de variância para a produção da amiloglucosidase mostram que as duas variáveis de processo estudadas foram significativas ($p < 0,05$): Temperatura (L), Temperatura (Q) e Umidade (L), conforme apresentado na Tabela 23 e no Gráfico Pareto da Figura 29, mostrando que o modelo obtido é quadrático. A interação dos fatores não consta no modelo apresentado pois o termo influenciou negativamente no R^2 e R^2_{aj} obtido, sendo ignorado alguns efeitos para obter um modelo com correlação mais próximo a correlação perfeita (R^2 e R^2_{aj} mais próximo de 1,0).

A Tabela 23 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da amiloglucosidase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,91724$ e $R^2_{aj} = 0,83449$ explica 83,45% da variação das respostas encontradas.

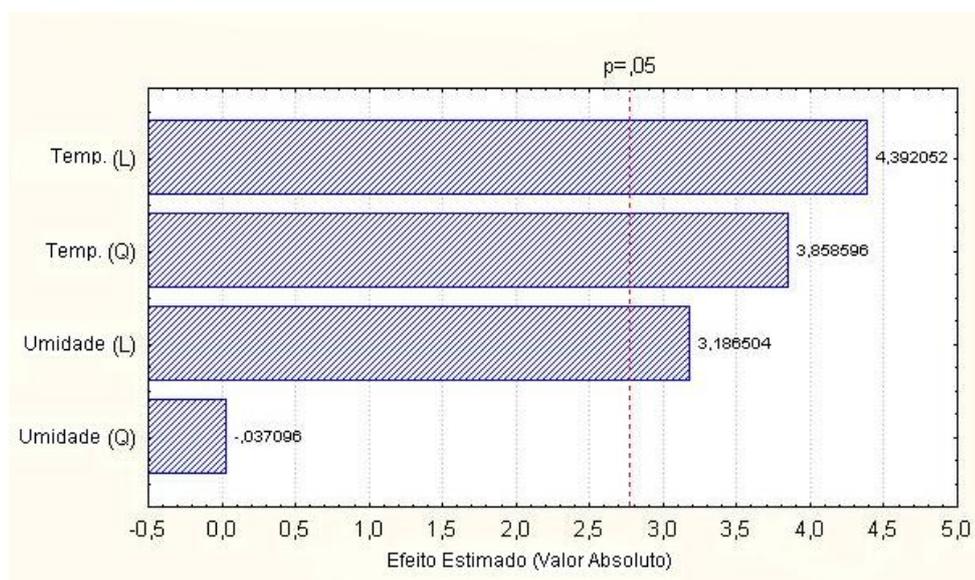
TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Temp. de ferm. (°C) (L)*	430844	1	430844,3	19,29012	,011764*
Temp. de ferm. (°C) (Q)*	332540	1	332540,2	14,88877	,018169*
Umidade (%) (L)*	226785	1	226785,1	10,15381	,033327*
Umidade (%) (Q)	31	1	30,7	0,00138	0,972186
Temp. (°C) (L+Q)	763385	2	381692,3	17,08944	0,010977
Umidade (%) (L+Q)	226816	2	113407,9	5,07759	0,079853
Erro experimental	89340	4	22335,0		
Total Soma dos quadrados	1079540	8			
R^2	0,91724				
R^2 ajustado	0,83449				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

A modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,9172$ e $R^2_{aj} = 0,8344$, podendo ser utilizada para fins preditivos.

FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E UMIDADE PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE



4.4.3 Influência da concentração de CaCO_3 , KNO_3 e solução salina

A Tabela 24 apresenta os resultados do delineamento fatorial $3^{(3-1)}$ fracionado, mostrando a influência da concentração de CaCO_3 , KNO_3 e da solução salina na produção de α -amilase e amiloglucosidase.

TABELA 24 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTUDANDO A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 , KNO_3 E SOLUÇÃO SALINA SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES	
	CaCO_3 (%)	KNO_3 (%)	SOLUÇÃO SALINA (%)	ATIV. DA α -AMILASE (U/g fécula de mandioca)	ATIV. DA AMILOGLUCOSIDASE (U/g fécula de mandioca)
1	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	135,845 \pm 3,21	324,529 \pm 7,39
2	0 (-1)	5 (0)	60 (+1)	513,599 \pm 7,05	929,645 \pm 16,02
3	0 (-1)	10 (+1)	30 (0)	949,370 \pm 6,73	1466,541 \pm 12,14
4	5 (0)	0 (-1)	60 (+1)	111,747 \pm 9,27	267,342 \pm 3,97
5	5 (0)	5 (0)	30 (0)	667,845 \pm 6,98	988,064 \pm 4,74
6	5 (0)	10 (+1)	0 (-1)	912,854 \pm 13,11	1321,524 \pm 23,52
7	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	83,512 \pm 6,06	107,721 \pm 3,29
8	10 (+1)	5 (0)	30 (+1)	220,642 \pm 7,21	367,021 \pm 8,55
9	10 (+1)	10 (+1)	60 (+1)	408,655 \pm 9,64	573,345 \pm 10,36

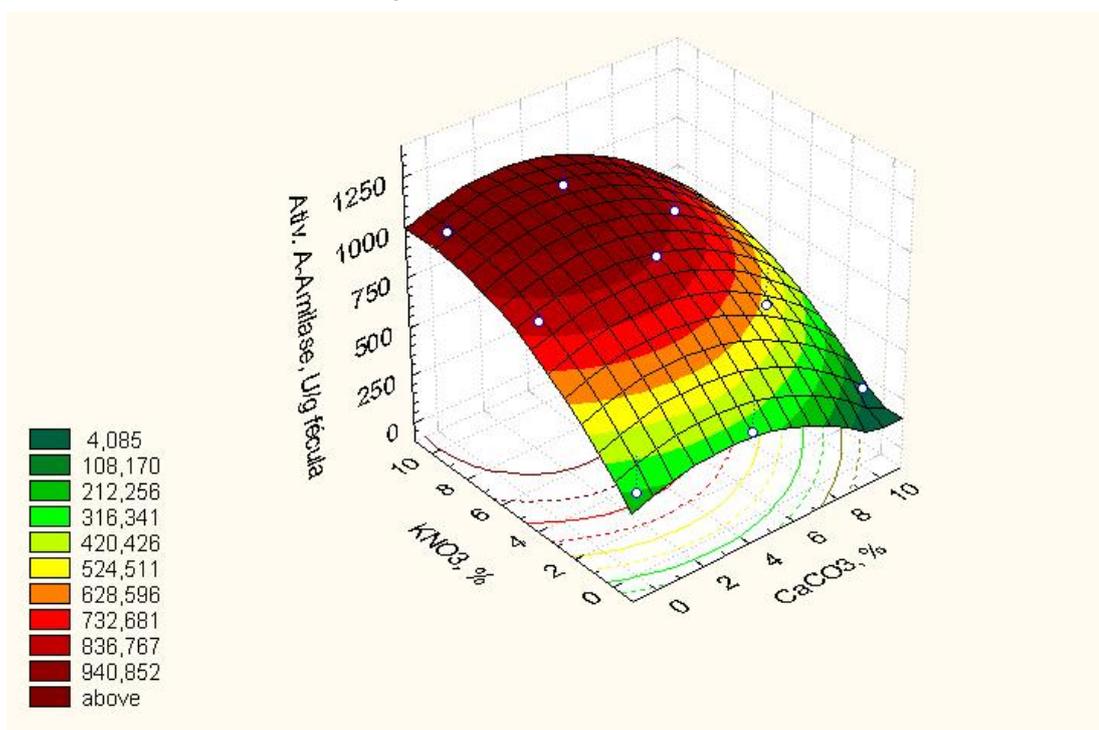
NOTA: Média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

Valores das variáveis descodificadas e em parênteses os níveis codificados (-1, 0, +1).

4.4.3.1 Influência do CaCO_3 e KNO_3 na produção de α -amilase

Os pontos visualizados sobre a superfície de resposta da Figura 30 indicam os resultados da produção de α -amilase (U/g fécula) para os ensaios realizados. A superfície mostra que quanto maior a concentração de KNO_3 , na faixa estudada (0-10%) maior a produção da α -amilase, utilizando concentrações de até 5% de CaCO_3 . A fonte de nitrogênio KNO_3 foi importante para a produção da enzima enquanto concentrações acima de 5% de CaCO_3 influenciaram negativamente a sua produção. Já a variável concentração de solução salina foi fixada no ponto central (nível 0 = 30%) não influenciando a produção de α -amilase e amiloglucosidase.

FIGURA 30 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DO CaCO_3 E KNO_3 NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE



NOTA: a variável solução salina foi fixada no ponto central

Os dados experimentais foram ajustados pela equação 6. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de KNO_3 linear, com coeficiente de maior valor absoluto (+89,34).

$$\text{ATIV. A-AMILASE } (\text{CaCO}_3, \text{KNO}_3) = 244,29 + 50,25(\text{CaCO}_3) - 7,85(\text{CaCO}_3)^2 + 89,34(\text{KNO}_3) - 2,32(\text{KNO}_3)^2 - 47,60$$

(6)

Onde:

ATIV. A-AMILASE = atividade da α -amilase (U/g fécula de mandioca)

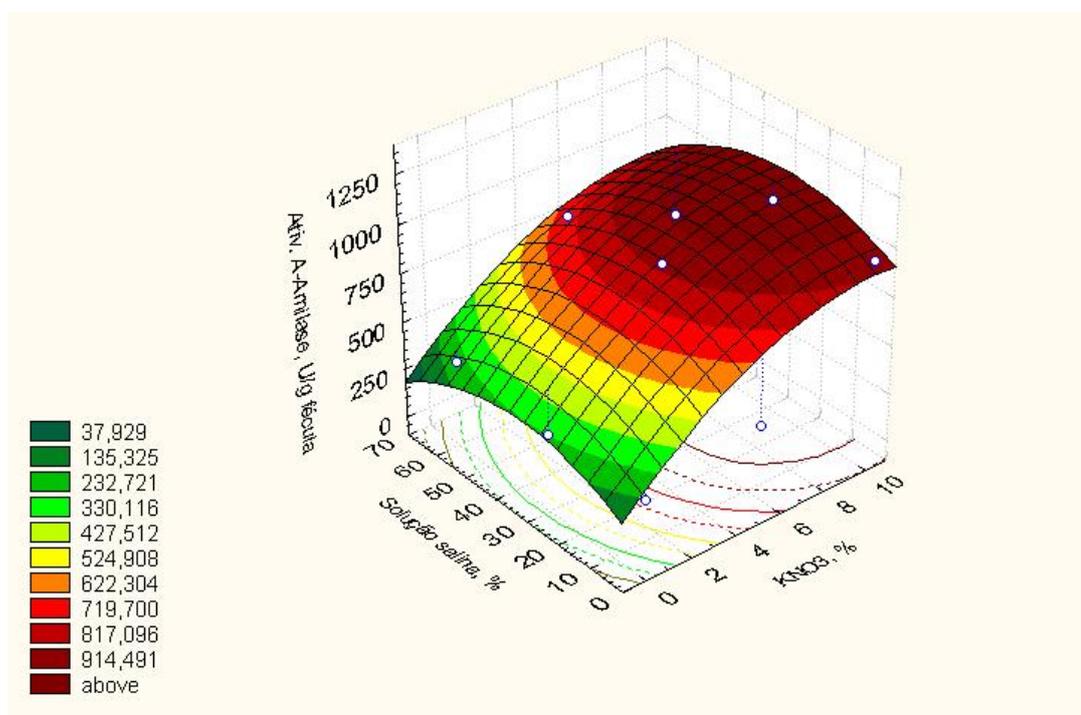
CaCO_3 = concentração de CaCO_3 (%)

KNO_3 = concentração de KNO_3 (%)

4.4.3.2 Influência do KNO_3 e da solução salina na produção da α -amilase

A Figura 31 apresenta a superfície de resposta mostrando os resultados da influência do KNO_3 e da solução salina na produção de α -amilase. A tendência da curva mostra que a maior produção de α -amilase foi alcançada com concentrações de KNO_3 superiores a 5% (nível codificado 0), enquanto a variação da concentração da solução salina não teve influência negativa sobre a produção nos níveis estudados 0% (-1), 30% (0) e 60% (+1). As porcentagens de KNO_3 e solução salina referem-se à quantidade de fécula adicionadas nas formulações. Ressalta-se que a variável concentração de CaCO_3 foi fixada no ponto central (nível 0 = 5%).

FIGURA 31 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DO KNO_3 E DA SOLUÇÃO SALINA NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE



NOTA: a variável CaCO_3 foi fixada no ponto central

Os dados experimentais foram ajustados pela equação 7. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de KNO₃ (mostrada na Tabela 25 e no Gráfico de Pareto da Figura 36), com coeficiente de maior valor absoluto (+ 89,34).

$$\text{ATIV. } \alpha\text{-AMILASE (KNO}_3, \text{ SS)} = 244,29 + 89,34(\text{KNO}_3) - 2,32(\text{KNO}_3)^2 - 0,279(\text{SS}) - 0,043(\text{SS})^2 + 54,87$$

(7)

Onde:

ATIV. A-AMILASE = atividade da α -amilase (U/g fécula de mandioca)

KNO₃ = concentração de KNO₃ (%)

SS = concentração da solução salina (%)

Os resultados da análise de variância para a produção da α -amilase mostram que a única variável de processo que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) foi a concentração de KNO₃ (L) conforme apresentado na Tabela 17 e no Gráfico de Pareto da Figura 36, mostrando que os modelos obtidos são quadráticos.

A Tabela 25 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da α -amilase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9539$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,8159$ explica 81,59% da variação das respostas encontradas.

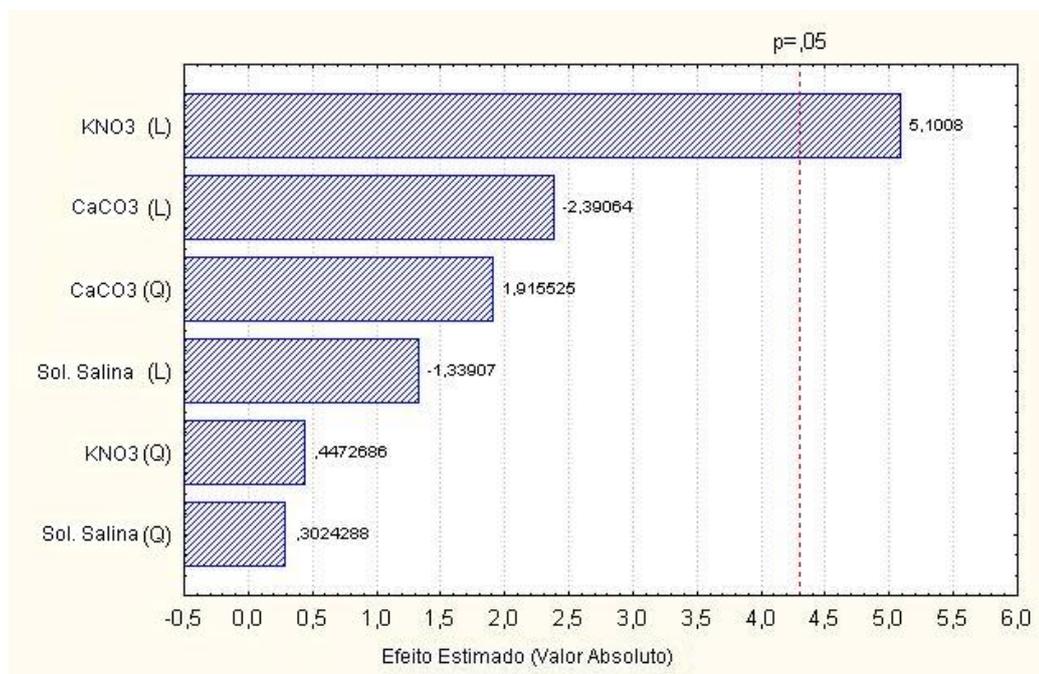
TABELA 25 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
CaCO ₃ (%) (L)	120134,9	1	120134,9	5,71516	0,139320
CaCO ₃ (%) (Q)	77128,8	1	77128,8	3,66924	0,195501
KNO ₃ (%) (L)*	546911,8	1	546911,8	26,01816	0,036352
KNO ₃ (%) (Q)	4205,1	1	4205,1	,20005	0,698455
Solução salina (%) (L)	37691,6	1	37691,6	1,79310	0,312449
Solução salina (%) (Q)	1922,6	1	1922,6	0,09146	0,790879
CaCO ₃ (%) (L+Q)	197263,7	2	98631,8	4,69220	0,175679
KNO ₃ (%) (L+Q)	562281,2	2	281140,6	13,37467	0,069567
Solução salina (%) (L+Q)	46795,2	2	23397,6	1,11309	0,473240
Erro experimental	42040,8	2	21020,4		
Total Soma quadrados	913621,6	8			
R ²	0,95398				
R ² ajustado	0,81594				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

A modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,9633$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,8533$, podendo ser utilizada para fins preditivos.

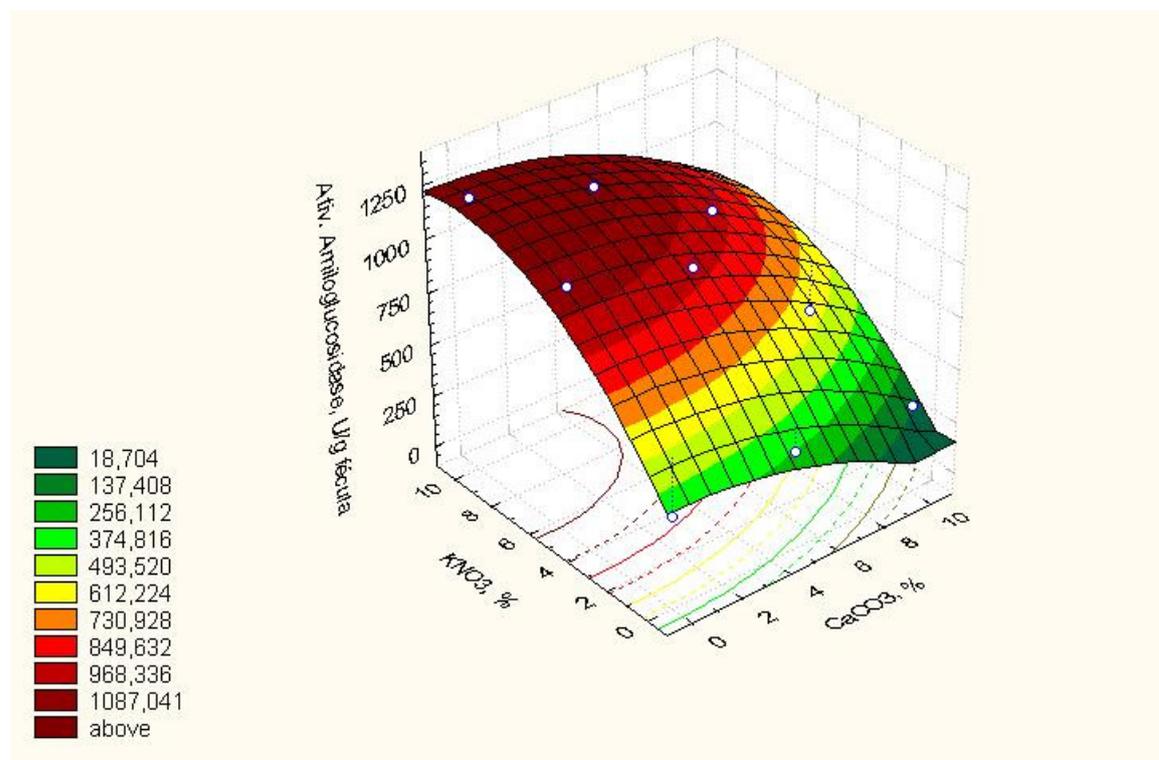
FIGURA 32 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 e KNO_3 PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE



4.4.3.3 Influência do CaCO_3 e KNO_3 na produção de amiloglucosidase

A Figura 37 apresenta a produção de amiloglucosidase variando-se as concentrações de CaCO_3 e KNO_3 nas fermentações. Salienta-se que a variável solução salina foi fixada no ponto central (nível 0 = 30%). Como pode ser observado, o comportamento desta curva é semelhante ao da Figura 35 (influência da concentração de CaCO_3 e de KNO_3 na produção de α -amilase). A partir desse aspecto pode-se admitir que a produção da α -amilase e amiloglucosidase foram superiores nas concentrações de CaCO_3 inferiores a 5% e quando as concentrações KNO_3 são maiores que 5%.

FIGURA 33 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 e KNO_3



NOTA: a variável solução salina foi fixada no ponto central.

A equação 8 representa o ajuste dos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de KNO_3 linear, com coeficiente de maior valor absoluto (+149,07).

$$\text{ATIV. AMILOG.}(\text{CaCO}_3, \text{KNO}_3) = 478,063 + 59,916(\text{CaCO}_3) - 11,23(\text{CaCO}_3)^2 + 149,07(\text{KNO}_3) - 5,66(\text{KNO}_3)^2 - 113,34$$

(8)

Onde:

ATIV. AMILOG. = atividade da amiloglucosidase (U/g fécula de mandioca)

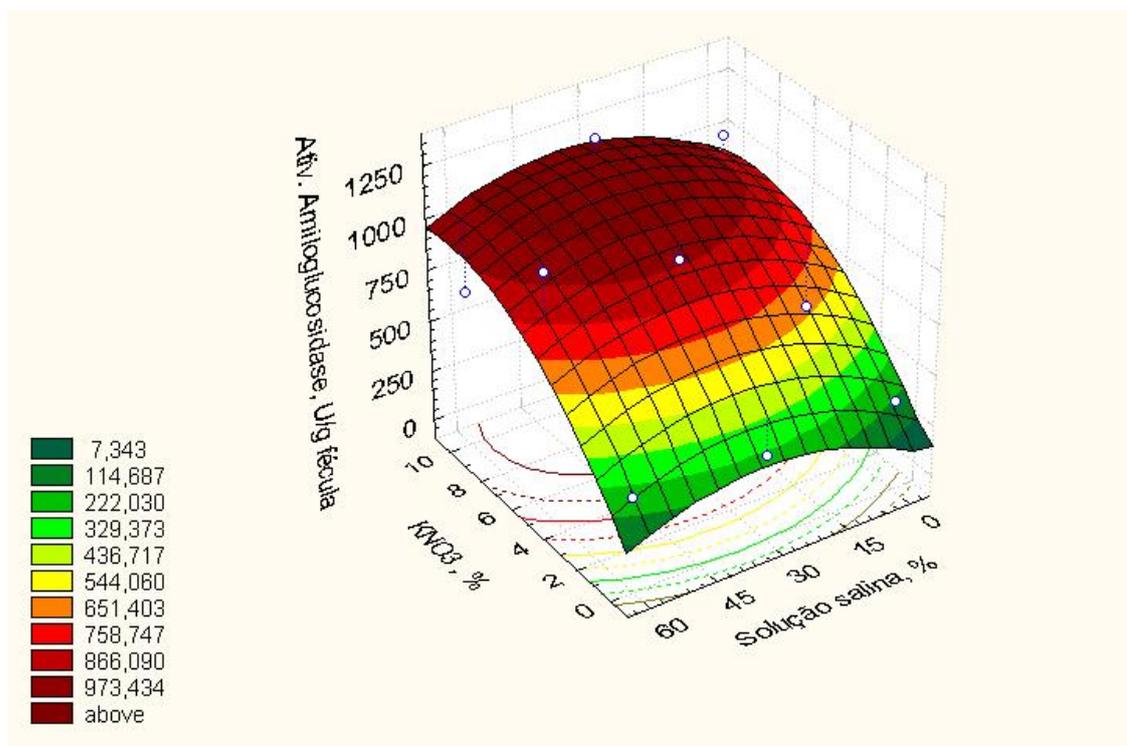
CaCO_3 = concentração de CaCO_3 (%)

KNO_3 = concentração de KNO_3 (%)

4.4.3.4 Influência do KNO_3 e solução salina na produção de amiloglucosidase

A Figura 34 apresenta a superfície de resposta para o modelo de produção de amiloglucosidase mostrando a influência das concentrações de KNO_3 e da solução salina. A variável CaCO_3 foi fixada no ponto central (nível 0 = 5%). Os pontos visíveis sobre a superfície indicam os resultados obtidos dos nove experimentos que constituem o delineamento fatorial $3^{(3-1)}$ fracionado. O gráfico apresenta uma região circular no topo da curva onde foi alcançada a máxima produção de amiloglucosidase (>1087 U/g fécula). As melhores condições alcançadas foram: concentração de KNO_3 (10%), concentração da solução salina (30%) e concentração de CaCO_3 (0%), obtendo-se atividade da amiloglucosidase igual a 1466,54 U/g fécula (Tabela 24).

FIGURA 34 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE KNO_3 E SOLUÇÃO SALINA NA PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE



NOTA: a variável CaCO_3 foi fixada no ponto central

A equação 9 foi ajustada aos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de KNO_3 linear, com coeficiente de maior valor absoluto (+158,55).

$$\text{ATIV. AMILOG. (K, S)} = 215,23 + 158,55(\text{KNO}_3) - 8,458(\text{KNO}_3)^2 + 14,50(\text{SS}) - 0,209(\text{SS})^2 - 128,96$$

(9)

Onde:

ATIV. AMILOG. = atividade da amiloglucosidase (U/g fécula de mandioca)

KNO_3 = concentração de KNO_3 (%)

SS = concentração de solução salina (%)

A Tabela 26 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da amiloglucosidase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,9628$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,8512$ explica 82,22% da variação das respostas encontradas. O Gráfico de Pareto da Figura 35 mostra que a variável que apresentou diferença significativa foi o termo linear KNO_3 .

FIGURA 35 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CaCO_3 e KNO_3 PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE

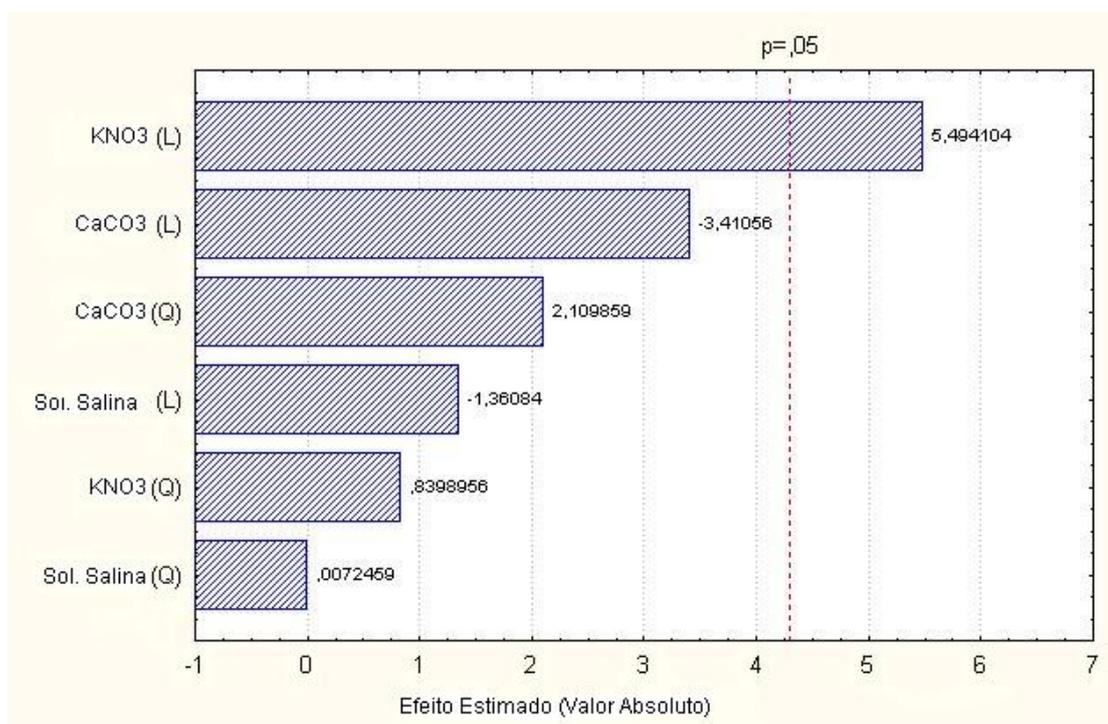


TABELA 26 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
CaCO ₃ (%) (L)	412193	1	412193	11,63189	0,076266
CaCO ₃ (%) (Q)	157746	1	157746	4,45150	0,169341
KNO ₃ (%) (L)*	1069656	1	1069656	30,18518	0,031568
KNO ₃ (%) (Q)	24998	1	24998	0,70542	0,489369
Solução salina (%) (L)	65625	1	65625	1,85189	0,306621
Solução salina (%) (Q)	2	1	2	0,00005	0,994876
CaCO ₃ (%) (L+Q)	569937	2	284969,4	8,04170	0,110599
KNO ₃ (%) (L+Q)	1080420	2	540209,9	15,24446	0,061559
Solução salina (%) (L+Q)	70188,	2	35093,9	0,99033	0,502428
Erro experimental	70873	2	35436		
Total Soma quadrados	1906241	8			
R ²	0,96282				
R ² ajustado	0,85128				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

Esta análise mostra que apenas o fator concentração de KNO₃ é estatisticamente significativo ao nível de 5% de significância, enquanto os fatores concentração de CaCO₃ e concentração de solução salina não apresentaram influência significativa nos modelos anteriormente apresentados, tanto para a produção de α -amilase como para a produção de amiloglucosidase.

A superfície de resposta para o modelo da influência da concentração de CaCO₃ em função da concentração da solução salina (fixando o fator concentração de KNO₃ no ponto central) para a produção de α -amilase não foi apresentada devido ao coeficiente de correlação R² apresentar valor equivalente a 0,66 (<0,80). Da mesma forma não foi apresentada a superfície de resposta para o modelo da influência da concentração de CaCO₃ em função da concentração da solução salina (fixando o fator KNO₃ (%) no ponto central) para a produção de amiloglucosidase pois o coeficiente de correlação R² deste modelo apresentar valor igual a 0,27. Em função de que os coeficientes de correlação sejam inferiores a 0,80 não foi possível apresentar os modelos pois estes não são estatisticamente válidos. De acordo com ZANGIROLAMI (1992) citado no item 2.8.3, quanto mais próximo o coeficiente de correlação estiver de 1,0 (correlação perfeita), melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

4.4.4 Influência da suplementação da FES com cálcio e fontes de nitrogênio (uréia e KNO_3)

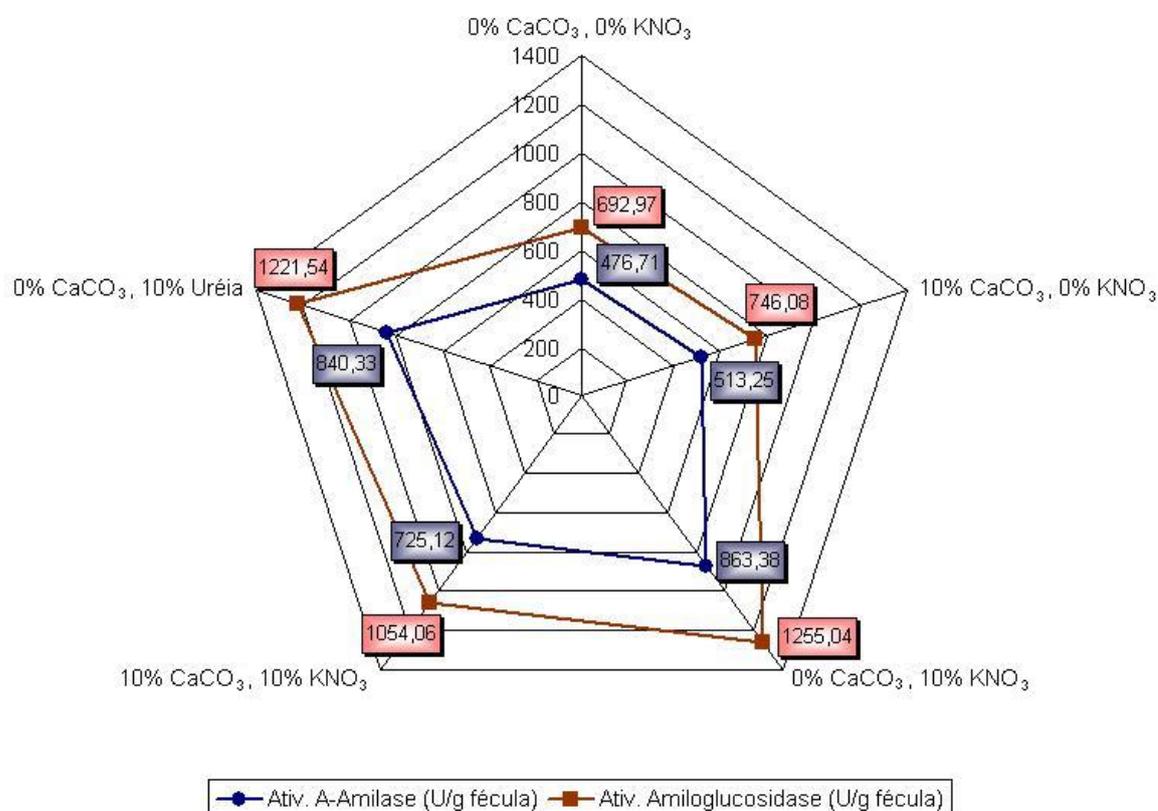
Como pode ser observado na Tabela 27, foram realizados cinco ensaios distintos para estudar a influência da suplementação da FES com fonte de cálcio e fonte de nitrogênio orgânico (uréia) e inorgânico na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase. O ensaio 1 mostra que a FES foi conduzida sem a suplementação com fonte de cálcio e fonte de nitrogênio, para a comparação com os ensaios suplementados com estas fontes de nutrientes. Os resultados da produção de α -amilase e amiloglucosidase (expressa em atividade enzimática média U/g fécula e desvio padrão) são mostrados na Tabela 27 e na Figura 39.

TABELA 27 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS COM A SUPLEMENTAÇÃO DE CÁLCIO E FONTES DE NITROGÊNIO

ENSAIO	CaCO_3 (%)	KNO_3 (%)	URÉIA (%)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/g fécula)	
				α -AMILASE	AMILOGLUCOSIDASE
1	0	0	0	476,71 \pm 1,51	692,97 \pm 2,19
2	10	0	0	513,25 \pm 2,72	746,08 \pm 3,96
3	0	10	0	863,38 \pm 5,76	1255,04 \pm 8,37
4	10	10	0	725,12 \pm 1,39	1054,06 \pm 2,02
5	0	0	10	840,33 \pm 1,18	1221,54 \pm 1,72

A Figura 36 apresenta os pontos circulares, identificados pela cor azul referem-se aos resultados da produção da α -amilase (expressos em U/g fécula) e os pontos quadrados, em vermelho, mostram os resultados da produção da amiloglucosidase em FES por *A. niger*. A máxima produção de α -amilase e amiloglucosidase foi alcançada nas condições do Ensaio 3 (0% CaCO_3 e 10 KNO_3) com atividade equivalente a 863,38 U/g fécula, e 1255,04 U/g fécula para a amiloglucosidase conforme a Tabela 27. A segunda maior produção destas enzimas foi alcançada no Ensaio 5 (0% CaCO_3 , 10% uréia), com os seguintes resultados: 840,33 U/g fécula (α -amilase) e 1221,54 U/g fécula (amiloglucosidase).

FIGURA 36 - RESULTADOS OBTIDOS DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS AA E AM POR FES MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DO CaCO_3 E DAS FONTES DE NITROGÊNIO (URÉIA E KNO_3)



Pode-se observar que com a suplementação de cálcio na forma do sal CaCO_3 , sem a adição de fonte de nitrogênio, a produção de α -amilase aumentou 9,74%, enquanto a produção de amiloglucosidase teve um aumento de apenas 7,66%. Suplementando a FES com fonte de nitrogênio orgânico (uréia), a produção de cada uma das enzimas aumentou em torno de 76%, quando comparada à produção sem a suplementação desta fonte. Quando adicionou-se fonte de nitrogênio inorgânico (KNO_3), obteve-se um aumento de 84,6% na produção de α -amilase e 81,11% na produção de amiloglucosidase. Com estes resultados verifica-se que a FES por *A.niger* LPB 28 apresentou maior produção das 2 enzimas (α -amilase: 863,38U/g; amiloglucosidase: 1255,04 U/g fécula) quando o meio foi suplementado pela fonte de nitrogênio inorgânico (10% de KNO_3). A produção das enzimas por FES com *A. niger* com suplementação de uréia (fonte de nitrogênio orgânico) apresentou a segunda maior produção das enzimas (α -amilase: 840,33 U/g fécula; amiloglucosidase: 1221,54 U/ g fécula). Juntamente com a suplementação com KNO_3 , o CaCO_3 apresentou efeito negativo na produção das enzimas, conforme mostrada na Figura 36 (ensaio com 10% CaCO_3 e 10% KNO_3).

Segundo GUPTA *et al.* (2003), fontes de nitrogênio orgânico são preferidas para a produção de α -amilase por bactérias. Em contrapartida, vários sais inorgânicos tais como sulfato de amônio, nitrato de amônio têm sido relatado para melhor produção de α -amilase por fungos.

Estudo realizado por Babu & Satyanarayana (1994) citado por PANDEY *et al* (2005) mostraram que o Ca^{2+} foi inibidor da produção de α -amilase por *Bacillus coagulans* assim como o Ca^{2+} não foi um elemento importante na produção de α -amilase por *G. thermoleovorans* nos estudos de NARANG & SATYANARAYANA (2001) também citado por PANDEY *et al* (2005). Apesar da inibição do Ca^{+2} para a produção de α -amilases, este elemento apresenta importância na estabilidade da enzima (PANDEY *et al*, 2005).

De acordo com SOCCOL *et al* (2005), a produção de amiloglucosidase por fungos, onde o substrato é suplementado com fontes de nitrogênio (natureza orgânica ou inorgânica), é praticada com sucesso para aumentar os rendimentos de amiloglucosidase em FES. As fontes de nitrogênio podem ser componentes como sais de nitrato, amônio ou uréia.

4.4.5 Influência da taxa de inoculação e da concentração de substrato

Para estudar a influência da taxa de inoculação (esporos/g MS) e a concentração de substrato (fécula de mandioca %) na produção de amilases, um delineamento fatorial 3^2 foi construído para verificar o efeito da combinação destas duas variáveis na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase. Conforme a Tabela 28, o substrato foi adicionado nas seguintes concentrações (0,5; 5,0; 9,5%) enquanto os valores da taxa de inoculação utilizados foram ($1,0 \times 10^7$; $5,5 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos/g MS).

TABELA 28 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3² COMPLETO

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES		VARIÁVEIS DEPENDENTES	
	FÉCULA DE MANDIOCA (%)	TAXA DE INOCULAÇÃO (esporos/g MS) (%)	ATIV. DA α -AMILASE (U/ g FM)	ATIV. DA AMILOGLUCOSIDASE (U/ g FM)
1	0,5 (-1)	$1,0 \times 10^7$ (-1)	420,889	611,821
2	0,5 (-1)	$5,5 \times 10^7$ (0)	418,710	608,654
3	0,5 (-1)	$1,0 \times 10^8$ (+1)	396,840	625,959
4	5,0 (0)	$1,0 \times 10^7$ (-1)	874,622	1271,385
5	5,0 (0)	$5,5 \times 10^7$ (0)	1109,861	1613,338
6	5,0 (0)	$1,0 \times 10^8$ (+1)	987,564	1486,451
7	9,5 (+1)	$1,0 \times 10^7$ (-1)	542,712	788,908
8	9,5 (+1)	$5,5 \times 10^7$ (0)	592,769	861,673
9	9,5 (+1)	$1,0 \times 10^8$ (+1)	563,993	780,595

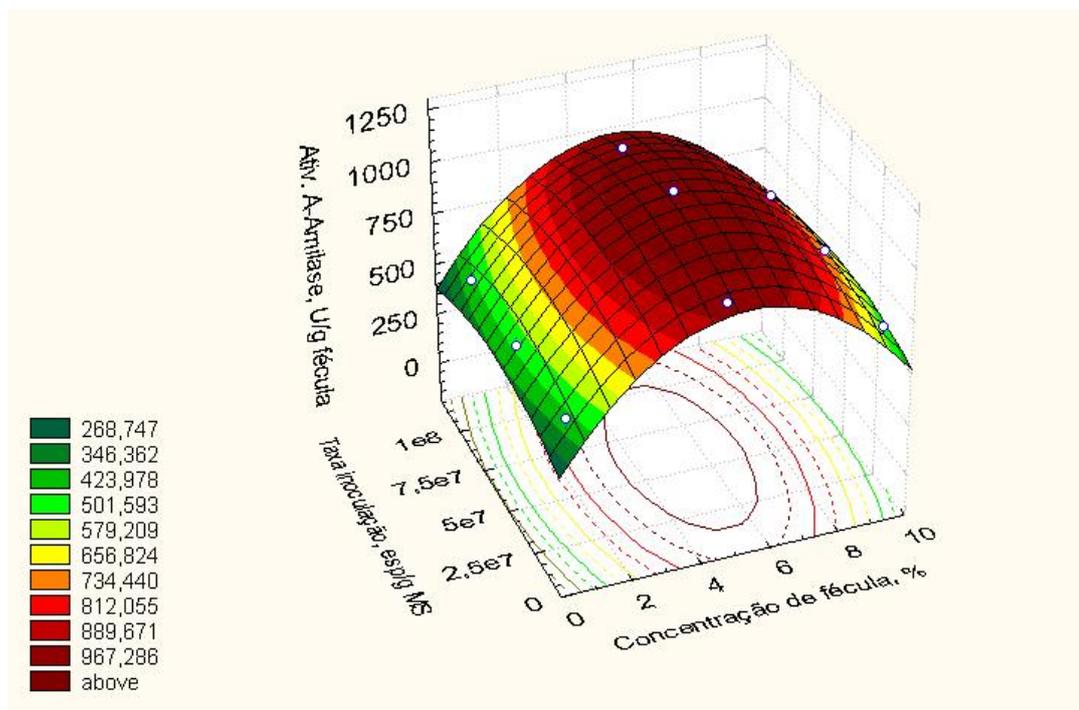
NOTAS: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

Valores das variáveis independentes codificados em parênteses.

MS = matéria seca (substrato + suporte). FM= fécula de mandioca

A superfície de resposta mostrada na Figura 37 apresenta os resultados para a produção da α -amilase (expressa em atividade enzimática, U/g fécula) quando variou-se as concentrações de substrato e taxa de inoculação nas FES por *A. niger*. A região circular e a central da curva mostram os maiores valores da produção α -amilase obtida (>967,28 U/g fécula). Observa-se que a concentração de substrato ideal neste estudo foi de 5% de fécula de mandioca, enquanto a taxa de inoculação não foi uma variável significativa neste processo, pois com a alteração das taxas de inoculação não houve diferenças significativas na produção da enzima. A máxima produção de α -amilase foi alcançada com os seguintes parâmetros: 5% fécula de mandioca e $5,5 \times 10^7$ esporos/g MS, atingindo uma produção de 1109,86 U/g fécula.

FIGURA 37 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA



A equação 10 foi ajustada aos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de fécula de mandioca (%), com coeficiente de maior valor absoluto (+264,74).

$$\text{ATIV.}\alpha\text{-AMILASE (FEC, INOC)} = 200,65 + 264,74(\text{FEC}) - 24,76(\text{FEC})^2 + (4,53 \times 10^{-6})(\text{INOC}) - (3,75 \times 10^{14})(\text{INOC})^2$$

(10)

Onde:

ATIV. A-AMILASE = atividade da α -amilase (U/g fécula de mandioca)

FEC = concentração de fécula de mandioca (%)

INOC = taxa de inoculação (esporos/g MS)

A Tabela 29 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da α -amilase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,972$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,9446$ explica 94,46% da variação das respostas encontradas. O Gráfico de Pareto da Figura 38 apresenta as variáveis que

apresentaram diferença significativa nesse estudo: termo quadrático e o termo linear da % fécula.

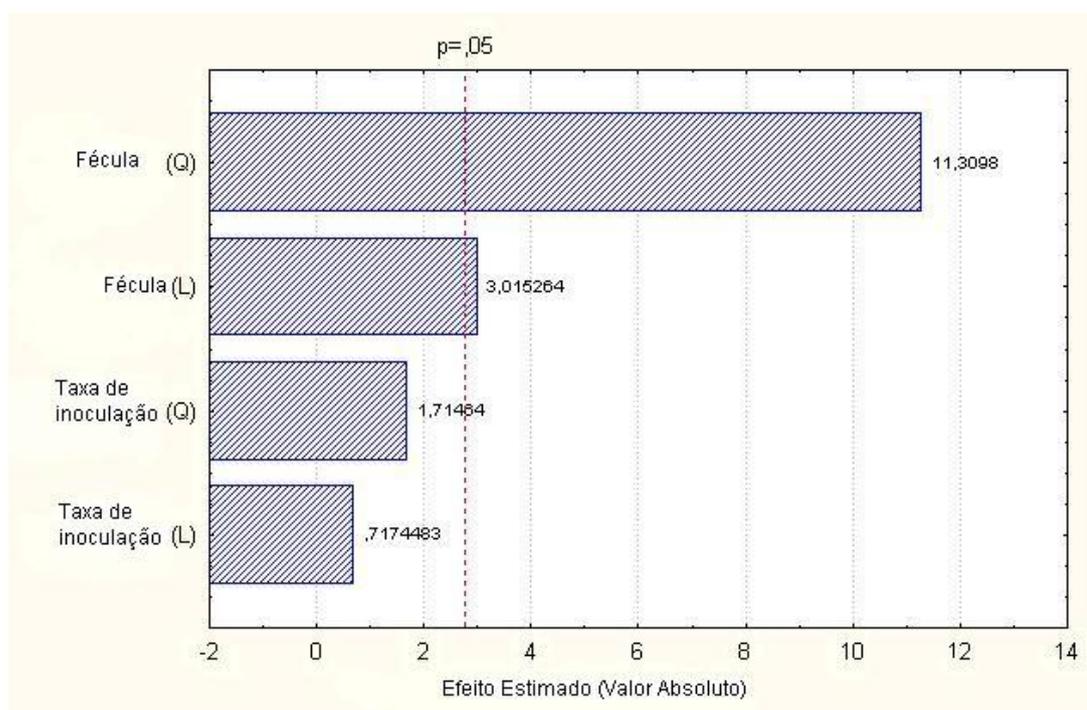
TABELA 29 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Fécula (%) (L)*	35733,6	1	35733,6	9,0918	0,039346
Fécula (%) (Q)*	502730,7	1	502730,7	127,9115	0,000348
Taxa inoculação (%) (L)	2023,1	1	2023,1	0,5147	0,512764
Taxa inoculação (%) (Q)	11555,0	1	11555,0	2,9400	0,161561
Fécula (%) (L+Q)	538464,3	2	269232,1	68,50167	0,000805
Taxa inoculação (L+Q)	13578,1	2	6789,0	1,72736	0,287910
Erro experimental	15721,2	4	3930,3		
Total Soma quadrados	567763,6	8			
R ²	0,97231				
R ² ajustado	0,94462				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

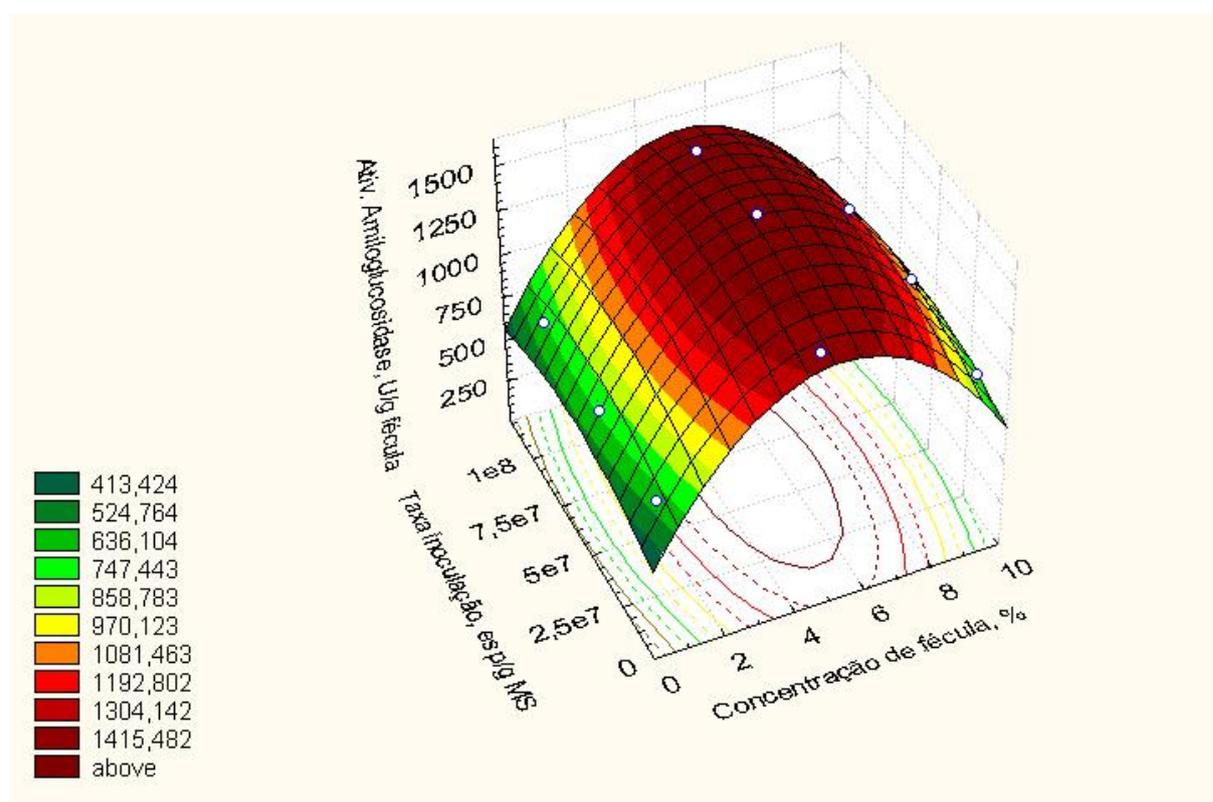
A modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,972$ e R^2 aj. = 0,9446, podendo ser utilizada para fins preditivos.

FIGURA 38 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA E DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE



A Figura 39 apresenta a superfície de resposta para o modelo de produção de amiloglucosidase mostrando os resultados da influência da taxa de inoculação e da concentração de substrato. Nesse estudo a curva se assemelha a curva da Figura 37 (produção de α -amilase), porém esta apresenta maior concavidade. A região ótima do gráfico indicada pela curva de nível circular apresentou valores de atividade de amiloglucosidase superiores a 1415,48 U/g fécula. A maior produção de amiloglucosidase (1613,33 U/g fécula) também foi alcançada com as mesmas condições obtidas para a maior produção de α -amilase (5% fécula e $5,5 \times 10^7$ esporos/g MS).

FIGURA 39 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMIOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA



A equação 11 foi ajustada aos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a concentração de fécula de mandioca (%), com coeficiente de maior valor absoluto (+389,12).

$$\text{ATIV. AMILOG. (FEC, INOC)} = 302,084 + 389,125(\text{FEC}) - 36,747(\text{FEC})^2 + (6,27 \times 10^{-6})(\text{INOC}) - (4,96 \times 10^{-14})(\text{INOC})^2$$

(11)

Onde:

ATIV. AMILOG. = atividade da amiloglicosidase (U/g fécula de mandioca)

FEC = concentração de fécula de mandioca (%)

INOC = taxa de inoculação (esporos/g MS)

A Tabela 30 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da α -amilase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,970$ e R^2 aj. = 0,9420 explica 94,20% da variação das respostas encontradas.

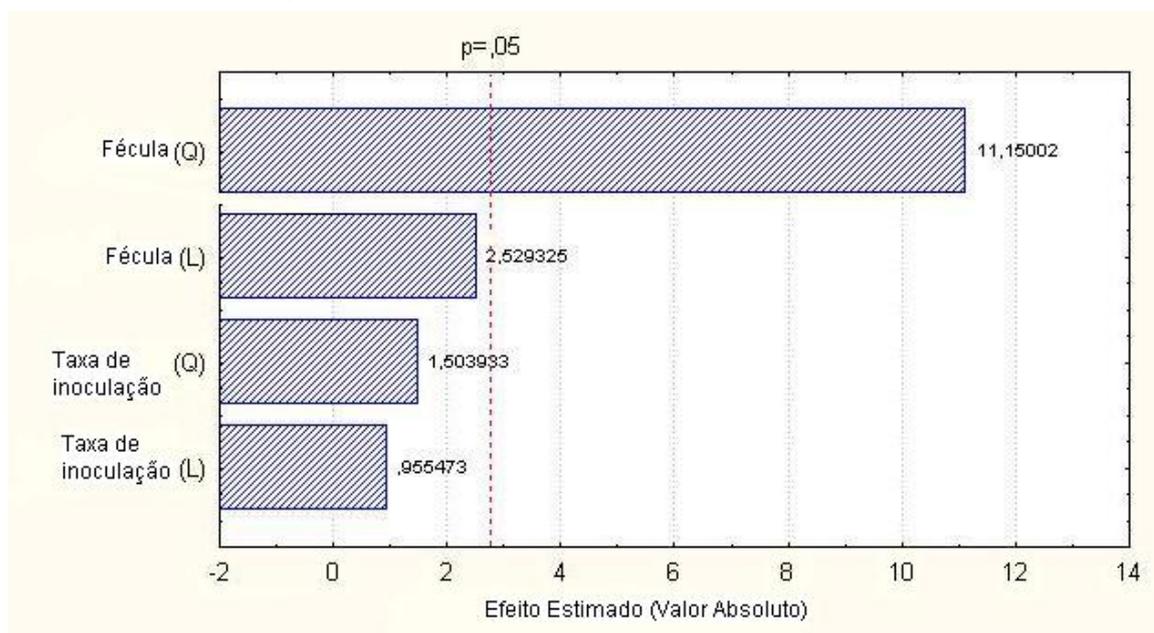
TABELA 30 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Fécula (%) (L)	56987	1	56987	6,3975	0,064711
Fécula (%) (Q)*	1107438	1	1107438	124,3233	0,000368*
Taxa inoculação (L)	8132	1	8132	0,9129	0,393443
Taxa inoculação (Q)	20148	1	20148	2,2618	0,207035
Fécula (%) (L+Q)	1164425	2	582212,6	65,36024	0,000882
Taxa inoculação (L+Q)	28280	2	14139,9	1,58737	0,310819
Erro experimental	35631	4	8907,7		
Total Soma quadrados	1228336	8			
R^2	0,97099				
R^2 ajustado	0,94198				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

A modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,97$ e R^2 aj. = 0,9420, podendo ser utilizada para fins preditivos. O Gráfico de Pareto da Figura 40 apresenta a variável que apresentou diferença significativa (% fécula – termo quadrático).

FIGURA 40 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÉCULA E DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE



4.4.6 Influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação

A Tabela 31 apresenta o delineamento fatorial 3^2 completo para o estudo da influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação na produção das amilases. As taxas de inoculação estudadas foram as mesmas apresentadas no item 4.4.5. As FES por *A. niger* foram conduzidas a 30°C nos seguintes tempos de fermentação (48; 54 e 60 horas).

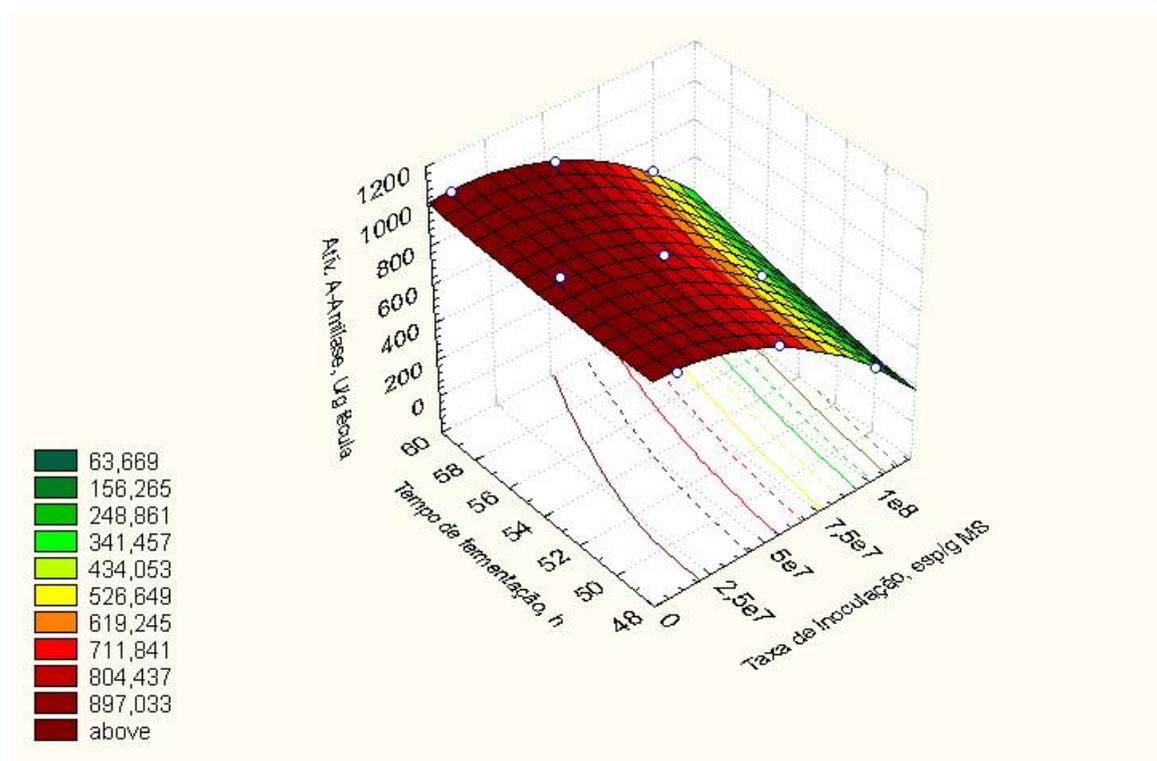
TABELA 31 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES		VARIÁVEIS DEPENDENTES	
	TAXA DE INOCULAÇÃO (esporos/g fécula) (%)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	ATIV. DA α -AMILASE (U/ g fécula de mandioca)	ATIV. DA AMILOGLUCOSIDASE (U/ g fécula de mandioca)
1	$1,0 \times 10^7$ (-1)	48 (-1)	903,517	1313,387
2	$1,0 \times 10^7$ (-1)	54 (0)	954,364	1402,625
3	$1,0 \times 10^7$ (-1)	60 (+1)	983,269	1429,319
4	$5,5 \times 10^7$ (0)	48 (-1)	734,042	1067,032
5	$5,5 \times 10^7$ (0)	54 (0)	774,062	1072,371
6	$5,5 \times 10^7$ (0)	60 (+1)	867,838	1261,523
7	$1,0 \times 10^8$ (+1)	48 (-1)	266,543	387,457
8	$1,0 \times 10^8$ (+1)	54 (0)	334,228	485,846
9	$1,0 \times 10^8$ (+1)	60 (+1)	521,642	915,257

NOTA: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

A tendência do gráfico da Figura 41 mostra que se de um lado taxas de inoculação mais baixas resultaram na maior produção das enzimas, de outro o aumento do tempo de fermentação houve um aumento da produção da α -amilase. Os ensaios realizados com a menor taxa de inoculação ($1,0 \times 10^7$ esporos/g fécula) resultaram em valores superiores a 897,03 U/g fécula de α -amilase. A maior produção de α -amilase foi alcançada em 60 horas de fermentação e com taxa de inoculação de $1,0 \times 10^7$ esporos/g fécula.

FIGURA 41 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO



A equação 12 foi ajustada aos dados experimentais.

$$\text{ATIV. A-AMILASE}(\text{INOC}, \text{TEMPO}) = 2754,04 - 7,99 \times 10^{-6}(\text{INOC}) - 6,48 \times 10^{-14}(\text{INOC})^2 - 71,68(\text{TEMPO}) + 0,702(\text{TEMPO})^2 + 1,62 \times 10^{-7}(\text{INOC})(\text{TEMPO})$$

(12)

Onde:

ATIV. A-AMILASE = atividade da α -amilase (U/g fécula de mandioca)

INOC = taxa de inoculação (esporos/g MS)

TEMPO = tempo de fermentação (horas)

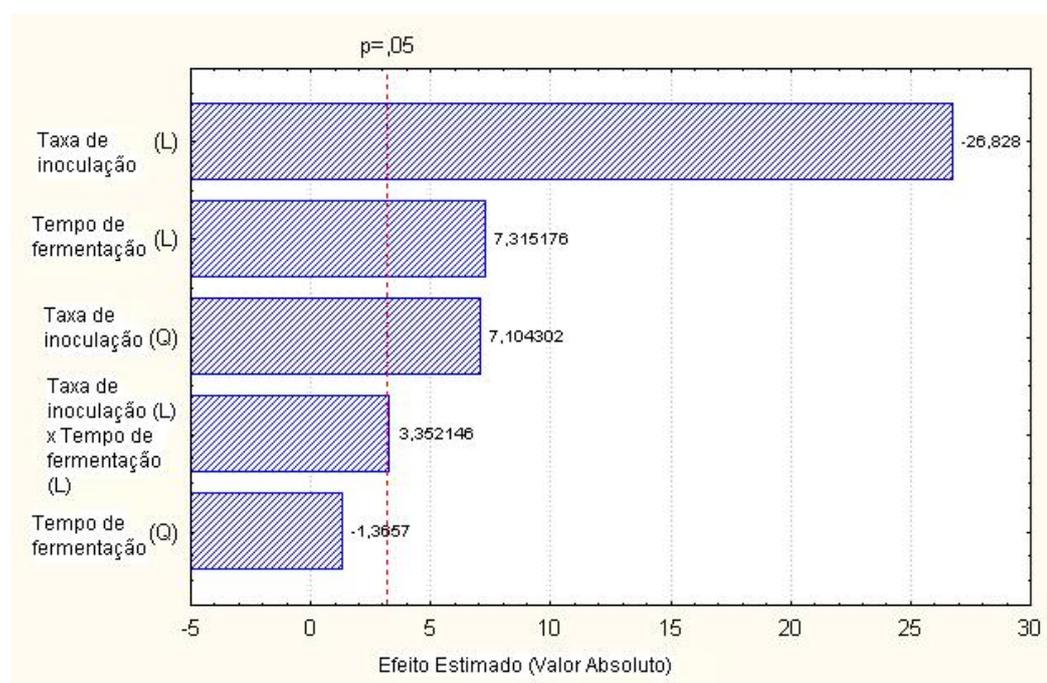
A Tabela 32 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da α -amilase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,996$ e R^2 aj. = 0,9905 explica 99,05% da variação das respostas encontradas. O coeficiente de correlação se aproximou do valor para a correlação perfeita ($R^2=1$). Esta modelagem mostrou-se adequada, podendo ser utilizada para fins preditivos. O Gráfico de Pareto da Figura 42 mostra os efeitos significativos das variáveis: taxa de inoculação e tempo de fermentação.

TABELA 32 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Taxa inoculação (%) (L)*	492342,9	1	492342,9	719,7273	0,000114*
Taxa inoculação (%) (Q)*	34524,9	1	34524,9	50,4700	0,005738*
Tempo fermentação (h)(L)*	36605,3	1	36605,3	53,5111	0,005276*
Tempo fermentação (h)(Q)	1275,8	1	1275,8	1,8651	0,265418
(Taxa inoculação (%) L x Tempo de fermentação (h) L)*	7686,6	1	7686,6	11,2367	0,043990*
Erro experimental	2052,2	3	684,1		
Total Soma quadrados	574487,8	8			
R^2	0,99643				
R^2 ajustado	0,99047				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade

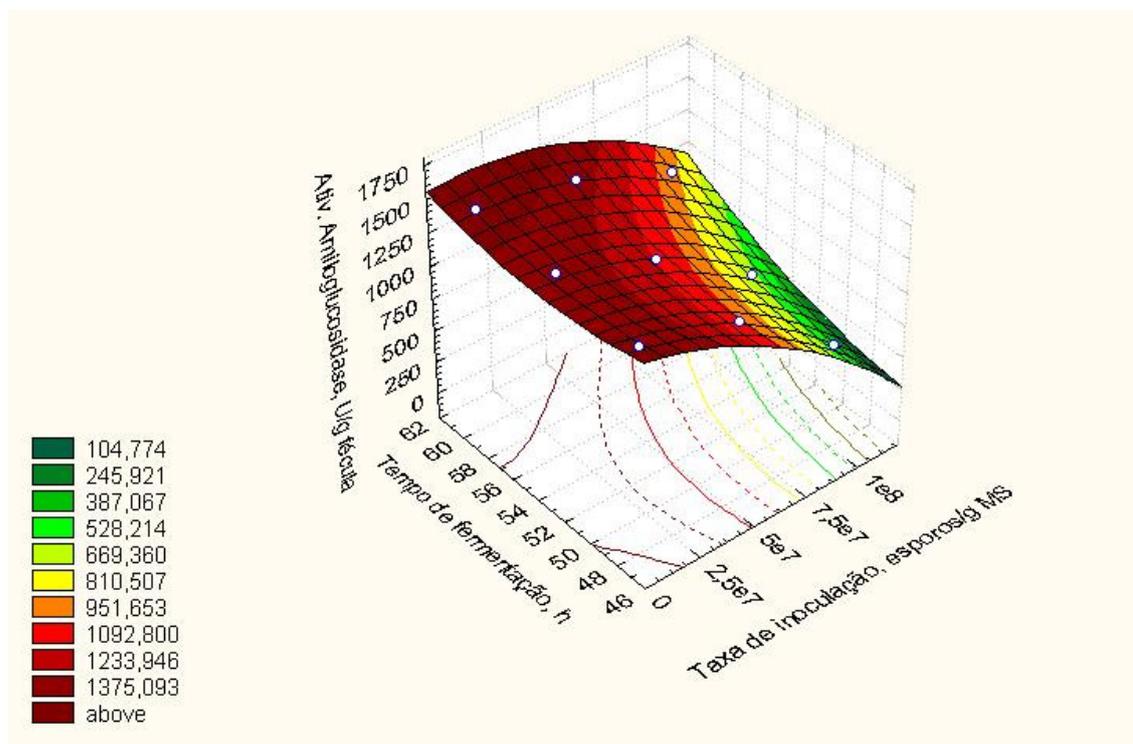
FIGURA 42 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE



A superfície de resposta da Figura 43 apresenta o modelo de produção da amiloglucosidase mostrando os resultados da influência da taxa de inoculação e do tempo de fermentação. Observa-se que a curva apresenta uma tendência de elevação quando se aumenta o tempo de fermentação, mostrando uma maior produção de amiloglucosidase no tempo acima de 54 horas. A maior produção de amiloglucosidase foi alcançada com a taxa de inoculação de $1,0 \times 10^7$ esporos/g fécula e 60 horas de fermentação.

Ao estudar a influência da taxa de inoculação na produção de α -amilase e amiloglucosidase de *Rhizopus arrhizus* ATCC 34612 sobre mandioca crua, SOCCOL (1992) concluiu que a concentração de 2×10^6 a 2×10^7 esporos/g meio era a melhor para as condições de processo. AURIA *et al* (1992) utilizou a concentração inicial de esporos equivalente a 1×10^8 esporos/g meio em FES por *Aspergillus niger*. Já RAIMBAULT & ALAZARD (1980) utilizaram concentração inicial de 2×10^7 esporos/g meio em FES por *A. niger*. Da mesma forma ORIOL *et al* (1988) trabalhando com *A. niger*, descreveram que taxas de inoculação em torno de 10^6 a 10^7 esporos/g de suporte (bagaço de cana) são suficientes para um bom crescimento dessa espécie de fungo.

FIGURA 43 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO



A equação 13 foi ajustada aos dados experimentais.

$$\text{ATIV. AMILOG. (IN, T)} = 7328,55 - 2,15 \times 10^{-5}(\text{INOC}) - 7,14 \times 10^{-14}(\text{INOC})^2 - 223,83(\text{TEMPO}) + 2,094(\text{TEMPO})^2 + 3,81 \times 10^{-7}(\text{INOC})(\text{TEMPO}) \quad (13)$$

Onde:

ATIV. AMILOG. (INOC, TEMPO) = atividade da amiloglucosidase (U/g fécula de mandioca)

INOC = taxa de inoculação (esporos/g MS)

TEMPO = tempo de fermentação (horas)

A Tabela 33 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da amiloglucosidase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,9839$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,9572$ explica 95,72% da variação das respostas encontradas.

TABELA 33 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Taxa inoculação (%) (L)*	925732,	1	925731,7	149,4047	0,001179*
Taxa inoculação (%) (Q)*	41853,	1	41853,5	6,7548	0,080446*
Tempo fermentação (h)(L)*	117102,	1	117101,8	18,8992	0,022475*
Tempo fermentação (h)(Q)	11365,	1	11364,7	1,8342	0,268616
Taxa inoculação (%) L x Tempo fermentação (h) L*	42408,	1	42407,9	6,8443	0,079264*
Erro experimental	18588,	3			
Total Soma quadrados	1157048,	8			
R^2	0,98393				
R^2 ajustado	0,9572				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.7 Influência da taxa de inoculação

De acordo com SOCCOL (1994) e RAIMBAULT & ALAZARD (1980), a taxa de inoculação dos esporos deve ser suficiente para assegurar uma inoculação homogênea do substrato e também um início de crescimento rápido de modo a evitar uma eventual competição com os contaminantes. No entanto, a taxa de inoculação não deverá ser muito elevada, pois uma alta densidade de esporos pode provocar fenômenos de inibição e redução da porcentagem de germinação. ORIOL (1987) trabalhando com *Aspergillus niger* descreveu que taxas de inoculação de cerca de 10^6 a 10^7 esporos/g bagaço de cana são suficientes para um bom crescimento dessa espécie de fungo. Laukevics *et al* (1985) citado por SOCCOL (1992) assinalaram que os fenômenos de interferência no crescimento poderão ter lugar com elevadas taxas de inoculação. Barros-Gonzales *et al* (1989) também citados por SOCCOL (1992) observaram fenômenos de inibição da germinação dos esporos quando taxas de inoculações superiores a 10^8 esporos/g substrato foram utilizadas.

Um estudo foi realizado com o intuito de verificar a influência da taxa de inoculação na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase por FES com *A. niger*. Este estudo foi constituído de 4 ensaios, com as seguintes taxas de inoculação (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/g fécula), conforme mostrado na Tabela 34.

TABELA 34 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE POR FES COM *A. NIGER* COM DIFERENTES TAXAS DE INOCULAÇÃO

ENSAIO	TAXA DE INOCULAÇÃO (esporos/g fécula)	α -AMILASE (U/ g fécula de mandioca)	α -AMILASE (U/ g MS)	AMILOGLUCOSIDASE (U/ g fécula de mandioca)	AMILOGLUCOSIDASE (U/ g MS)
1	$1,0 \times 10^5$	1732,95 \pm 20,0	1155,03 \pm 13,33	2044,94 \pm 23,61	1362,98 \pm 15,73
2	$1,0 \times 10^6$	1536,04 \pm 4,0	1023,79 \pm 2,67	1812,58 \pm 4,72	1208,11 \pm 3,15
3	$1,0 \times 10^7$	1437,87 \pm 12,49	958,36 \pm 8,33	1696,74 \pm 14,74	1130,90 \pm 9,83
4	$1,0 \times 10^8$	1417,08 \pm 10,39	944,50 \pm 6,93	1672,21 \pm 12,27	1114,55 \pm 8,18

NOTAS: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.
MS = matéria seca

Condições de cultura já otimizados: 90% umidade; temperatura de fermentação 30°C; proporção fécula de mandioca/bagaço de cana (FM/BC) 2/1 ; 60 horas de fermentação; 10% KNO₃.

Dentre as taxas estudadas, a menor ($1,0 \times 10^5$ esporos/g fécula) apresentou maior produção da α -amilase (1732,95 U/g fécula) e amiloglucosidase (2044,94 U/g fécula). A segunda maior produção (11,36% menor) foi alcançada com taxa de $1,0 \times 10^5$ esporos/g fécula. As taxas 10^7 e 10^8 apresentaram resultados semelhantes com menor produção amilásica, 17,03% e 18,23%, respectivamente menor quando comparada a maior produção.

TUNGA & TUNGA (2003) estudaram o efeito da taxa de inoculação na produção de amilase extracelular por FES com *A. oryzae*, indicando que a maior produção de amilase (1500 U/g farelo de trigo) foi alcançada com taxa de 4×10^5 esporos/ g farelo de trigo, 30°C temperatura de fermentação e 72 horas de fermentação.

Ao estudar a taxa de inoculação (10^5 a 10^7 esporos/g meio) na produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 por FES de farelo de arroz, COSTA (1996) obteve a maior produção, expressa em atividade (588,05 U/ g farelo de arroz) à taxa de 10^5 esporos/g meio) com 96 horas de fermentação, 30°C a temperatura de fermentação e 60% de umidade. Outro estudo demonstrado pelo mesmo autor, mostra que a produção de amiloglucosidase, expressa em atividade de 807,55 U/g farelo de arroz, foi alcançada com uma taxa de inoculação de 10^6 esporos/g meio, porém com o tempo de fermentação mais elevado (132 horas). As diferenças nas atividades da amiloglucosidase obtidas por FES com *A. niger* neste estudo bem como nos estudos de COSTA (1996) podem estar relacionadas às diferenças nas linhagens de *A. niger* utilizadas, nas fontes de amido empregadas na FES e nas demais condições de cultivo.

4.4.8 Influência do pH inicial da FES

A Tabela 35 apresenta os resultados da produção de α -amilase e amiloglucosidase pela FES com *A. niger* variando-se o pH inicial do meio fermentativo nos seguintes valores: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 realizadas em duplicata.

TABELA 35 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE VARIANDO-SE O pH INICIAL DA FERMENTAÇÃO

ENSAIO	pH _i	ATIVIDADE ENZIMÁTICA			
		α -AMILASE		AMILOGLUCOSIDASE	
		U/g FM	U/g MS	U/g FM	U/g MS
1	4,0	615,29 ± 8,73	308,29 ± 4,38	894,42 ± 12,69	448,15 ± 6,36
2	5,0	577,79 ± 8,99	289,51 ± 4,51	839,91 ± 13,06	420,84 ± 6,54
3	6,0	587,34 ± 6,58	294,29 ± 3,30	853,78 ± 9,57	427,79 ± 9,57
4	7,0	526,66 ± 1,65	263,88 ± 0,83	765,58 ± 2,40	383,6 ± 1,20
5	8,0	322,30 ± 6,75	161,49 ± 3,38	468,52 ± 9,81	234,75 ± 4,91

NOTAS: média das atividades enzimáticas ± desvio padrão.

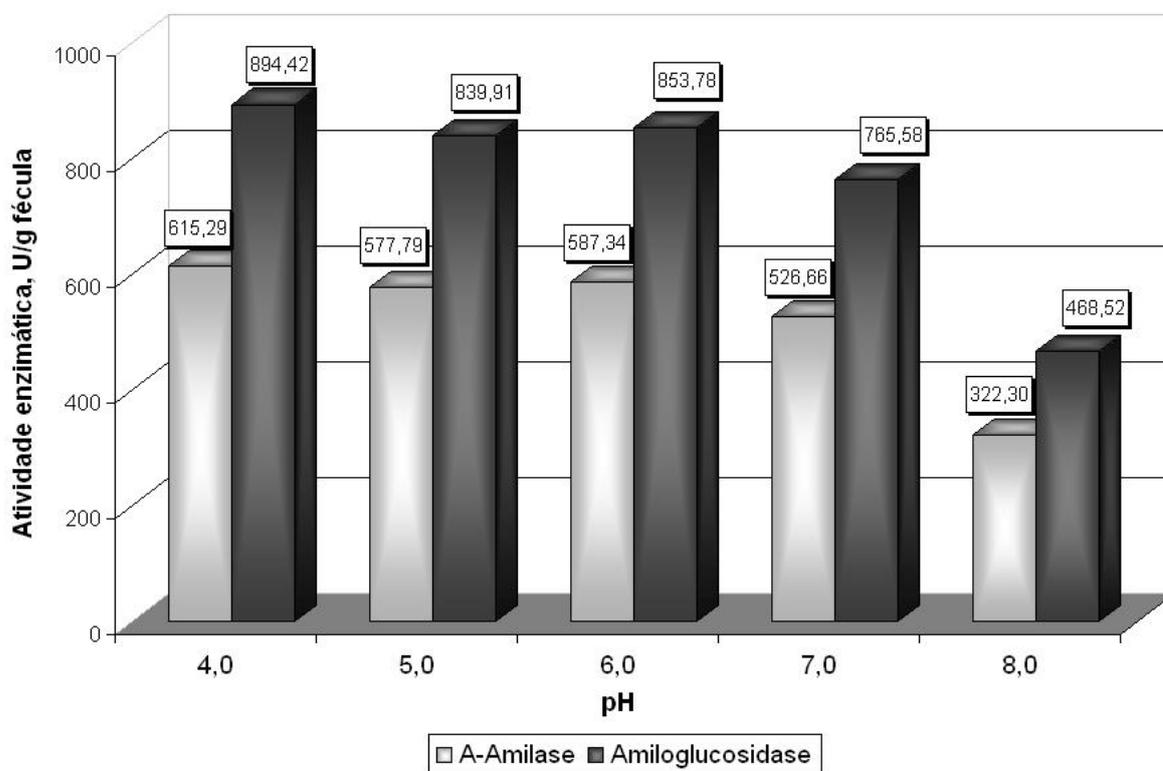
pH_i = pH inicial

MS = matéria seca. FM= fécula de mandioca

Condições de cultura já otimizados: 90% umidade; temperatura de fermentação 30°C; proporção fécula de mandioca/bagaço de cana (FM/BC) 1,5/1 ; 60 horas de fermentação.

A Figura 44 apresenta o gráfico de barras com os resultados da produção das amilases nos diferentes valores de pH iniciais de fermentação 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. Como pode ser observado, a faixa de valores de pH iniciais das fermentações entre 4,0 e 6,0 resultou em maior produção tanto da α -amilase como da amiloglucosidase. O pH inicial igual a 7,0 teve a produção das enzimas declinada e em pH 8,0 a produção diminuiu drasticamente 46,82% (amiloglucosidase) e 48,53% (α -amilase) quando comparada à produção máxima (pH=4,0). A maior produção amilolítica foi alcançada em pH inicial igual a 4,0 com os seguintes resultados (α -amilase: 615,29 U/g fécula; amiloglucosidase: 894,42 U/g fécula).

FIGURA 44 - RESULTADOS OBTIDOS DE ATIVIDADE DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE FERMENTAÇÃO



Nesse estudo foi verificado que nas FES, o *A. niger* tem maior preferência para crescimento e principalmente para a produção de amilases em condições ácidas. Conforme SOCCOL (1992), o fungo tem uma capacidade de crescimento, embora limitada, em condições extremas de acidez e alcalinidade. Essa característica é de extrema importância para os processos fermentativos pois mostram que nessas condições a grande maioria das bactérias responsáveis pelas contaminações dos processos fermentativos são inibidas.

COSTA (1996) estudou a influência do pH na produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 por FES de farelo de arroz, obtendo o pH ótimo de produção da enzima equivalente a 4,6. Comparando os resultados desse autor com os resultados do presente trabalho, verificou-se que o fungo *A. niger* tem preferência por pH em torno de 4,0 para a produção de amiloglucosidase.

4.4.9 Influência da agitação, tempo e temperatura no processo de extração das enzimas produzidas

Com o intuito de otimizar o processo de extração das enzimas produzidas, avaliou-se a influência das condições de agitação, tais como: equipamento de agitação, tempo de agitação e temperatura de extração.

SOCCOL (1992) utilizou o equipamento ultra turrax para a extração das enzimas a partir de fermentação sólida. De outro lado, ao extrair a enzima amiloglucosidase da fermentação semi-sólida de farelo de arroz, COSTA (1996) utilizou o agitador tipo shaker à velocidade de 220 rpm e 30°C por 3 horas.

A Tabela 36 mostra as condições de agitação estudadas e os resultados da atividade do extrato enzimático dosados em cada caso. Dois conjuntos de testes foram realizados. O primeiro conjunto foi realizado no agitador tipo *shaker* a 30°C, em velocidade de 120 rpm nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. O segundo conjunto de testes foi realizado em agitador Ultra turrax à temperatura ambiente, em velocidade moderada nos seguintes tempos: 15, 30, 45 e 60 minutos.

TABELA 36 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS COM VARIAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO (EQUIPAMENTO, TEMPO E TEMPERATURA)

EQUIPAMENTO	TEMPO DE AGITAÇÃO (min)	ATIVIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO (U/g fécula)	
		α -AMILASE	AMILOGLUCOSIDASE
SHAKER (30°C)	30	923,45 \pm 2,70	1342,37 \pm 3,93
	60	915,61 \pm 2,57	1330,97 \pm 3,74
	90	949,11 \pm 2,04	1385,48 \pm 2,97
	120	929,59 \pm 1,77	1351,29 \pm 2,57
ULTRA TURRAX (temp. ambiente)	15	919,70 \pm 1,18	1336,92 \pm 1,72
	30	934,02 \pm 3,12	1357,73 \pm 4,54
	45	946,02 \pm 7,27	1375,17 \pm 10,57
	60	953,33 \pm 8,87	1379,98 \pm 12,89

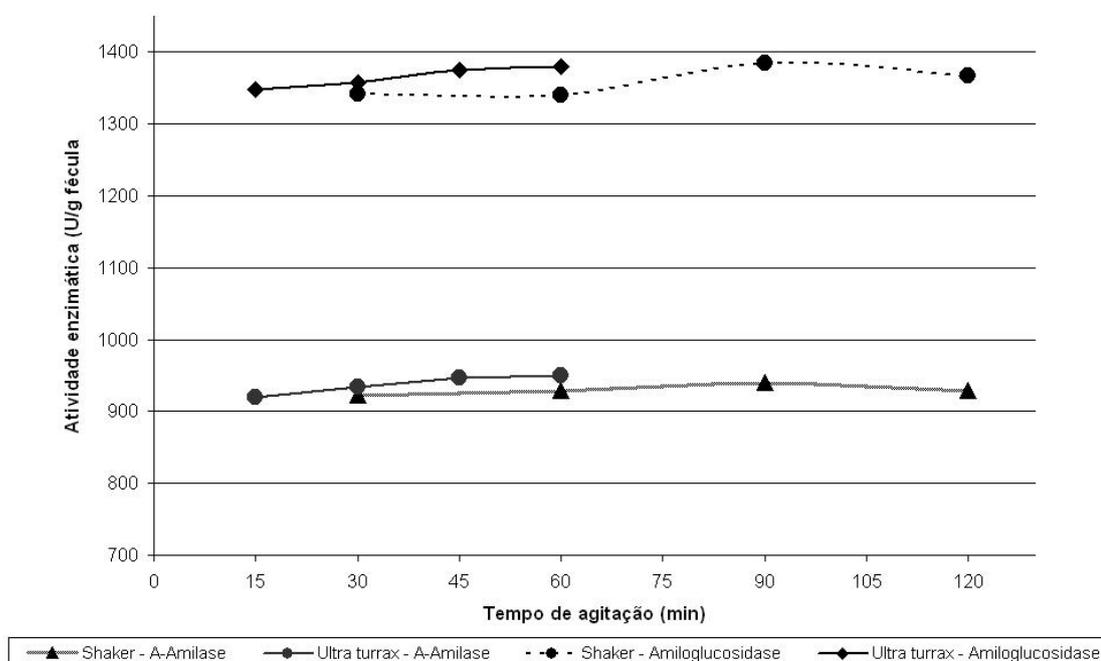
NOTA: média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

A Figura 45 apresenta os resultados do estudo das condições de agitação, tempo e temperatura na extração das enzimas α -amilase e amiloglucosidase produzidos por *A. niger* LPB 28 por FES de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar. Pode-se observar quatro seqüências de resultados. As duas seqüências em torno dos valores de atividade 900 U/g fécula representam as atividades da α -

amilase extraídas no agitador tipo *shaker* (pontos triangulares) e no ultra turrax (pontos circulares). Verifica-se que os resultados da extração foram semelhantes quando a agitação foi realizada em equipamentos diferentes. Observou-se um leve acréscimo nos valores da atividade α -amilásica quando aumentados os tempos de agitação. A extração máxima de α -amilase (953,33 U/g fécula) foi alcançada com as seguintes condições de agitação: agitador do tipo ultra turrax (velocidade moderada), temperatura ambiente, tempo de agitação de 60 minutos. A extração máxima de amiloglucosidase (1385,48 U/g fécula) foi alcançada com as seguintes condições de agitação: agitador do tipo *shaker* (120 rpm), temperatura de agitação (30°C), 90 minutos de agitação.

Da mesma forma que a otimização da extração é necessária, é importante considerar o fator tempo de processo. Para obter uma extração elevada e ao mesmo tempo com o menor tempo possível, sugere-se o uso do equipamento ultra turrax para a extração das duas enzimas simultaneamente num tempo de 60 minutos à temperatura ambiente, em velocidade moderada (Figura 45).

FIGURA 45 - RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO



4.5 Estudo da influência dos parâmetros de dosagem da atividade enzimática

Um estudo foi realizado com o objetivo de verificar qual a melhor temperatura de incubação das enzimas, bem como o pH ideal para a dosagem da atividade enzimática. O item 4.5.1 apresenta os resultados deste estudo.

4.5.1 Influência da temperatura e do pH de incubação das enzimas

A Tabela 37 mostra as combinações dos valores descodificados dos fatores temperatura e pH constituindo o delineamento fatorial 3² completo, bem como os resultados da atividade da α -amilase e amiloglucosidase obtidas no presente estudo.

TABELA 37 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS VARIANDO-SE A TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E O pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO

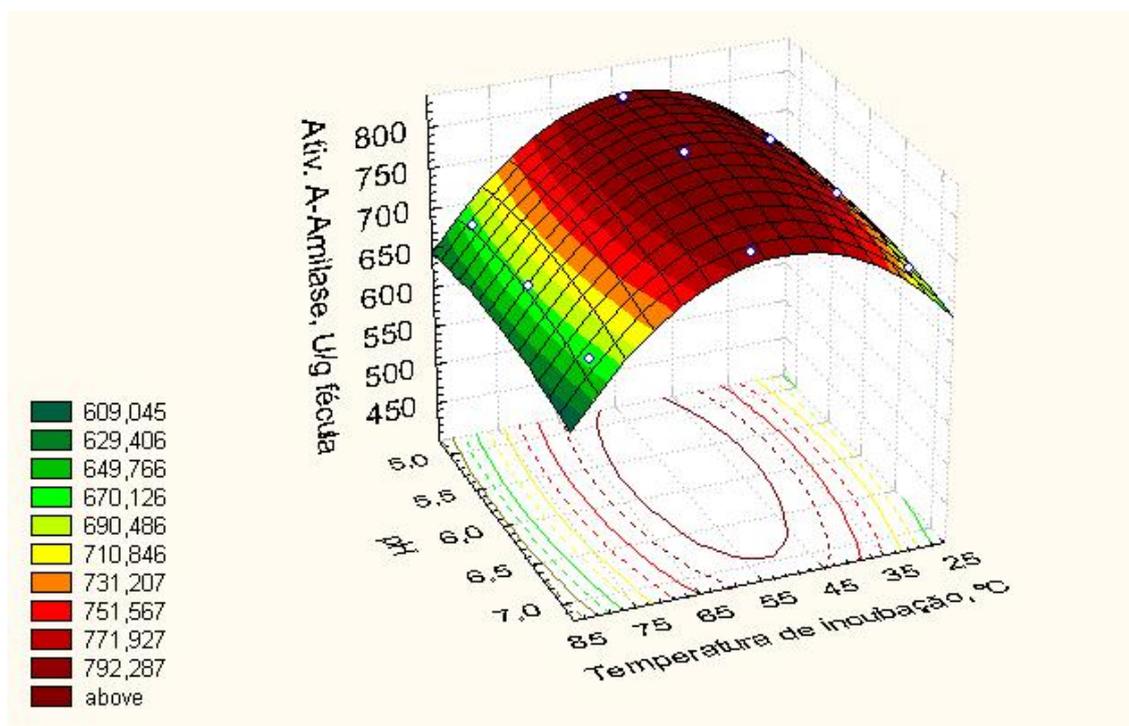
ENSAIO	TEMPERATURA (°C)	pH	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/g fécula)	
			α -AMILASE	AMILOGLUCOSIDASE
1	30	5,0	711,01 \pm 5,50	1066,41 \pm 7,99
2	30	6,0	721,84 \pm 3,92	1082,16 \pm 5,70
3	30	7,0	709,59 \pm 1,65	1064,36 \pm 2,40
4	55	5,0	811,64 \pm 5,52	1212,69 \pm 8,02
5	55	6,0	819,17 \pm 3,02	1223,65 \pm 4,40
6	55	7,0	771,45 \pm 3,30	1154,27 \pm 4,79
7	80	5,0	658,26 \pm 1,18	989,74 \pm 1,72
8	80	6,0	666,89 \pm 1,24	1002,29 \pm 1,81
9	80	7,0	662,50 \pm 2,22	995,89 \pm 3,23

NOTA: Média obtida das atividades \pm desvio padrão.

A Figura 46 mostra que a temperatura de incubação foi o fator que mais influenciou a dosagem da atividade da α -amilase e da amiloglucosidase. A região central da curva mostra valores da atividade da α -amilase mais elevados (>792,287 U/g fécula) quando a temperatura de incubação encontra-se ao redor de 55°C. Temperaturas menores (25°C) não favorecem a ação das enzimas resultando em atividade enzimática baixa (<609,045 U/g fécula), bem como temperaturas mais elevadas (85°C) podem desnaturar as enzimas que apresentam termossensibilidade. Por outro lado, os valores de pH estudados (5,0-7,0) resultaram em atividades enzimáticas com pequenas variações. A maior atividade da α -amilase (819,17 U/g fécula) foi alcançada com pH de incubação da enzima igual a 6,0 e temperatura de incubação de 55°C, porém o gráfico da Figura 46 mostra esta tendência de melhores resultados em temperatura 55°C. As melhores condições de

incubação encontradas por outros autores foram: pH 4,2 e temperatura de 50°C (Solomon & Levin, 1975); pH 4,3 e temperatura de 50°C (Johnson & Costelloe, 1976); pH 4,9 e temperatura de 50°C (Flynn & Johnson, 1977) citados por ZANIN (1989).

FIGURA 46 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA ATIVIDADE DE α -AMILASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DO pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO



A equação 14 foi ajustada aos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a temperatura de incubação, com coeficiente de maior valor absoluto (+18,75).

$$\text{ATIV. A-AMILASE (TEMP, pH)} = -187,22 + 18,75T - 0,1798T^2 + 176,50\text{pH} - 15,228\text{pH}^2$$

(14)

Onde:

ATIV. A-AMILASE = Atividade da α -amilase (U/g de fécula de mandioca)

TEMP = Temperatura de incubação (°C)

pH = potencial hidrogeniônico

A Tabela 38 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da α -amilase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,9756$ e R^2 aj.= 0,9513 explica 95,13% da variação das respostas encontradas. Conforme mostra a análise de variância na Tabela 38, a temperatura de incubação foi a variável significativa nesse estudo, ao nível de significância de 5%. A modelagem mostrou-se adequada com $R^2 = 0,9756$ e R^2 aj. = 0,9513, podendo ser utilizada para fins preditivos.

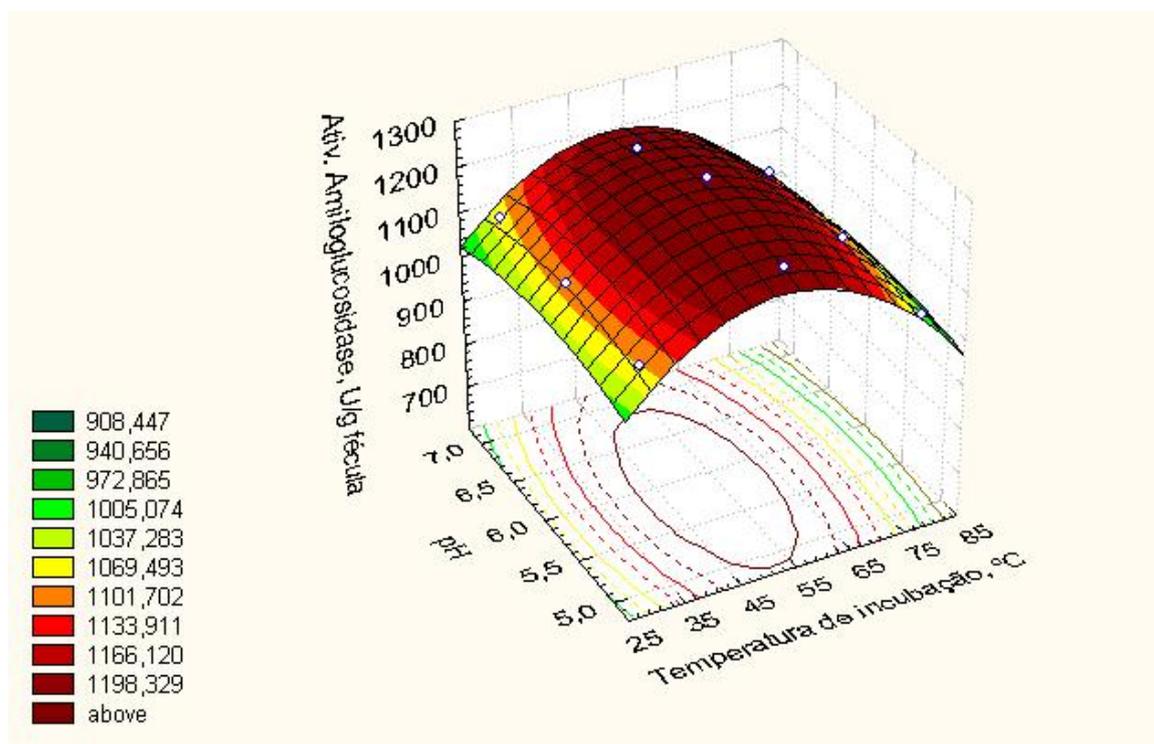
TABELA 38 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA α -AMILASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Temperatura de incubação °C (L)*	3993,46	1	3993,46	21,3801	,009852*
Temperatura de incubação °C (Q)*	25269,86	1	25269,86	135,2892	,000312*
pH (L)	232,67	1	232,67	1,2457	,326898
pH (Q)	463,79	1	463,79	2,4830	,190206
Erro experimental	747,14	4	186,78		
Total Soma dos quadrados	30706,92	8			
R^2	0,97567				
R^2 ajustado	0,95134				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

A Figura 47 apresenta a superfície de resposta para o modelo de amiloglucosidase mostrando os resultados da influência da temperatura de incubação e do pH da solução de amido na atividade da amiloglucosidase. A máxima atividade da amiloglucosidase (1223,65 U/g fécula) foi obtida com as seguintes condições de incubação: temperatura de incubação (55°C) e pH de incubação igual a 6,0.

FIGURA 47 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DO pH DA SOLUÇÃO DE AMIDO



A equação 15 foi ajustada aos dados experimentais. A variável significativa que mais afetou a resposta foi a temperatura de incubação, com coeficiente de maior valor absoluto (+29,05).

$$\text{ATIV. AMILOG.} = -638,35 + 29,05T - 0,2777T^2 + 378,82\text{pH} - 32,32\text{pH}^2$$

(15)

Onde:

ATIV. AMILOG. = Atividade da amiloglucosidase (U/g de fécula de mandioca)

T = Temperatura de incubação (°C)

pH = potencial hidrogeniônico

A Tabela 39 mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade da amiloglucosidase é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2=0,9631$ e $R^2 \text{ aj.} = 0,9263$ explica 92,63% da variação das respostas encontradas.

TABELA 39 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Temperatura incubação °C (L)*	8438,45	1	8438,45	12,37102	,024511*
Temperatura incubação °C (Q)*	60262,52	1	60262,52	88,34661	,000714*
pH (L)	491,66	1	491,66	0,72078	,443710
pH (Q)	2089,56	1	2089,56	3,06336	,154972
Erro experimental	2728,46	4	682,11		
Total Soma quadrados	74010,65	8			
R ²	0,96313				
R ² ajustado	0,9263				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

4.6 Influência da concentração de substrato na produção das enzimas por fermentação submersa (FSm)

O estudo da influência da concentração de substrato na produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação submersa (FSm) foi realizado com as seguintes condições de cultivo: agitação contínua em agitador do tipo *shaker* a 120 rpm, temperatura de fermentação (30°C), suplementação com CaCO₃ (5%); KNO₃ (10%) e solução salina (30%) durante 48 horas. As porcentagens dos nutrientes mencionados anteriormente foram calculadas em relação à quantidade de substrato adicionado. A Tabela 40 apresenta os resultados obtidos para a produção da α -amilase e amiloglucosidase, expressa em atividade enzimática U/ml de meio fermentado e U/g fécula de mandioca, com diferentes concentrações de substrato (fécula de mandioca) na FSm com *A. niger*.

TABELA 40 – RESULTADOS PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA OBTIDA VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

ENSAIO	FÉCULA (%)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/ml FSm)		ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/g fécula de mandioca)			
		α -AMILASE	AMILOG.	α -AMILASE	MÉDIA	AMILOG.	MÉDIA
1	0,5	1,55 ± 0,05	1,87 ± 0,04	359,06	368,28 ± 4,51	495,51	501,43 ± 5,39
2	0,5	1,59 ± 0,02	1,79 ± 0,02	367,53		502,72	
3	0,5	1,67 ± 0,03	1,76 ± 0,04	378,24		506,05	
4	1,0	3,24 ± 0,09	3,85 ± 0,10	648,02	725,37 ± 4,51	769,9783	861,89 ± 5,36
5	1,0	3,45 ± 0,04	4,10 ± 0,05	690,26		820,1650	
6	1,0	4,19 ± 0,06	4,98 ± 0,07	837,83		995,5199	
7	3,0	7,53 ± 0,08	8,95 ± 0,10	516,66	515,95 ± 0,38	613,9038	613,05 ± 7,72
8	3,0	7,42 ± 0,07	8,82 ± 0,09	509,12		604,9398	
9	3,0	7,61 ± 0,07	9,04 ± 0,09	522,05		620,3066	
10	5,0	11,65±0,02	13,84 0,03	493,15	489,87 ± 2,07	585,9680	582,07 ± 3,40
11	5,0	11,54±0,09	13,71±0,11	488,56		580,5139	
12	5,0	11,52±0,12	13,69±0,14	487,90		579,7234	

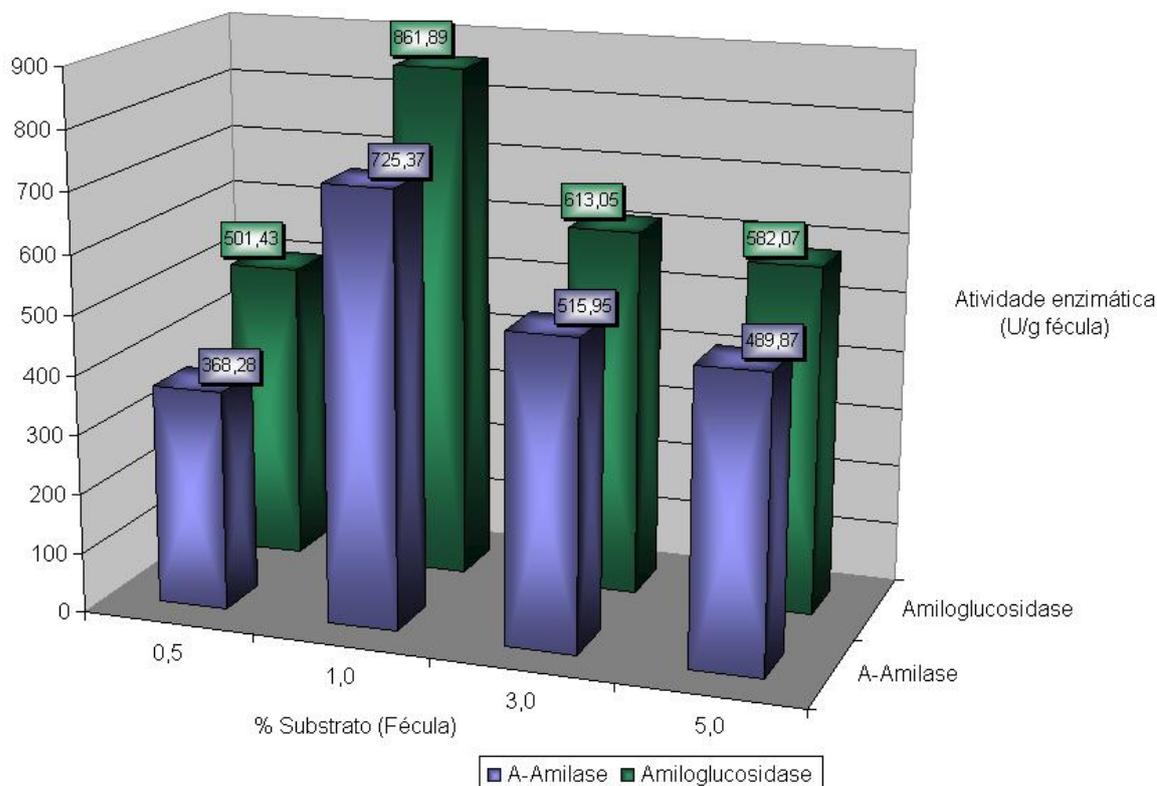
NOTAS: AMILOG. = Amiloglucosidase

Médias das atividades ± desvio padrão

O gráfico de barras mostrado na Figura 48 mostra os valores alcançados para a produção das amilases nas seguintes concentrações de substrato (fécula de mandioca): 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0%. A máxima atividade α -amilase (725,37 U/g fécula) e amiloglucosidase (861,89 U/g fécula) foram alcançadas com concentração de 1,0% de fécula de mandioca, porém a produção das enzimas foi inferior à produção por FES. Observou-se que com o aumento da concentração de substrato houve queda na produção da enzima, talvez pelo fato do aumento da viscosidade do meio em virtude da gelatinização dos grânulos de amido após o pré-tratamento (esterilização).

CARVALHO *et al* (2004) selecionaram linhagens microbianas termofílicas produtoras de amilases termofílicas e termoestáveis que apresentaram maior pico de atividade de amilase (66,51 U/ml) a partir de uma cepa termofílica termoestável pertencente ao gênero *Bacillus* em fermentação submersa de farelo de arroz nas primeiras 72 horas. A produção a partir de *Bacillus* apresentou baixa produção (expressa em atividade) quando comparada à produção das enzimas desse estudo em fermentação submersa durante 48 horas contendo fécula de mandioca com *Aspergillus niger*, com os seguintes resultados obtidos para a atividade da α -amilase (368 a 725 U/ g fécula) e amiloglucosidase (501 a 861 U/ g fécula).

FIGURA 48 - RESULTADOS DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE POR FSm MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO



As fermentações submersas foram conduzidas com o substrato (a fécula de mandioca). A atividade enzimática foi expressa como U/g fécula que neste caso é equivalente à expressão U/g MS (MS=matéria seca).

4.7 Estudo comparativo da FES conduzida em frascos e em bandejas

A Tabela 41 mostra nove ensaios realizados de FES em frascos e testes de FES em bandejas. Os valores estudados para o tempo de fermentação foram 48 e 72 horas. A suplementação com fonte de nitrogênio inorgânico foi outro fator independente estudado, sob a forma do sal nitrato de potássio (KNO_3) nas seguintes concentrações 10, 20 e 30 % em relação à quantidade de substrato adicionado. O pH inicial da FES foi ajustado para 4,5 em todos os ensaios. Os resultados da produção de α -amilase e amiloglucosidase, bem como o pH final das fermentações estão apresentados na Tabela 41.

TABELA 41 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DA FES EM FRASCOS E EM BANDEJAS PARA A PRODUÇÃO DAS ENZIMAS VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO (KNO₃) E O TEMPO DE FERMENTAÇÃO

ENSAIO	CONDIÇÕES	pH _i	pH _f	ATIVIDADE ENZIMÁTICA U/g fécula de mandioca	
				α-AMILASE	AMILOGLUCOSIDASE
1	48 h, 10% KNO ₃ , frasco	4,5	6,39	1103,44 ± 3,96	1302,10 ± 4,67
2	48 h, 20% KNO ₃ , frasco	4,5	6,68	1297,74 ± 16,08	1531,38 ± 18,98
3	48 h, 30% KNO ₃ , frasco	4,5	6,57	1329,69 ± 1,25	1569,08 ± 1,47
4	48 h, 10% KNO ₃ , bandeja	4,5	6,97	1350,52 ± 2,06	1593,66 ± 2,43
5	48 h, 20% KNO ₃ , bandeja	4,5	7,02	1600,00 ± 51,84	1888,06 ± 61,18
6	48 h, 30% KNO ₃ , bandeja	4,5	6,77	1707,43 ± 19,49	2014,83 ± 23,00
7	72 h, 10% KNO ₃ , bandeja	4,5	6,84	1533,27 ± 5,08	1809,32 ± 5,99
8	72 h, 20% KNO ₃ , bandeja	4,5	6,67	1554,46 ± 13,31	1834,32 ± 15,71
9	72 h, 30% KNO ₃ , bandeja	4,5	6,53	1655,53 ± 19,22	1953,58 ± 22,68

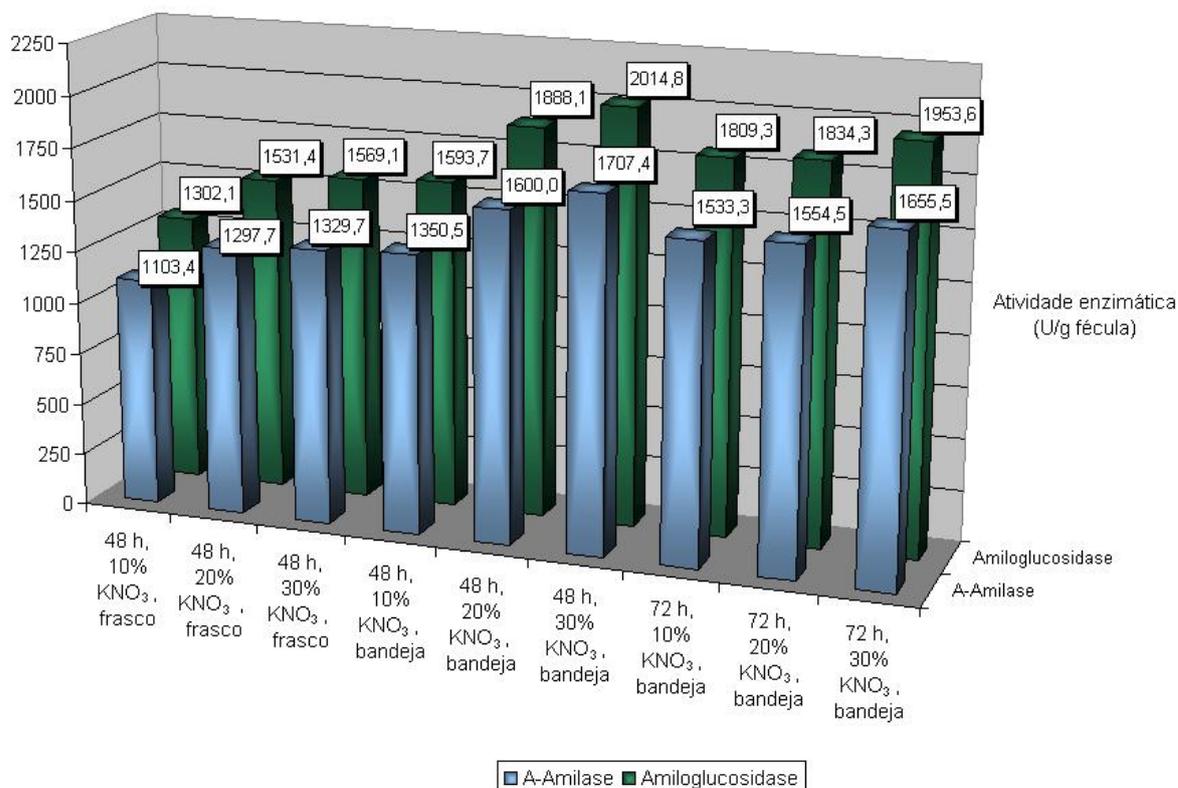
NOTA: média das atividades enzimáticas ± desvio padrão.

pH_i = pH inicial da fermentação

pH_f = pH final da fermentação

Os resultados comparativos da produção das enzimas α-amilase e amiloglucosidase por FES com *A. niger* em frascos e em bandejas são mostrados no gráfico da Figura 49. Pode-se observar que os ensaios conduzidos em bandejas apresentaram maior produção das enzimas em relação à produção em frascos Erlenmeyer. As FES em bandejas durante 48 horas contendo 30% de KNO₃ apresentaram uma produção de amiloglucosidase 22,12% superior à produção nas mesmas condições realizadas em frascos. Em relação à produção de α-amilase, a FES em bandejas apresentou produção 19,9 % maior em relação à produção em frascos (durante 48 horas contendo 30% de KNO₃). O pH final das fermentações variou entre 6,39 e 7,02 demonstrando pouca variação deste fator em todos os ensaios realizados.

FIGURA 49 - RESULTADOS DA FES EM FRASCOS E EM BANDEJAS PARA A PRODUÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE



Condições de cultivo: temperatura de fermentação (30°C), umidade inicial (90%); proporção substrato/suporte (2/1).

SILVA *et al* (2004) ao utilizar o resíduo fibroso de mandioca como substrato para a produção da amilase pelo *Penicillium notatum*, obteve atividade de 27,77 U/g meio em culturas com 1% de substrato, pH 6,0, 25°C e 5 dias de fermentação utilizando meio mineral Klausen. Observa-se que a produção de amilase foi baixa quando comparada à produção obtida no presente estudo, pois tanto a cepa de fungo utilizada e as condições de cultivo influem significativamente na obtenção das enzimas desejadas. O estudo realizado por SILVA *et al* (2004) também utiliza um resíduo agroindustrial como substrato da FES (resíduo fibroso de mandioca) que apresenta um teor de amido retido que, de acordo com Cereda (2000) citado por SILVA *et al* (2004) representa um problema bastante discutido entre indústria e pesquisadores.

4.8 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE

Na caracterização cinética das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, observam-se o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada por estas enzimas.

A Tabela 42 apresenta os resultados da caracterização cinética das enzimas α -amilase e amiloglucosidase pela realização de dosagem enzimática utilizando soluções de amido comercial solúvel com diferentes concentrações (0; 1,5; 3; 6; 9; 10; 12; 15; 18; 20 e 25 g/l). A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a Velocidade Máxima ($V_{máx}$) foram determinadas de acordo com LEHNINGER (1993), baseando-se nos dados apresentados na Tabela 42 e mostrados na Figura 50.

TABELA 42 – VELOCIDADE E ATIVIDADE DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE EM REAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO

ENSAIO	AMIDO* (g/l)	VELOCIDADE		ATIVIDADE ENZIMÁTICA** (U/g fécula de mandioca)	
		$\mu\text{mol/ml/min}$	$\mu\text{mol/ml/min}$	α -AMILASE	AMILOGLUCOSIDASE
1	0	0,093	0,135	43,365 \pm 8,37	63,037 \pm 6,21
2	1,5	0,415	0,604	193,444 \pm 3,73	281,198 \pm 5,43
3	3	0,701	1,019	653,11 \pm 13,16	949,39 \pm 17,87
4	6	1,584	2,384	684,78 \pm 15,59	995,43 \pm 12,08
5	9	1,688	2,549	764,73 \pm 18,32	1111,64 \pm 20,61
6	10	1,705	2,574	744,36 \pm 19,44	1082,04 \pm 29,14
7	12	1,799	2,664	749,64 \pm 23,17	1089,71 \pm 24,84
8	15	1,878	2,792	874,84 \pm 17,12	1271,69 \pm 28,11
9	18	2,006	2,916	934,41 \pm 26,91	1358,30 \pm 33,07
10	20	2,027	2,947	944,22 \pm 22,62	1372,55 \pm 27,55
11	25	2,047	2,975	953,2691 \pm 23,46	1385,71 \pm 34,11

NOTA: *amido solúvel comercial

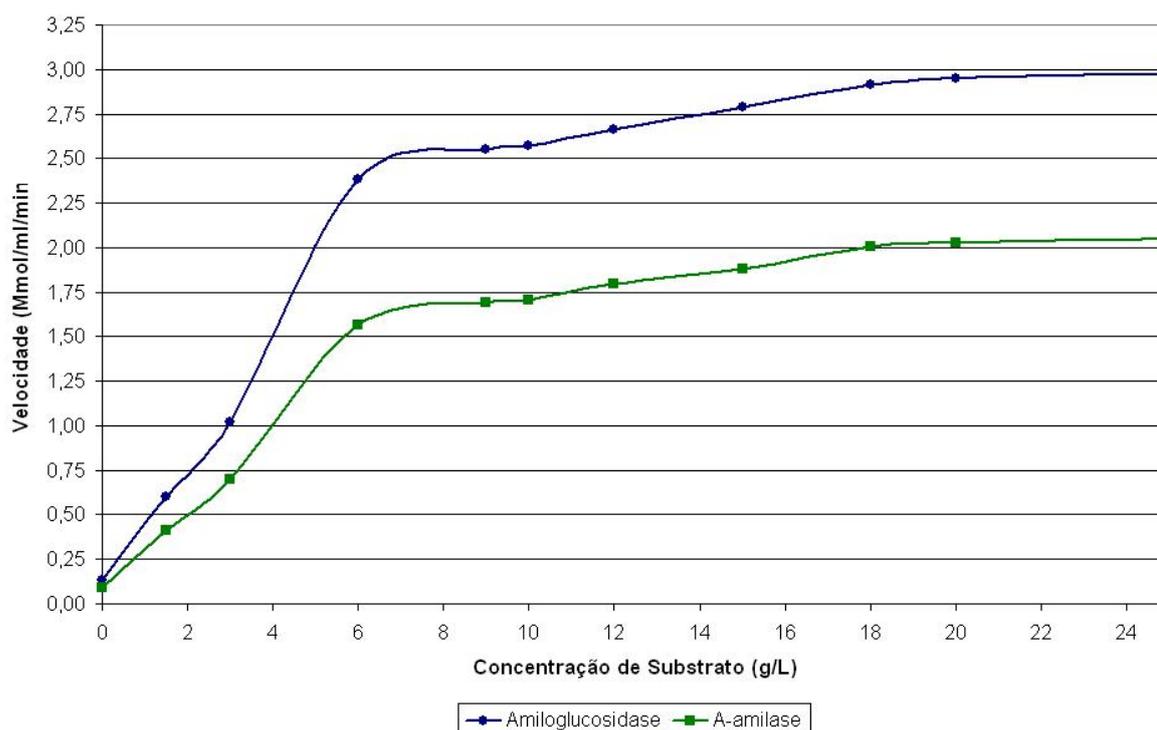
**média das atividades enzimáticas \pm desvio padrão.

O gráfico da Figura 50 mostra o efeito da concentração de amido (g/l) sobre a velocidade da reação catalisada pela α -amilase e amiloglucosidase ($\mu\text{mol/ml/min}$). Observa-se que a curva se assemelha à curva [Substrato] em função da Velocidade (da reação catalisada pela enzima) apresentada por LEHNINGER (1993). Em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial da reação (V_0) é aproximadamente proporcional à concentração do substrato, e a reação dessa forma é aproximadamente de primeira ordem em relação ao substrato. À medida que a concentração de substrato aumenta, a velocidade inicial da reação diminui e deixa

de ser proporcional à concentração de substrato. Com um aumento posterior na concentração do substrato, a velocidade de reação torna-se independente da concentração do substrato a se aproxima de uma velocidade constante, observado em concentrações de substrato superiores a 20 g/l, conforme mostra a Figura 50. A partir desta concentração a enzima passa a ser considerada *saturada* com seu substrato, conforme explicam LEHNINGER (1976); SEGEL (1976) e CHAPLIN & BUCKE (1992).

A teoria geral de ação enzimática e cinética desenvolvida por Michaelis e Menten em 1913 é melhor desenvolvida para o caso simples de uma reação como apresentada na Figura 50, na qual existe somente um substrato.

FIGURA 50 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO SOBRE A VELOCIDADE DA REAÇÃO CATALISADA PELA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE



De acordo com LEHNINGER (1976); SEGEL (1976) e CHAPLIN & BUCKE (1992) a constante K_M é igual à concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. O K_M para uma reação e um substrato tem a dimensional moles por litro, e é independente da concentração enzimática. Como observado, a constante de Michaelis-Menten (K_M) é uma

quantidade determinada experimentalmente, definida de maneira operacional: a concentração do substrato em que a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima.

Pode ser representada pela equação 16:

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} \quad (16)$$

Uma transformação freqüente da equação 16 é a dedução substituindo-se os valores inversos em ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, conforme mostrado nas equações 17, e 18, com intuito de obter um valor mais exato de V_{\max} .

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (17)$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \quad (18)$$

Reduzindo a equação 18, tem-se:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (19)$$

A equação 19 é a equação de Lineweaver-Burk. Quando $1/V_o$ é colocado em um gráfico em função de $1/[S]$, obtém-se uma linha reta. Essa linha terá uma inclinação de K_M/V_{\max} , a intercepção será $1/V_{\max}$ no eixo de $1/V_o$, e uma intercepção de $-1/K_M$ no eixo de $1/[S]$. Esse gráfico *duplo recíproco* tem a vantagem de permitir uma determinação muito mais exata de V_{\max} , que pode somente ser obtida como um valor limite para concentrações infinitamente elevadas de substrato a partir de um gráfico simples de V_o em função de $[S]$ (LEHNINGER, 1993).

Portanto, a constante de Michaelis-Menten K_M da α -amilase e o K_M da amiloglucosidase, bem como a velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ dessas enzimas foram determinadas conforme o Método de Linearização de Lineweaver-Burk descrito anteriormente apresentando os seguintes valores para a α -amilase: $K_M = 10,846$ g/l; $V_{m\acute{a}x} = 3,422$ g/l e para a amiloglucosidase: $K_M = 11,325$ g/l ; $V_{m\acute{a}x} = 5,18$ g/l. Przybyt & Sugier (1988) citado por COSTA (1996) trabalhando com amiloglucosidase comercial de *Aspergillus niger* e hidrólise de 15 minutos a 55°C encontraram valores para K_M de 13,3 g/l quando a enzima se encontrava livre e 30,5 g/l quando imobilizada com DEAE-celulose. Szajáni *et al* (1985) também citado por COSTA (1996), encontraram valores de 7,0 e 14,0 g/l para a constante de Michaelis-Menten usando a enzima livre e imobilizada, respectivamente. ZANIN (1989) concluiu que em concentrações de solução de amido liquefeito superiores a 50 g/l já se nota uma sensível inibição da enzima amiloglucosidase (enzima comercial da fabricante *Novozymes*) pelo seu substrato.

4.9 PRECIPITAÇÃO DA α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE

Para a precipitação das enzimas produzidas, o extrato enzimático bruto foi saturado com $(NH_4)_2SO_4$, seguindo-se a metodologia descrita no item 3.2. A precipitação foi efetiva na purificação da enzima (8,29 vezes) mas produziu uma perda elevada (75%) da atividade aplicada. A Tabela 43 apresenta os resultados comparando os dados do extrato bruto (α -amilase + amiloglucosidase) e os dados após a precipitação com sulfato de amônia.

TABELA 43 – FOLHA DE BALANÇO DA PRECIPITAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

ETAPAS	VOLUME ml	ATIVIDADE** U/ml	ATIVIDADE** U/mg fécula	ATIVIDADE** TOTAL (U)	RECUPERAÇÃO (%)	PURIFICAÇÃO (Vezes)
Extrato bruto	500,0	1,7935	0,755	896,75	100	1
Sulfato de amônia*	15	14,872	6,262	223,08	24,87	8,29

NOTA: *saturação a 80%; **atividade expressa pela liberação de açúcar redutor (glicose)

Os testes de precipitação foram realizados em triplicata e observa-se que a recuperação da enzima foi baixa. SOUZA *et al* (1996) conseguiu uma recuperação equivalente a 70,47% quando precipitou com sulfato de amônio a α -amilase produzida por *Rhizopus* sp. obtida por fermentação sólida de farelo de trigo e conseguiu purificar a enzima 6,6 vezes.

Com os resultados de baixa porcentagem de recuperação da enzima após a precipitação com sulfato de amônio verifica-se a necessidade de realizar uma otimização desse processo, variando-se a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, temperatura, tempo e velocidade de centrifugação com o intuito de obter melhores resultados de purificação e recuperação do extrato enzimático.

5 ANÁLISE PRELIMINAR DOS CUSTOS DA PRODUÇÃO DA α -AMILASE E DA AMILOGLUCOSIDASE POR FES

O custo da produção da α -amilase e da amiloglucosidase foi calculado com o objetivo de verificar a viabilidade econômica da produção dessas enzimas por FES de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar. Considerando-se todos os constituintes do meio de cultivo da FES de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar, pode-se verificar que o custo estimado de cada Kg de meio inoculado é de R\$ 1,64 conforme mostra a Tabela 44. O custo estimado para a produção de 1000 U de α -amilase é de R\$ 0,024 enquanto que o custo de 1000 U de amiloglucosidase é de R\$ 0,0202. Verifica-se que o custo é baixo em função do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar (R\$ 24,00 a tonelada), salientando-se que não foram considerados custos de produção industrial (mão-de-obra, instalações, impostos, manutenção e análises).

TABELA 44 – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DA FES DE FÉCULA DE MANDIOCA E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE

ITEM	QUANTIDADE (g)	CUSTO R\$/Kg	CUSTO PARCIAL R\$
Fécula de mandioca	50,0	2,80	0,14
Bagaço de cana-de-açúcar	25,0	0,64	0,016
Fonte de nitrogênio (KNO ₃) (10% qtde fécula)	5,0	220,0	1,10
CaCO ₃ (5% qtde fécula)	2,5	10,69	0,02672
Solução salina (30% qtde fécula)	15,0	0,30	0,0045
Suspensão de esporos (cepa, PDA, repicagem, esterilização, refrigeração)	5,13	50	0,02565
Água deionizada (pH ajustado)	899,9	0,2	0,1799
SUBTOTAL	-	-	1,4928
Fermentação em Estufa a 30°C (60 horas)	-	5%	0,07464
Extração (<i>shaker</i> , centrifugação)	-	5%	0,07464
TOTAL (R\$/Kg meio)	-	-	1,642
R\$ / 1000 U (α-amilase)	-	-	0,024
R\$ / 1000 U (amiloglucosidase)	-	-	0,0202

6 CONCLUSÕES

As melhores cepas selecionadas a partir do crescimento radial produziram α -amilase e amiloglucosidase em quantidades diferentes, verificando uma produção mais elevada pelas seguintes cepas, em ordem decrescente de produção das amilases estudadas: *Aspergillus niger* LPB 28, *A. niger* IZ9, W12, *Rhizopus arrhizus*, *R. oryzae* e *R. formosa*, o que pode explicar a facilidade mostrada por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* em aproveitar substratos amiláceos em seus processos metabólicos para sintetizar vários produtos de interesse industrial

A cepa de *Aspergillus niger* LPB 28 demonstrou maior capacidade de produção de amilases (α -amilase e amiloglucosidase) pela fermentação no estado sólido de fécula de mandioca (substrato) e bagaço de cana-de-açúcar (suporte inerte) quando comparada à produção das outras cepas do gênero *Aspergillus* e das demais cepas do gênero *Rhizopus*.

A fermentação no estado sólido (FES) conduzida com a proporção fécula/bagaço (FM/BC) igual a 2/1, apresentou maior produção da α -amilase (467,459 U/g fécula ou 311,306 U/g MS) e amiloglucosidase (781,672 U/g fécula ou 520,556 U/g MS) quando comparada às fermentações conduzidas com as demais proporções estudadas.

Os resultados obtidos no estudo da temperatura de fermentação ($^{\circ}$ C) e umidade inicial (%) mostraram que o ensaio com 90% de umidade e 30-32 $^{\circ}$ C de temperatura de fermentação foi a combinação que demonstrou maior produção da α -amilase (1352,42 U/g fécula) e da amiloglucosidase (1622,80 U/g fécula).

Quanto maior a concentração de KNO_3 estudada (0-10%) na FES maior a produção da α -amilase, utilizando concentrações de até 5% de CaCO_3 . A fonte de nitrogênio KNO_3 foi importante para a produção da enzima, enquanto concentrações acima de 5% de CaCO_3 influenciaram negativamente a sua produção. Já a variável concentração de solução salina foi fixada no ponto central (nível 0 = 30%) não influenciando a produção de α -amilase e amiloglucosidase (não apresentando diferença significativa no modelo obtido).

A máxima produção de amiloglucosidase (>973 U/g fécula) a partir do estudo da influência do CaCO_3 , KNO_3 e solução salina foi alcançada com as seguintes condições: concentração de KNO_3 (10%), concentração da solução salina (30%) e concentração de CaCO_3 (0%), obtendo-se atividade da amiloglucosidase igual a 1166,54 U/g fécula.

Com a suplementação de cálcio na forma do sal CaCO_3 , sem a adição de fonte de nitrogênio, a produção de α -amilase aumentou 9,74%, enquanto a produção de amiloglucosidase teve um aumento de apenas 7,66%. Suplementando a FES com fonte de nitrogênio orgânico (uréia), a produção de cada uma das enzimas aumentou em torno de 76%, quando comparada à produção sem a suplementação desta fonte. Quando adicionada fonte de nitrogênio inorgânico (KNO_3), foi alcançado um aumento de 84,6% na produção de α -amilase e 81,11% na produção de amiloglucosidase. Com estes resultados é possível afirmar que a FES com *A.niger* apresentou maior produção das duas enzimas quando o meio foi suplementado com KNO_3 .

No estudo da influência da concentração de substrato e da taxa de inoculação, obteve-se máxima produção de α -amilase com os seguintes parâmetros: 5% fécula de mandioca e $5,5 \times 10^7$ esporos/g MS, atingindo uma produção de 1109,86 U/g fécula.

Nos tempos de fermentação estudados, verificou-se que o tempo de 60 horas foi o tempo de fermentação no estado sólido que proporcionou maior produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase.

Como foi observado, a faixa de pH inicial das fermentações entre 4,0 e 6,0 resultou em maior produção tanto da α -amilase e amiloglucosidase. O pH inicial igual a 7,0 teve a produção das enzimas declinada e em pH 8,0 a produção diminuiu drasticamente 46,82% (amiloglucosidase) e 48,53% (α -amilase) quando comparada à produção máxima (pH=4,0).

A extração máxima de α -amilase (953,33 U/g fécula) foi alcançada com as seguintes condições de agitação: agitador do tipo ultra turrax (velocidade moderada), temperatura ambiente, tempo de agitação de 60 minutos. A extração máxima de amiloglucosidase (1385,48 U/g fécula) foi alcançada com as seguintes condições de agitação: agitador do tipo *shaker* (120 rpm), temperatura de agitação (30°C), 90 minutos de agitação. Para obter uma extração elevada e ao mesmo tempo gastar o menor tempo possível, sugeriu-se o uso do ultra turrax para a extração das duas enzimas simultaneamente num tempo de 60 minutos à temperatura ambiente, em velocidade moderada

As máximas produções de α -amilase (725,37 U/g fécula) e amiloglucosidase (861,89 U/g fécula) por FSm foram alcançadas com concentração de 1,0% de fécula de mandioca porém a produção das enzimas foi inferior à produção por FES. Observou-se que com o aumento da concentração de substrato houve queda na produção da enzima, talvez pelo fato do aumento da viscosidade do meio em virtude da gelatinização dos grânulos de amido após o pré-tratamento (esterilização).

Durante o estudo da dosagem enzimática, a máxima atividade da amiloglucosidase (1223,65 U/g fécula) foi obtida com as seguintes condições de incubação: temperatura de incubação (55°C) e pH de incubação igual a 6,0. Já a maior atividade α -amilásica (819,17 U/g fécula) foi alcançada com pH de incubação da enzima igual a 6,0 e temperatura de incubação de 55°C, porém o modelo mostra a tendência de melhores resultados em temperaturas entre 45-55°C.

Pode-se observar que os ensaios conduzidos em bandejas apresentaram maior produção das enzimas em relação à produção por FES em frascos Erlenmeyer. A FES em bandejas durante 48 horas contendo 30% de KNO_3 apresentou uma produção de amiloglucosidase 22,12% superior a produção nas mesmas condições realizadas em frascos. Em relação à produção α -amilase, a FES em bandejas apresentou produção 19,9 % maior em relação à produção em frascos (durante 48 horas contendo 30% de KNO_3). O pH final das fermentações variou entre 6,39 e 7,02 demonstrando pouca variação deste fator em todos os ensaios realizados.

As modelagens apresentadas com auxílio da ferramenta estatística Statística para Windows empregando-se Metodologia de Superfície de Resposta mostraram-se adequadas podendo ser utilizadas para fins preditivos.

A precipitação do extrato enzimático bruto contendo as enzimas produzidas (α -amilase e amiloglucosidase) foi efetiva na purificação da enzima (8,29 vezes) mas produziu uma perda elevada (75%) da atividade aplicada.

No estudo da caracterização cinética das enzimas produzidas, foram obtidos os seguintes resultados para a α -amilase: $K_M = 10,846 \text{ g/l}$; $V_{m\acute{a}x} = 3,422 \text{ g/l}$ e para a amiloglucosidase: $K_M = 11,325 \text{ g/l}$; $V_{m\acute{a}x} = 5,18 \text{ g/l}$.

Pode-se verificar que o custo estimado de cada Kg de meio inoculado é de R\$ 1,64 e o custo estimado para a produção de 1000 U de α -amilase é de R\$ 0,024 enquanto que o custo de 1000 U de amiloglucosidase é de R\$ 0,0202. Verifica-se que o custo é baixo em função do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar e o uso de um substrato de custo acessível, a fécula de mandioca.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outros materiais alternativos para a fermentação no estado sólido, dando preferência aos resíduos agroindustriais tais como: farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de mandioca;
- Utilizar outras fontes amilásicas: fécula de batata, amido de milho, farinha de trigo, entre outras fontes disponíveis na FES e comparar a produção de amilases.
- Isolar a microflora natural das fontes amilásicas, identificá-las e selecionar os microrganismos potenciais decompositores das fontes de amido que podem ser potenciais produtores de amilases;
- Aumentar a escala de produção de amilases utilizando o biorreator tipo tambor e o tipo bandeja com maior capacidade;
- Realizar o estudo de respirometria da FES para a produção das enzimas amilolíticas.

REFERÊNCIAS

- ABAM. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Brasil Deverá Produzir 225 Milhões de Toneladas de Mandioca em 2005**. Ano II. Nº 8 Set/Dez 2004a.
- ABAM. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Produção de Amido Deve Aumentar em 44% em 2004**. Ano II. Nº 6 Mar/Maio, 2004b.
- ABIPTI. 1999. Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica. **Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar**. Brasília: ABIPTI, 1999, 474 p.
- ABRAHAM, T.E. ; KRISHNASWAMY, C. ; RAMAKRISHNA, S.V. Effect of Hydrolysis Conditions of Cassava on the Oligosaccharide Profile and Alcohol Fermentation. **Starch/Stärke**. v. 39. n. 7, 1987. p. 237-240.
- ABRAHAM, T.E. ; SREEDHARAN, V.P. ; RAMAKRISHNA, S.V. Development of an Alternate Rute for the Hydrolysis of Cassava Flour. **Starch/Stärke**. v. 41, n. 12, 1989. p. 472-476.
- ALLBRANDS Indústria de Alimentos Ltda**. Informações técnicas sobre o processamento dos produtos para alimentação infantil. Colombo, PR. 2004.
- AQUARONE, E. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. v. 4. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 387-398.
- AIDOO, K.E.; HENDRY, R; WOOD, B.J.B. Solid Substrate Fermentations. **Advance Applied Microbiology**. V. 28, 1982. p. 201-237.
- AMIN, G. ; ALLAH, A.M.K. By-Products Formed During Direct Conversion of Sugar Beets to Ethanol by *Zymomonas mobilis* in Conventional Submerged and Solid-State Fermentations. **Biotechnology Letters**. v. 14. n.12, 1992, p. 1187-1192.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto n. 3.029, de 16 de abril de 1999**. Disponível em: <http://acd.ufpr.br/consumo/legislacao/n_cp15_03.pdf> Acesso em 3 jan. 2004.
- AURIA, R. ; PALACIOS, J. ; REVAH, S. Determination of the Interparticular Effective Diffusion Coefficient for CO₂ and O₂ in Solid State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 39, p. 898-902, 1992.
- AZEVEDO, J.A.M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Isoflavonas Bioativas (daidzeína, genisteína) de Soja (*Glicine Max L. Merrill*) por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2004. 50 p.

BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I.S. ; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299p.

BARTHOLOMEU, D.B. **Co-geração de Energia a partir do Bagaço de Cana**. XXXIX Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural (SOBER). Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/enerq/zip/Co-gea%E7ao%20SOBER.pdf>> Acesso em: 03 mar. 2004.

BATISTUTI, J.P. **Aspectos Gerais sobre os Ênzimos**. In: Ênzimos e a Qualidade de Vegetais Processados. Manual técnico do ITAL. Campinas, 1991. p. 1-9.

BELL, D.J. ; HOARE, M. ; DUNIILL, P. The Formation of Protein Precipitates and their Centrifugal Recovery. *Biochemical Engineering*. v. 26, 2003. p. 1-72.

BEROVIC, M. ; LOGAR-DERENCIN, M. Solid State Fermentation of Pectinolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 56, n. 12, 1993. p. 209-211.

BEUCHAT, L.R. Influence of Water Activity on Growth, Methabolic Activity and Survival of Yeasts and Moulds. **J. Food Protection**, 1983, 46. p. 135-141.

BHELLA, R.S. ; ALTOSAAR, I. **Purification and Some Properties of the Extracellular α -Amilase from *Aspergillus awamori***. *Can J. Microbiol*, 1985; 31. 149p.

BISGAARD-FRANTZEN, H. ; BORCHERT, T. ; SVENDSEN, A. ; THELLERSEN, M.H. ; VAN DER ZEE, P. **PCT Patent Application. WO 95/10603**. 1995.

BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2. ed., 1ª reimp. São Paulo: Varela, 1992. 223p.

BOX, G.E.P. ; HUNTER, W.G. ; HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987.

BRAND, D. ; PANDEY, A.; RODRIGUEZ-LEON, J. A. ; ROUSSOS, S. ; BRAND, I. ; SOCCOL, C.R. Relationship between coffee husk caffeine degradation and respiration of *Aspergillus* sp. in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 102-103. Jul-Dec. 2002, p. 169-177.

BRASIL. Agência Estado. Cadernos Setoriais. **País Baterá Recorde Exportação de Açúcar sem Derrubar Preços**. Safra 2003/2004. Set/2003. Disponível em: <http://www.aeagro.com.br/especiais/safra0304/noticias/lavouras/03.htm> Acesso em 02 mar. 2004.

BRASIL. **Enzimas: Biocatalizadores no Acabamento de Têxteis**. Disponível em: <http://empreende.1afm.com/htm/doc/31f3.pdf> Acesso em: 22 out 2003.

BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state Fermentation Systems. **Process Biochemistry**. Jun, 1980. p. 2-7.

CARVALHO, A. F. A.; SILVA, T. M.; SILVA, R.; GOMES, E. **Isolamento e Seleção de Linhagens Termofílicas Produtoras de Amilases**. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1

CASTAÑEDA, G. S. **Controle du Métabolisme de *Schwanniomyces castellii* Cultivé sur Suppot Solide**. Montpellier, 1991. Thèse (Doctorat) – Université de Montpellier II, France.

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. New York: Cambridge University Press, 1992. 264p.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346 p.

COELHO, T. **Alimentos: Propriedades Físico-Químicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. p. 44-55.

CONN, E.E. ; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

CORNELL, J.A. **How To Apply Response Surface Methodology**. American Society for Quality Control, 1990.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

DELMAS, J. **Les Champignons et Leur Culture**. Flamarion, La maison Rustique, Paris, 1989.

DUFOUR, D. **Contribution à l'étude de la Physiologie des Champignons Pectolytiques Cultivés en Milieu Solide en Relation avec la Respiration et la Synthèse de Pectinases**, UTC Compiègne, 1990, 262 p.

EDC – Enzyme Development Company. **Enzymes Applications in Animal Feed**. Disponível em: <<http://www.enzymedevelopment.com>> Acesso em 6 nov. 2004. New York, 2004.

EMBRAPA. MATTOS, P.L.P. ; CARDOSO, E.M.R. **Cultivo da Mandioca para o Estado do Paraná: Importância Econômica**. Embrapa: Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção N. 13, Jan. 2003. p.1-2. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_pira/importancia.htm> Acesso em: 14 Jun 2004.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FUNDAÇÃO CARGILL. 1987. Cana-de-Açúcar Cultivo e Utilização. v. 2. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 856 p.

GRANOTEC do Brasil. **Enzimas para Pães**. Disponível em: <<http://www.granotec.com.br/produtos5.htm>> Acesso em 08 jan. 2004.

GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective**. Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 08 Dez. 2003.

GUTIERREZ – ROJAS, M. ; TORRES, E.F. **Curso de Fermentaciones em Medio-Sólido – Biotecnología para el Aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales**. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.

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

HENDRIKSEN, H.V. ; PEDERSEN, S. ; BISGARD-FRANTZEN, H. **A Process for Textile Warp Sizing Using Enzymatically Modified Starches**. Patent Application. WO 99/35325. 1999.

HENRY, J.B. **Clinical Enzymology Pre-Workshop Manual**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1964. 288p.

HERNANDEZ, M.R.T. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; LONSANE, B.K. Potencial of Solid State Fermentation for Production of Ergot Alkaloids. **Letters in Applied Microbiology**. 15: 156-159, 1992.

HESELTIME, C.W. Solid state fermentation – Parte I. **Process Biochemistry**. v. 4, 1977. p.24-27.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985. 523 p.

KHURI, A.; CORNELL, J. A. **Response Surface: Designs and Analyses**. American Society for Quality Control, 1987.

KIMURA, T. ; DOELLE, H.W. A one-step process for the production of single cell protein and amyloglucosidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 (10), 1990. p. 403-407.

- KNORR, D. **Food Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. p. 383-399.
- KOTTWITZ, B.; UPADEK, H. ; CARRER, G. **Applications and Benefits of Enzymes in Detergent**. *Chim Oggi*. 1994. 12. p. 21-24.
- LIDLER, K.J. **Introduction to the Chemistry of Enzymes**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1954. 208 p.
- LARROCHE, C. ; DESFARGES, C. ; GROS, J.B. Spore Production of *Penicillium roqueforti* by Simulated Solid State Fermentation. **Biotechnology Letters**. V.8. n.6, p. 453-456, 1986.
- LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. v. 1. 2ª ed. 6. reimp. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1993, 262 p.
- LIMA, U. A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. ; SCHIMIDELL, W. **Coleção Biotecnologia Industrial**. v. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos, Edgard Blücher, São Paulo, 2001 .593 p.
- LIN, W.L. ; FELDBERG, R.S. ; CLARK, E.D.B. Kinetics of Cell Growth and Heterologous Glucoamylases Production in Recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 41, 1993. p. 273-279.
- LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 7, 1985. p. 258-265.
- LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; GHILDYAL, N.P. ; RAMAKRISHNA, M. ; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation System. **Process Biotechnology**. v. 27, 1992. p. 259-273.
- LOPEZ-ULIBARRI, R. ; HUERTA, S. ; SCHETTINO-BERMÚDEZ, B. ; GUTIERREZ-ROJAS, M. Gelatinization of Cassava Meal for Solid State Fermentation. **Journal of Food Engineering**. v.9, 1989. p. 237-243.
- MAHEVA, E.; DJELVED, G.; LARROCHE, C.; CROS, J.B. Sporulation of *Penicillium roqueforti* in Solid State Fermentation. **Biotechnol. Letters**. 6 ,1984, p. 97-102.
- MITIDIERI, *et al.* **Detergentes Biológicos**. Disponível em: http://ilhoepner.bei.t-online.de/uebersetzen/detergentes_biodegradaveis.htm Acesso em 15 dez 2003.
- MOHAN, R. **Propagação Vegetativa *in vitro*: Uso do Bagaço de Cana-de-açúcar como Material Suporte Alternativo de Baixo Custo na Fase de Enraizamento de Marubakaido (*Malus prunifolia*)**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química. UFPR. Curitiba, 2001. 62 p.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGEDY, R.P. Principles of Solid-Substrate Fermentation. In **The Filamentous Fungi**, 1983, Vol. 4: Fungal Biotechnology; p. 117-144. London: Smith Berry & Kristiansen Ed., 1983.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation In: DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 66-84.

MYLNER, 2004 ver pág. 51

NATIONAL STARCH CHEMICAL CORPORATION. NS – 00396/85 (5), 1985.

NEDER, R.N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**. São Paulo: Nobel S.A., 1992. p.46-54.

NEHETE, P.N. ; HEDGE, M.V. ; REDDY, L.G & SHANKAR, V. Immobilization of Amyloglucosidase on Polystyrene Anion Exchange resin II: Kinetics and Stabilities. **Biotechnology Letters**. v. 14, n. 9. 1987. p. 817-822.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. **Enzyme and Microbial Technology**. v.17, Sep 1995. p. 770-778.

NOVOZYMES Latin America Ltda. **Nova Amilase torna Detergentes Líquidos mais Eficazes**. Disponível em: http://www.novozymes.com/library/Publications/Biotimes_Sprog/PT_newamylase.pdf. Acesso em 21 out. 2004a.

NOVOZYMES Latin America Ltda. **Amilases: Removendo Manchas de Amido**. Disponível em: http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/hc19/artigo_NOVOZYMES_0503.pdf. Acesso em 21 out. 2004b.

NOVOZYMES Latin America Ltda. **Enzimas para todas as Aplicações**. Disponível em: <http://www.novozymes.com/produtos.pdf>. Acesso em 05 jan. 2004c.

ORIOU, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau**. Thèse de Doctorat Microbiologie, INSA Toulouse, 27 Juin 1987, 113p.

ORIOU, E. ; SCHETTINO, B. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; RAIMBAULT, M. Solid-State Culture of *Aspergillus niger* on Support. **Journal of Fermentation Technology**. v. 66. n. 1. 1988. p. 57-62.

PANDEY, A. Aspects of Fermenter Design for Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, 1991. p. 335-361.

PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, 1992. p. 109-117.

PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed Column Bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14. 1992. p. 486-488.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; SOCCOL, C.R. ; NIGAM, P. **Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes**. In: Current Science, v. 77. n.1 Jul, 1999. p. 149-161.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; SOCCOL, V.T. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. **Advances in Microbial Amylases**. Biotechnol. Appl. Biochem. , 2000; 31:135-152.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; RODRIGUES-LEON, J.A. ; NIGAM, POONAM. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 2001. 221p.

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

PARK, Y.K. ; SANTI, M.S.S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**. v. 55, 1977. p. 193-195.

PARK, Y.K. **Insolubilização da Amiloglucosidase em Resina: Estudo de suas Propriedades e Cinética**. Campinas, 1972. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PELCZAR. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. Cap. 10. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998. p. 258-271

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2002. 81 p.

PRZYBYT, M. & SUGIER, H. The Properties of Glucoamylase Soluble and Immobilized on DEAE-cellulose. Part I. Kinetics and Thermodynamics of Enzyme Reaction. **Starch/Stärke**. v. 40, n. 3, 1988. p. 108-111.

QUAGLIA, G. **Ciência y Tecnología de la Panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 485 p.

RAMACHANDRAN, N.; SKREEKANTIAH, K.R.; MURTHY, V.S. **Influence of Media Composition on the Production of α -Amylase and Amyloglucosidase by a Strain of *Aspergillus niger***. Starch. 34. 1979. p. 274.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, 1980. p. 199-209.

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

REGULY, J.C. **Biotecnologia de Processos Fermentativos e suas Matérias-Primas**. Pelotas: UFPEL, 1996. p. 321.

RODRIGUES, M.I. **Modelagem, Simulação e Controle de um Processo Contínuo de Purificação de Enzimas**. Campinas, 1993. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ROSAS, J. Curso de Biología Molecular Y Celular. **Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos**. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>> Acesso em 20 jul 2003.

SANI, A. ; AWE, F.A. ; AKINYANJU, J.A. Amylase Síntesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Grown on Cassava Peel. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 10, 1992. p. 55-59.

SARTORI, J.R. **Uso de Enzimas em Rações**. Revista Alimentação Animal. n. 19. Jul/Set 1999, 2003.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Maintenance Of Heat And Water Balances As A Scale-Up Criterion For The Production Of Ethanol By *Schwanniomyces Castellii* In A Solid State Fermentation System. **Process Biochemistry**. v. 27, p. 97-107, 1992.

SCHMIDELL, W. **Estudo do Processo Fermentativo Contínuo de Produção de Amiloglucosidase Por *Aspergillus niger* NRRL 337 – Comparação com o Processo Descontínuo**. São Paulo, 1996. Tese (Livre Docência em Engenharia Química). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

SCOPES, R.K. **Proteins Purification Principles and Practice**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1988. 283 p.

SEGEL, I. H. Biochemical Calculations. Cap. 4. Enzymes. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 441p.

SEVERO, J.R. Comissão Nacional de Cana-de-Açúcar. **Setor Canavieiro Terá Super-Safra em 2003/2004**. Gleba. Nº 196, Dez 2003.

SILLS, A.M.; SAUDER, M.E.; STEWARD, G.G. Amylase Activity in Certain Yeasts and a Fungal Species. *Dev. Ind. Microbiol.* 1983; 24. p. 295.

SILVA, V.C.H; CAPPELLARI, A.R; BREDA, A.E; ZILLY, A.; OSAKU, C.A; KADOWAKI, M.K. **Utilização do Resíduo Fibroso da Mandioca como Substrato para Produção da Amilase pelo *Penicillium Notatum***. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1

SMITH, J. **Food Additive User's Handbook**. New York: Blackie and Son Ltd., 1991. p. 131, 144.

SOCCOL, C.R. **Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, 1992. 218 p.

SOCCOL, C.R. ; CABRERO, M.A. ; ROUSSOS, S. ; RAIMBAULT, M. **Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava**, VI International Symposium on Microbial Ecology, Barcelona, 6-11 Septembre, 1992b.

SOCCOL, C.R. ; MARIN, B. ; RAIMBAULT, M. ; LEBEAULT, J.M. Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava By Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 41. 1994. p. 330-336.

SOCCOL, C.R. ; ILOKI, I. ; MARIN, B. ; ROUSSOS, S. ; RAIMBAULT, M. Comparative Production of Amylase and Protein Enrichment of Raw and Cooked Cassava By *Rhizopus* Strains in Submerged and Solid State Fermentation. **Journal of Food Science and Technology**. V. 3. 1994. p. 320-323.

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p. 221-230.

SOUZA, E.L. ; HOFFMANN, E.H.E. ; CASTILHO, V.M. ; LIMA, V.A. ; BELLINI, M.Z.; CRUZ, V.D. ; CRUZ, R. **Produção e Caracterização de α -Amilase Produzida por *Rhizopus* sp.** In: Arq. Biol. Tecnol. 39 (4). Dez, 1996. p. 831-839.

SOUZA, O; SANTOS, I.E. **Bagaço de Cana-de-Açúcar Tratado com Uréia**. Manejo. RuralSoft: Soluções em Tecnologia para a Pecuária. 2003. Disponível em: <<http://www.ruralsoft.com.br/manejo>> Acesso em: 12 Jul. 2004.

SPIER, M.R. ; WOICIECHOWSKI, A. L. ; SOCCOL, C. R. **Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar**. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1. p. 116-116.

STEINKRAUS, K.H. Solid State (Solid-Substrate) Food/Beverage Fermentations Involving Fungi. **Acta Biotechnology**, 1984, 4, p. 83-88.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 446.

SVENDSEN, A. ; BISGAARD-FRANTZEN, H. **PCT Patent Publication. WO 94/0**. 1994.

SURMELY, R. ; ALVAREZ, H. ; CEREDA, M.P. ; VILPOUX, O.F. Hidrólise do Amido. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. v. 3. Cap. 15. 2003. p. 377-395.

SZAKACS, G. **Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation**. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, Clermont-Ferrand, France. 2004. v. 1. p. 20

TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amyloclastic Enzyme to the Fermentation Industry. **J. Ind. Eng. Chem**, 1914, 6, p. 824-828.

TANGERDY, R.P. Solid State Fermentation. In: **Trends in Biotechnology**, 1985, v. 3(4), p. 96-99.

TIERNY, L. ; DANKO, S. ; DAUBERMAN, J. ; VAHA-VAHE, P. ; WINETZKY, D. **Performance Advantages of Novel α -Amylases in Automatic Dishwashing**. Am Oil Chem. Soc. 86th. San Antonio Annual Meeting, 1995.

TIMAR-BALÁZSY, A. ; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation**. England: Butterworth Heinemann, 1998. 444p.

TOLAN, J.S. ; **Pulp and Paper**. In: GODFREY, T. ; WEST, S. Editors. Industrial Zymology. 2 ed. New York: Stockton Press, 1996. p. 327-338.

TUNGA, R. ; TUNGA, B.S. **Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation**. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 2003. 12p.

USA (2004). **Salt Induced Precipitation of Proteins**. University of Chicago. Disponível em: <<http://sosnick.uchicago.edu/precpsalt.html>>. Acesso em 16 out 2004a. 2p.

USA (2004). **Protein Precipitation**. University of Chicago. Disponível em: <<http://sosnick.uchicago.edu/precintro.html>>. Acesso em 16 out 2004b. 2 p.

USA (2004). *Rhizopus* sp. Disponível em: <http://www.doctorfungus.com/thefunqi/rhizopus.htm> Acesso em: nov. 2004c. p. 1-4.

VANDENBERGHE, L. **Développement d'un Procédé pour la Production d'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro-Industrie du Manioc**. Thèse de Docteur de UTC. Université de Technologie de Compiègne, 2000. 205 p.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C. ; VAN DER VEEN, B. ; UITDEHAAG, J.C.M. ; LEEMHUIS, H. ; DIJKHUIZEN, L. **Properties and Applications os Starch Converting Enzymes of Alpha Amylase Family**. J. Biotechnol. , 2002; 94:137-155.

VAN EE, J.H. ; VAN RIJSWIJK, W.C. ; BOLLIER, M. **Enzymatic Automated Dishwash Detergents**. Chim Oggi. 1992. 10. p. 21-24.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.

WANG, D *et al.* **Fermentation and Enzyme Technology**. USA: John Wiley, Inc, 1979. 374 p.

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

WOICIECHOWSKI, A.L. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Goma Xantana a Partir de Resíduos Agroindustriais de Café e de Mandioca**. Curitiba, 2001. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. 153 p.

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

ZANGIROLAMI, T. C. **Otimização da Produção de Xilitol a partir de Xilose por *Cândida parapsilosis* Através de Análise por Superfície de Resposta**. Campinas, 1992. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, FEA - Unicamp.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglucosidase Imobilizada**. Campinas, 1989. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. FEA, UNICAMP.

ZILIOI, P.C.; WOICIECHOWSKI, A.L. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. **Xanthan Gum Production by Solid-State Fermentation using Cassava Bagasse as Carbon Source**. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, 2004. v. 1. p. 52

ANEXO 1 – CÁLCULO DA CONTAGEM DE ESPOROS USANDO A CÂMARA DE NEUBAUER

Cálculo da Contagem de esporos usando a Câmara de Neubauer

Considerando-se que a câmara de Neubauer contém 25 quadrículos. Entre a câmara e a lamínula, forma-se um filme líquido da diluição preparada de 0,1 mm de espessura. A dimensão de cada quadrículo é de 0,2 mm x 0,2 mm. Portanto, em cada quadrículo temos o volume de 4×10^{-6} ml :

Equivalências:

1 ml	1 cm ³
1 ml	1000 mm ³
X ml	0,004 mm ³
$X = 0,004 \text{ mm}^3$	4×10^{-7}
1000 mm ³	1 ml

Portanto, em 1 quadrículo temos 4×10^{-6} ml.

ANEXO 2 – CÁLCULO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE (U)

1) Valores das absorbâncias lidas no espectrofotômetro (620 nm) são plotadas na curva (Abs. (à 620 nm) x Concentração de glicose (em μ moles) para obter os valores da conc. de glicose;

2) **Atividade da α -amilase (U)** = Conc. glicose (μ moles) / vol. do extrato enzimático (ml) / tempo de incubação (min)

3) **Atividade da α -amilase (U/g fécula de mandioca)**

Em cada 100 ml de extrato fermentado, temos 10 g de fermentado (diluição 1:10)

Então em 5 ml de extrato fermentado, temos $y = 0,05$ g de fermentado

Peso total do meio fermentativo g (tempo=0 horas) = Contém x gramas de fécula

Em cada 0,05 g fermentado, temos y gramas de fécula

Então: U / y gramas de fécula

5) **Atividade da α -amilase (U/g MS)**

MS= (qtde fécula+qtde bagaço) da FES (em gramas)

Em cada 100 ml de extrato fermentado, temos 10 g de fermentado (diluição 1:10)

Então em 5 ml de extrato fermentado, temos $y = 0,05$ g de fermentado

Peso total do meio fermentativo g (tempo=0 horas) = Contém x gramas de (fécula+bagaço)

Em cada 0,05 g fermentado, temos = y gramas de (fécula+bagaço)

Então: U / y g MS (fécula+bagaço)

ANEXO 3 – CÁLCULO DA ATIVIDADE DA AMILOGLUCOSIDASE (U)

1) Valores das absorbâncias lidas no espectrofotômetro (540 nm) são plotadas na curva (Abs. à 540 nm x Concentração de amido, em μ moles) para obter os valores da conc. de glicose;

2) **Atividade da amiloglucosidase (U)** = Conc. glicose (μ moles) / vol. do extrato enzimático (ml) / tempo de incubação (30 min)

3) **Atividade da amiloglucosidase (U/g fécula de mandioca)**

Em cada 100 ml de extrato fermentado, temos 10 g de fermentado (diluição 1:10)

Então em 5 ml de ext. fermentado, temos $y = 0,05$ g de fermentado

4) Peso total do meio fermentativo (tempo=0 horas) = Contém x gramas de fécula

Em cada 0,05 g fermentado, temos = y gramas de fécula

Então: U / y g de fécula

5) **Atividade da amiloglucosidase (U/g MS)**

MS= (qtde fécula + qtde bagaço) da FES (em gramas)

Em cada 100 ml de extrato fermentado, temos 10 g de fermentado (diluição 1:10)

Então em 5 ml de ext. fermentado, temos $y = 0,05$ g de fermentado

Peso total do meio fermentativo g (tempo=0 horas) = Contém x gramas de (fécula+bagaço)

Em cada 0,05 g fermentado, temos = y gramas de (fécula+bagaço)

Então: U / y g MS (fécula+bagaço)