

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

JHONATA LIMA PEREIRA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR *ASPERGILLUS ORYZAE*
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

BRASÍLIA, DF

2014

JHONATA LIMA PEREIRA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR *ASPERGILLUS ORYZAE*
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Assinatura do Orientador

BRASÍLIA, DF

2014

JHONATA LIMA PEREIRA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR *ASPERGILLUS ORYZAE*
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Larissa Fernandes Matos
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, e porque sem Ele nada disso estaria acontecendo comigo.

Agradeço a minha orientadora Profa. Daniela Orsi, por ter me ajudado, ter me ensinado, e por ter sido muito mais que a minha orientadora do TCC, mas também uma orientadora no âmbito profissional.

Agradeço aos meus pais Jessé e Zilda, por sempre me apoiarem em meus projetos e sempre entenderem as minhas dificuldades e também a minha irmã Samyra, por sempre estar por perto.

Agradeço também aos meus familiares e amigos que me dão força para continuar a caminhada e que torcem pelo meu sucesso.

Agradeço aos professores que me deram os recursos necessários para ser um grande profissional e me ajudaram a construir uma visão mais crítica dos fatos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Exemplos da estrutura de amilose e amilopectina. (A) Amilose – polímero linear de aproximadamente 6.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. (B) Amilopectina – polímero ramificado de 10 – 60 unidades de glicose unidas pelas ligações α -1,4 e 15 – 45 unidades de glicose com ligações α -1,6	13
FIGURA 2 – Exemplos do modo de atuação de diferentes enzimas sobre o amido. Os círculos pintados de preto representam a porção redutora de uma cadeia oligossacarídica	14
FIGURA 3 - Influência da temperatura na atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	33
FIGURA 4 - Influência da temperatura na estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	35
FIGURA 5 - Influência do pH na atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	36
FIGURA 6 - Influência do pH na estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	37
FIGURA 7 - Superfície de resposta e curva de contorno com as interações da concentração do amido e do volume de extrato enzimático bruto na hidrólise do amido	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Exemplos de enzimas que agem sobre o amido e seus derivados.....	12
TABELA 2 - Valores decodificados utilizados no planejamento experimental	31
TABELA 3 – Atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i> no estudo da estabilidade térmica	34
TABELA 4 - Análise de umidade dos substratos utilizados na FES	38
TABELA 5 - Atividade enzimática do extrato bruto obtido a partir do farelo de trigo e da farinha de banana em 1, 30 e 60 dias de armazenamento na temperatura de 8°C	41
TABELA 6 - Testes preliminares da hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do <i>A. oryzae</i> no farelo de trigo	42
TABELA 7 – Testes preliminares da hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do <i>A. oryzae</i> na farinha de banana	43
TABELA 8 – Planejamento composto central 2 ² codificado e decodificado (valores reais entre parênteses), com os resultados experimentais (hidrólise do amido determinada em teor de sólidos solúveis).....	45
TABELA 9 – Efeitos da concentração do amido e do volume de extrato enzimático bruto na hidrólise do amido	46
TABELA 10 – Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental	46

TABELA 11 – Hidrólise de fontes comerciais de amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do <i>A. oryzae</i> na farinha de banana	48
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Enzimas amilolíticas.....	11
1.2 Microrganismos produtores de amilases	17
1.3 Fermentação no Estado Sólido (FES)	19
1.4 Resíduos utilizados na FES (Fermentação no Estado Sólido)	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos gerais	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 Microrganismo e manutenção das cepas	25
4.2 Determinação da atividade amilolítica.....	25
4.3 Estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática	26
4.4 Obtenção da suspensão de esporos utilizada para inocular os meios de cultivo na FES	27
4.5 Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção do extrato enzimático bruto	28
4.6 Determinação da umidade dos meios de cultivo	29
4.7 Testes preliminares para estudo da hidrólise do amido em açúcares utilizando extrato enzimático bruto do fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	29
4.8 Planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido em açúcares utilizando extrato enzimático bruto do fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	30
4.10 Aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise de fontes comerciais de amido como mandioca, milho e aveia	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	33

5.2	Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	36
5.3	Fermentação no estado sólido (FES) pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i> para obtenção do extrato enzimático bruto	37
5.4	Testes preliminares da liquefação e sacarificação do amido utilizando extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	41
5.5	Planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido utilizando extrato enzimático bruto produzido por fermentação em estado sólido na farinha de banana verde pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	44
5.6	Aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise de fontes comerciais de amido como mandioca, milho e aveia	48
6.	CONCLUSÃO	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

As amilases são utilizadas em diversos processos industriais e possuem um grande potencial biotecnológico. O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosso produtor de enzimas amilolíticas e é considerado seguro para uso em alimentos. Esse trabalho teve como objetivo a produção de enzimas amilolíticas a partir do fungo *Aspergillus oryzae* por fermentação no estado sólido utilizando substratos de fermentação alternativos e econômicos (farelo de trigo, farinha de banana verde e farelo de bagaço de laranja). No estudo da estabilidade térmica, as enzimas ficaram estáveis em uma faixa de temperatura de 10 a 40°C, com perda de atividade em 60°C. No estudo da estabilidade enzimática em diferentes pHs, as amilases tiveram maior atividade em pH 5,0. O farelo de trigo e a farinha de banana permitiram um bom crescimento do fungo e a obtenção de extratos brutos com alta atividade enzimática. Os extratos enzimáticos brutos conservaram sua atividade durante 60 dias de armazenamento na temperatura de 8°C. Foi feito um planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido pelo extrato enzimático bruto produzido pelo *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido na farinha de banana. No planejamento composto central 2² estudou-se a influência das variáveis: concentração do amido (1-40%, p/v) e volume de extrato enzimático bruto (1-10 mL) na hidrólise do amido. O maior teor de sólidos solúveis (16,9°Brix) foi obtido no ensaio que continha concentração de amido de 40,0% e volume de extrato enzimático de 5 mL. No estudo da hidrólise de diferentes fontes comerciais de amido (amido de mandioca, amido de milho e flocos de aveia), o amido de mandioca foi o que apresentou melhores resultados. Após 36 horas de incubação de 10 g de amido de mandioca gelificado na concentração de 40% (p/v) e 5 mL de extrato enzimático foi obtido uma solução açucarada de 20,33°Brix. Os resultados deste trabalho são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas, que depois de concentradas e secas, poderão ser utilizadas na produção de maltodextrinas.

Palavras chave – *Aspergillus oryzae*, enzimas amilolíticas, fermentação no estado sólido, farelo de trigo, farinha de banana verde.

ABSTRACT

Amylases are used in many industrial processes and have a great biotechnological potential. The *Aspergillus oryzae* is a filamentous fungus that produces amylases and is considered safe for use in foods. The aim of this study was the production of amylolytic enzymes by the fungus *Aspergillus oryzae* by solid state fermentation using alternative and economic substrates (wheat bran, green banana flour and orange bagasse bran). In the study of thermal stability, the enzymes were stable at a temperature range from 10 to 40°C, with loss of activity at 60°C. In the study of enzyme stability at different pH values, amylases had higher activity at pH 5.0. The wheat bran and the banana flour allowed good growth of the fungus and obtaining crude extracts with high enzyme activity. The crude extracts preserved its enzymatic activity during 60 days of storage at 8°C. An experimental design was performed for the study of starch hydrolysis by crude enzymatic extract produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* on banana flour. The central composite design 2^2 was used to study the influence of variables: concentration of starch (1-40%, w/v) and the volume of crude enzyme extract (1-10 mL) in the hydrolysis of starch. The higher content of soluble solids (16,9°Brix) was obtained in the test that contained starch concentration of 40.0% and volume of enzyme extract of 5mL. In the study of the hydrolysis of various commercial sources of starch (cassava starch, corn starch and oat flakes), cassava starch showed the best results. After 36 hours of incubation of 10g of cassava starch gelled at a concentration of 40% (w/v) and 5mL of enzyme extract, it was obtained a sugar solution of 20.33°Brix. The results of this study are important for future applications of these enzymes that after concentrated and dried can be used in the production of maltodextrins.

Key words – *Aspergillus oryzae*, amylolytic enzymes, solid state fermentation, wheat bran, green banana flour

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas amilolíticas

As enzimas apresentam três características em comum: são proteínas, são catalisadores e possuem seletividade nos diversos substratos (DAMODARAM et al., 2010). Elas participam da catálise biológica sendo envolvidas em diversos processos bioquímicos, que dentre as várias funções, tem a capacidade de hidrolisar moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos mais complexos em açúcares mais simples. Também participam das funções de síntese, rotatividade (*turnover*), sinalização e metabolismo. A especificidade enzimática permite que cada enzima, em sua maioria, possua um substrato específico, como exemplos, as amilases são enzimas responsáveis pela quebra do amido atuando nas ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina (SOARES et al., 2010).

As amilases são carboidrases que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 encontradas no amido, no glicogênio e nos derivados de sacarídeos. Segundo a tabela 1 há uma variedade de enzimas desse grupo que podem ser divididas pelas suas características como: modo de ação (endo- ou exo-), retenção ou inversão de configuração (α ou β), afinidade pelas ligações, dentre outras (KOBBLITZ, 2008).

Na tabela 1, podemos notar que o principal substrato das amilases é o amido. Ele é um polímero de D-glicose onde as suas moléculas são unidas por ligações glicosídicas. O amido é bastante estável em pHs básicos mas é hidrolizado em pHs ácidos (GALDINO, 2008). Em vegetais, o amido é encontrado em pequenos grânulos que se diferenciam, dependendo da espécie (KOBBLITZ, 2008). No amido existem dois tipos de polímeros de glicose que são: a amilose e a amilopectina (GALDINO, 2008).

TABELA 1 – Exemplos de enzimas que agem sobre o amido e seus derivados

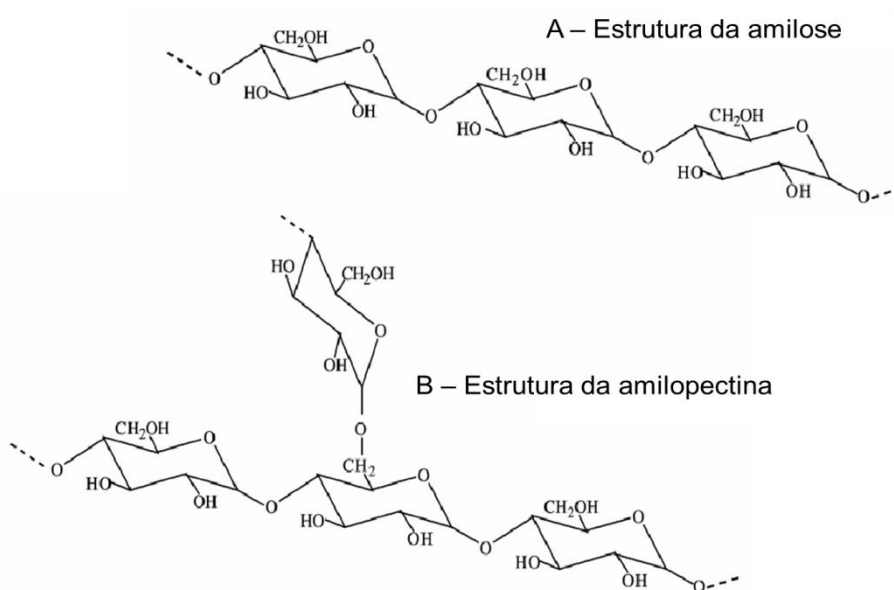
Enzimas	Ligação preferencial para hidrólise	Substrato preferencial	Resultado da hidrólise
Endoenzimas			
α -amilases EC 3.2.1.1	α -1,4	Amido	Dextrinas, maltose
Isoamilase EC 3.2.1.68	α -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase EC 3.2.1.10	α -1,6	Dextrinas-limite	Maltose, maltotriose
Ciclomaltodextrinase EC 3.2.1.54	α -1,4	Ciclodextrinas e dextrinas lineares	Maltose, maltotriose
Pululanase EC 3.2.1.41	α -1,6	Pupulana e amilopectina	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase EC 3.2.1.57	α -1,4	Pupulana	Isopanose
Exoenzimas			
β -amilase EC 3.2.1.2	α -1,4	Amido	β -maltose, dextrina
Glicoamilase EC 3.2.1.3	α -1,4, α -1,6	Amido	β -glicosés
α -glicosidase EC 3.2.1.20	α -1,4	Diversos	α -glicosés
Ciclomalatodextrina-glucano-transferase EC 2.4.1.19	α -1,4	Amido	Ciclodextrinas

Fonte: KOBLITZ (2008)

A amilose é um polímero linear formado pela união de 500 - 20.000 unidades de D-glicose unidas por ligação glicosídicas α -1,4, como mostra a figura 1. A amilose possui uma estrutura, que em solução, tende a se enovelar formando uma hélice simples e em alguns casos uma dupla hélice. Ela possui uma propriedade de

identificação, pois pode formar um complexo com o iodo, alterando a coloração da solução para azul-escuro (KOBBLITZ, 2008; GALDINO, 2008).

FIGURA 1 – Exemplos da estrutura de amilose e amilopectina. (A) Amilose – polímero linear de aproximadamente 6.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. (B) Amilopectina – polímero ramificado de 10 – 60 unidades de glicose unidas pelas ligações α -1,4 e 15 – 45 unidades de glicose com ligações α -1,6.



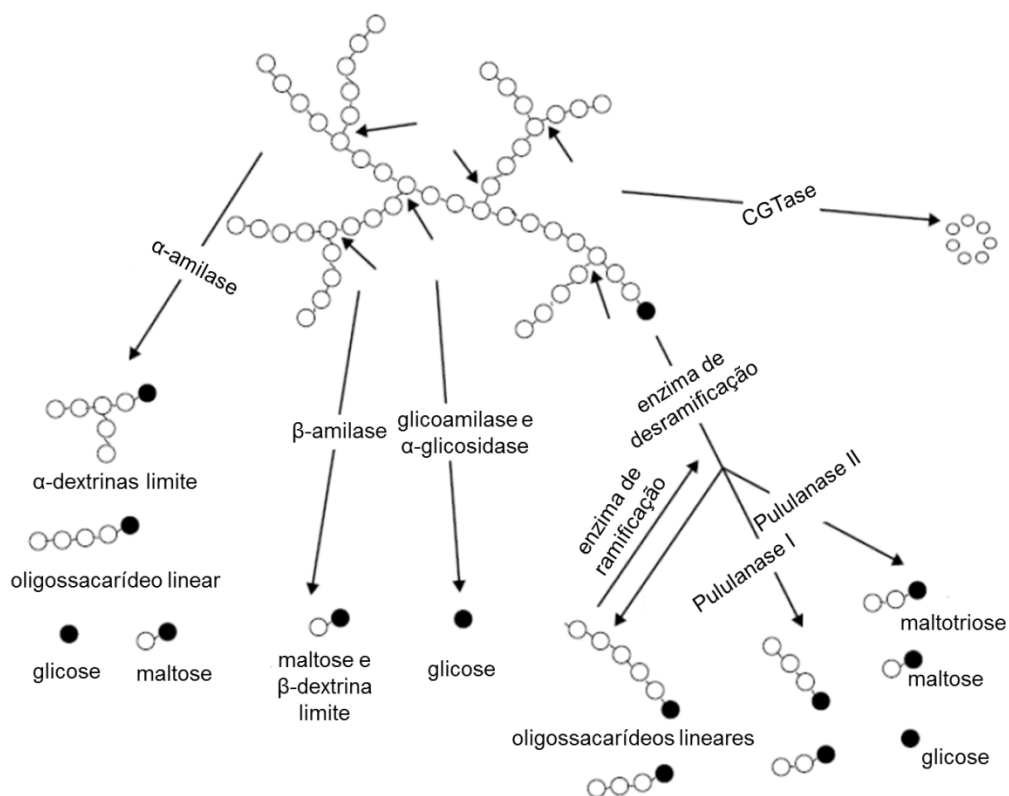
Fonte - SOUZA et al., 2010 modificado

A amilopectina é constituída por pequenas cadeias lineares unidas por ligações glicosídicas α -1,4 com 10 – 60 unidades de glicose e por cadeias laterais unidas por ligações glicosídicas α -1,6 com 15 – 45 unidades de glicose, como mostra a figura 1. As amilopectinas de fonte vegetal podem conter outros grupos como os fosfatos e o hidroxil, aumentando assim a sua hidrofobicidade (GALDINO, 2008). Quando em solução, a amilopectina misturada com o iodo produz uma coloração violácea, sendo assim o iodo é um bom indicador de pureza de amilose, que deve ser em muitos casos separada da amilopectina (GALDINO, 2008).

Existem muitas enzimas hidrolíticas que conseguem degradar o amido, produzidos por diversos organismos para obtenção de fontes energéticas. Elas podem ser divididas em: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e

transferases. Alguns exemplos dessas enzimas são mostrados na figura 2 (GALDINO, 2008).

FIGURA 2 – Exemplos do modo de atuação de diferentes enzimas sobre o amido. Os círculos pintados de preto representam a parte redutora de uma cadeia oligossacarídica.



Fonte – GALDINO, 2008 modificado

As endoamilases são enzimas que clivam amilose e amilopectina de forma desordenada, podendo clivar tanto nas extremidades como no meio do polímero. Estão relacionadas à rápida perda de viscosidade da solução e liberação de dextrinas. Um exemplo de endoamilase é a α -amilase (GALDINO, 2008; KOBLITZ, 2008).

Já as exoamilases são capazes de clivar nas extremidades do polímero de amilose e amilopectina, em geral a extremidade não redutora, produzindo glicose ou maltose. Tem como atividade, em solução e em curto prazo, a pequena alteração da viscosidade e a rápida liberação de açúcares redutores. Um exemplo de exoamilase é a glicoamilase (GALDINO, 2008; KOBLITZ, 2008).

As enzimas desramificadoras são amilases que possuem uma maior afinidade de clivagem nas ligações α -1,6 do que pela α -1,4. São exemplos de enzimas desramificadoras as isoamilases, que possuem ação restrita em dextrina de tamanho médio, e a pululanase, que possui a mesma função da isoamilase, mas é capaz de hidrolisar pululana (KOBLOITZ, 2008).

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas extracelulares encontradas geralmente em plantas complexas (principalmente nas sementes amiláceas, no período da germinação), animais (encontrado na saliva e no pâncreas) e microrganismos (tanto em bactérias como em fungos filamentosos, mas não é encontrado em leveduras alcoólicas). Elas clivam a amilose e amilopectina através da reação de hidrólise na ligação glicosídica D-(α -1,4). Em curto prazo, as α -amilases produzem uma solução contendo vários oligossacarídeos de diversos tamanhos, como as maltodextrinas. Com o passar do tempo, o produto final da catálise das α -amilases é uma mistura de maltose, maltotriose e oligossacarídeos ramificados de 6 – 8 unidades de glicose com ligações tanto α -1,4 como α -1,6, lembrando que essas enzimas não clivam as ligações do tipo α -1,6, nem os resíduos de glicose terminais. A fonte do amido e a fonte da enzima utilizada determinam o tipo de dextrina produzida (SOUZA et al., 2010; KOBLOITZ, 2008; BIAZUS et al., 2009).

As características bioquímicas das α -amilases diferem dependendo da fonte. Em geral seu ponto isoelétrico é de 5,4, com temperatura e pH ótimos de 55°C e 4,7, respectivamente, e peso molecular variando entre 50-120kDa, dependendo da fonte da amilase produzida (BIAZUS et al., 2009). Como exemplo dessa variação temos as α -amilases de *Bacillus subtilis* que tem um pH ótimo de 5,0 a 7,0 enquanto que as α -amilase de *Geobacillus stearothermophilus* tem um pH ótimo de 3,0. Considerando a temperatura ótima das α -amilases produzidas por vegetais e animais, gira em torno de 40°C, já as de microrganismos podem ter uma atividade com temperatura ótima acima dos 70°C, com uma alta estabilidade térmica. Com essas características as α -amilases de microrganismos são muito utilizadas pela indústria alimentícia, pois em as altas temperaturas, a enzima consegue hidrolisar e ao mesmo tempo diminui o risco de contaminação microbiana. Como a gelatinização do amido é superior a 50°C, utilizando as enzimas que conseguem clivar em altas

temperaturas, evita-se o processo de gelatinização prévia do amido e posteriormente o seu resfriamento para ocorrer à reação de clivagem do polímero (KOBBLITZ, 2008).

A β -amilase (E.C. 3.2.1.2) é uma enzima extracelular que hidrolisa amido e glicogênio, ambos quebrados na ligação α -1,4. São liberados, após a hidrólise, unidades de maltose com a inversão do C1 de α para β . Tem uma faixa de pH ótimo entre 4,5 e 6,5 e temperatura ótima de 55°C, mas a 60°C a enzima já fica inativa. Seu ponto isoelétrico é de 4,8, com o peso molecular de 20-50kDa (BIAZUS et al., 2009; KOBBLITZ, 2008). São enzimas sulfidrílicas e, portanto são inativadas por oxidação, podendo ser protegidas por agentes redutores. A β -amilase é encontrada em vegetais (sementes amiláceas em conjunto com as α -amilases) e microrganismos como o *Bacilluspolimeria*, mas não são conhecidas β -amilases produzidas por animais. A amilose hidrolisada por β -amilases resulta em uma solução de aproximadamente 90% de maltose e 10% de glicose e maltotriose. A maltose atua como um forte inibidor competitivo das β -amilases, sendo assim para produzir a glicose e maltotriose precisa de mais tempo de reação e/ou uma alta concentração enzimática. Já com a amilopectina, a hidrólise é incompleta resultando uma porcentagem de 50% a 60% de maltose e o restante são oligossacarídeos de alta massa molecular com todas as ligações α -1,6 (KOBBLITZ, 2008).

As glicoamilases (EC 3.2.1.3) são também chamadas de amiloglicosidases. São exoenzimas que hidrolisam tanto amilose como amilopectina e removem unidades de glicose a partir da extremidade não redutora. Possuem uma maior afinidade nas ligações do tipo α -1,4, mas também clivam as ligações do tipo α -1,6. Na teoria, as glicoamilases teriam a capacidade de hidrolisar todo o amido em glicose, mas na prática isso não ocorre tendo uma hidrólise incompleta, sendo necessário o uso de α -amilase para completar o processo de hidrólise do amido. Isso é explicado, pois em altas concentrações de glicose, as glicoamilases tendem a sintetizar isomaltoses (dissacarídeos ligados por duas unidades de glicose por uma ligação do tipo α -1,6). As glicoamilases são produzidas principalmente por microrganismos, com destaque para os fungos filamentosos como os do gênero *Aspergillus*. Elas costumam ter a atividade ótima de pH em torno de 4,0 – 5,0 e temperatura ótima que varia de 50°C a 60°C (KOBBLITZ, 2008).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas utilizadas industrialmente e com grande potencial biotecnológico. Elas são aplicadas em diversos processos industriais, como a indústria têxtil, de bebidas destiladas, cervejarias, de panificação, de cereais, para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica, dentre outras (BIAZUS et al., 2009; SOARES et al., 2010).

Mesmo as amilases tendo diversas fontes, a maior quantidade de amilases encontradas no mercado é proveniente de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dentro da indústria alimentícia, a aplicação de amilases para gerar diferentes produtos é um processo que tem se diversificado e apresenta rendimentos econômicos consideravelmente altos (SOARES et al., 2010).

1.2 Microrganismos produtores de amilases

As enzimas amilolíticas ocorrem em muitos microrganismos, principalmente em fungos filamentosos e bactérias. Devido à facilidade de cultivo e às desejáveis propriedades físico-químicas das enzimas, certas espécies de *Aspergillus* e *Bacillus* são quase exclusivamente usadas para a produção de α -amilase comercial (DJEKRIF-DAKHMOCHE et al., 2006; PANDEY et al., 2005). Já a amiloglicosidase é, na sua maior parte, produzida por espécies de fungos *Aspergillus* e *Rhizopus sp.* (NOROUZIAN et al., 2006; SOCCOL et al., 2005). Uma vantagem é que as amilases fúngicas possuem um alto poder de sacarificação quando comparados com as amilases bacterianas (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007).

As indústrias biotecnológicas tem explorado a utilização de fungos filamentosos para a produção de enzimas, fermentação de produtos de baixo valor agregado e na biodegradação de resíduos. Os fungos filamentosos apresentam algumas vantagens como: maior secreção enzimática, que supera tanto as bactérias como as leveduras, não formam corpúsculos de inclusão, podem ser feitas modificações pós-traducionais, maior facilidade no cultivo, alto nível de expressão proteica e melhor capacidade de fermentação. As indústrias têm usado os fungos filamentosos principalmente na produção de peptídeos recombinantes e metabólitos secundários utilizados em terapias, produção de compostos fermentados e de

enzimas hidrolíticas, na indústria de alimentos e na sacarificação de resíduos das agroindústrias (MONCLARO, 2014).

Os *Aspergillus spp.* são anamórficos e pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Existem cerca de 200 espécies isoladas do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies mais conhecidas são a *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Eles podem tanto ser patogênicos ao ser humano como exemplo o *A. flavus*, que é produtor de aflatoxinas, como podem possuir o status de GRAS (*Generally Regarded as Safe*) que são amplamente usados nas indústrias como exemplo o *A. nidulans*, *A. oryzae* e o *A. niger*. Suas colônias podem ser de diversas colorações como branca, rosada, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A sua taxa de crescimento varia de rápida a moderadamente rápida (SOARES et al., 2010; MONCLARO, 2014).

As espécies de *Aspergillus* possuem grande aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Esse fungo é considerado o melhor produtor de exo- e endoglicosídeos, e possui elevadas concentrações de β -glicosídeos, onde tem grande vantagem nos processos de sacarificação da biomassa (ZÚÑIGA et al., 2011). As suas enzimas são utilizadas na clarificação de sucos de fruta e bebidas alcoólicas, produção de xarope de glicose e maltose, dentre outros produtos (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007). O *Aspergillus oryzae* é reconhecido pela *Food and Drug Administration* como um fungo seguro para uso em alimentos e tem sido muito utilizado na produção de vários tipos de enzimas como amilases, celulasas, pectinases, glicosídeos, lipases, proteases, peptidases (MARESMA et al., 2010).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo pertencente ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*. Essa seção tem como características morfológicas espécies com conídios em tons de amarelo escuro a marrom, esterigmatas uni e bisseriados e esclerócitos escuros (MONCLARO, 2014). O *A. oryzae* foi isolado pela primeira vez em 1876 por H. Ahlburg, a partir do *koji* (PINTO, 2012). Na Ásia é muito utilizado na produção do molho shoyo, sake, missô e de outros produtos, porque possui uma alta secreção

enzimática. O Japão utiliza esse fungo há bastante tempo tanto na produção enzimática, como na indústria em geral (MONCLARO, 2014).

Com o sequenciamento do genoma do *A. oryzae* descobriu-se que ele possui cerca de 30 genes preditos para a produção de glicosilhidrolases o que o torna bastante importante na utilização da hidrólise de biomassa lignocelulósica. Quando se compara o genoma do *A. oryzae* com do *A. fumigatus* e do *A. nidulans*, pode se perceber um aumento de 2.000 a 3.000 genes, mantendo a mesma densidade gênica. Isso pode explicar o aumento da produção de hidrolases, pois o *A. oryzae* na sua seleção provavelmente passou por vários ambientes em que era necessária uma eficiente hidrólise para obter os nutrientes essenciais (MONCLARO, 2014). Um fato muito importante é que em seu genoma o *A. oryzae* possui genes para a produção de aflatoxinas, porém não foi encontrado nenhum *A. oryzae* que produzisse tal toxina. Uma hipótese seria a seleção das linhagens não tóxicas para a utilização em alimentos (PINTO, 2012).

Na indústria japonesa e na literatura, o *A. oryzae* se desenvolve principalmente no estado sólido. Quando se compara o crescimento do fungo no estado sólido e no estado líquido, o *A. oryzae* consegue secretar mais proteínas na fermentação no estado sólido (PINTO, 2012).

1.3 Fermentação no Estado Sólido (FES)

A fermentação no Estado Sólido (FES) pode ser definida como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em substratos sólidos umedecidos ocorre na ausência (ou quase) de água na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001; RAHARDJO et al., 2005).

O material sólido, utilizado na 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 et al., 2005).

A fermentação submersa ainda é muito utilizada, totalizando um percentual aproximado de 90% dos processos fermentativos industriais (ZÚÑIGA et al., 2011). Mas a fermentação no estado sólido tem ganhado importância na produção de enzimas de microrganismos pelas vantagens econômicas, quando comparada com a fermentação submersa. A fermentação no estado sólido se desenvolveu nos países orientais, mas tem atraído a atenção dos países ocidentais pela possibilidade de usar substratos agroindustriais, que são abundantes e baratos. Estudos têm mostrado que quando comparada a fermentação no estado sólido com a fermentação submersa, a fermentação no estado sólido possui uma alta produção volumétrica, diminuição dos problemas com a inibição do próprio substrato e uma maior estabilidade enzimática nas variações tanto de pH como de temperatura. A fermentação ocorre em um tempo mais curto, sendo assim, diminui a degradação por proteases (KAPNOOR et al., 2010; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007).

Mas a fermentação do estado sólido tem algumas desvantagens como a dificuldade de controlar as condições do cultivo, além de se ter um preparo prévio do substrato para evitar o crescimento microbiano (PINTO, 2012). A fermentação no estado sólido tem sido usada para diversos microrganismos, mas os fungos filamentosos são os mais explorados para esse tipo de fermentação, porque eles crescem em todo o substrato sólido e são grandes produtores de enzimas extracelulares (KAPNOOR et al., 2010; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007).

Dentro do processo fermentativo, existem diversos parâmetros que influenciam no processo como a concentração de fontes de carbono, fósforo e nitrogênio, a umidade, o pH e a temperatura. A diferenciação desses parâmetros define a resposta das células fúngicas, sendo necessários estudos para saber quais são as necessidades nutricionais referentes a cada fungo para ter uma produção enzimática expressiva (ZÚÑIGA et al., 2011).

Alguns estudos mostraram que quando comparados os tipos de cultivo utilizando o mesmo substrato, por exemplo, farelo de trigo, e o mesmo fungo, por exemplo, *A. oryzae*, os resultados mostraram que no estado sólido o fungo conseguiu secretar de quatro a seis vezes mais proteínas do que na cultura submersa, e ainda foram produzidas enzimas com um complexo perfil proteico. Outros trabalhos identificaram que alguns grupos enzimáticos tem a preferência pelo estado sólido, como a enzima glicoamilase B de *A. oryzae*, com baixa expressão enzimática em culturas submersas. Já a protease ácida de *A. oryzae* só consegue ser produzida em cultivos no estado sólido (PINTO, 2012).

1.4 Resíduos utilizados na FES (Fermentação no Estado Sólido)

O setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade de resíduos que podem ser usados como substrato para o crescimento celular na FES. A matéria orgânica presente nesse material pode ser usada como fonte de energia para o crescimento e para a síntese de biomassa celular. A utilização dos resíduos da agroindústria, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para fermentação, também ajuda na diminuição dos problemas de poluição (SILVA et al., 2005).

Diversos resíduos agroindustriais podem ser usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas como: farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de mandioca, bagaço de cana de-açúcar, casca e polpa de café, casca e bagaço de maçã e outros resíduos do processamento de frutas, proteínas de soro de queijo, entre outros. (KRONBAUER et al., 2007; LADEIRA, et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS, 2006).

Amido e substratos amiláceos foram descritos como os materiais mais adequados para a alta produtividade de amilases, podendo ser aproveitados resíduos agrícolas de processamento de materiais amiláceos como farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, bagaço de maçã e de frutas cítricas, resíduo do processamento de banana, resíduo do processamento de beterraba, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para crescimento celular e

produção eficiente de amilases pelos fungos (BOTELLA et al., 2005; DJEKRIFF-DAKHMOUCHE et al., 2006).

O farelo de trigo possui em sua composição mais de 60% de carboidratos seguidos de proteínas e água livre. Ele é rico em fibras insolúveis e pobre em proteínas digeríveis para o homem. Sendo assim é uma ótima matéria prima, pois não é muito utilizada para consumo humano e se torna uma alternativa para o crescimento fúngico tanto para extração de proteínas como para o enriquecimento e/ou disponibilização de nutrientes (SILVEIRA et al., 2007).

A farinha de banana pode ser obtida a partir secagem natural ou artificial de bananas verdes ou semiverdes das variedades Nanica, Nanicão, Terra, Prata ou Cavendish. A composição da farinha de banana verde seca tem por volta de 75g/100g de amido, 90,72g/100g de fração glicídica e 4,73g/100g de proteína bruta. São parâmetros que auxiliam no crescimento fúngico e extração de proteínas amilolíticas (BORGES et al., 2009).

A laranja é um fruto produzido pela laranjeira, *Citrus sinensis*. É um fruto híbrido, criado através do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citrus reticulata*). Ela é muito conhecida por seu alto teor de vitamina C, mais também é rica em pectina, uma das partes solúveis da fibra vegetal. Possui em media 11,7g/100g de carboidratos, 1,7g/100g de fibra alimentar e 0,8g/100g de proteínas (BENELLI, 2005). Alguns trabalhos como o de AHMED et al., 2013 utilizam o bagaço da laranja para a extração de pectinases, sendo assim uma matéria prima com crescimento fúngico expressiva.

2. JUSTIFICATIVA

As amilases são enzimas amplamente utilizadas nos processos industriais, nas áreas de bebidas, panificação, obtenção de xaropes de glicose, dentre outras. As amilases produzidas por fungos tem ganhado cada vez mais o mercado pela sua possibilidade de uso em diversas faixas tanto de temperatura como de pH, o que facilita a adequação dos processos industriais. O *Aspergillus oryzae* é considerado um fungo GRAS, sendo seguro para a área da indústria alimentícia e tem sido cada vez mais estudado para produção de vários tipos de enzimas como amilases, celulases, pectinases, glicosidases, lipases, proteases e peptidases.

Uma das característicaspeculiares douso de *A.oryzaena* produção de enzimas é a fermentação no estado sólido. A fermentação no estado sólido, mesmo tendo as suas vantagens sobre a fermentação submersa, ainda não é tão utilizada, mas tem ganhado força principalmente com a possibilidade do uso de resíduos agroindustriais como substrato de fermentação. O uso de resíduos agroindustriais, além de ser econômico, ajuda a reduzir a poluição ambiental, pois esses materiais geralmente são produzidos em grandes quantidades e muitas vezes tornam-se um problema ecológico e sanitário.

Considerando as informações acima, estudos que utilizam fungos seguros, como no caso do *Aspergillus oryzae*, e que utilizam processos fermentativos no estado sólido, empregando substratos de fermentação alternativos e econômicos, são de grande relevância para que novos processos industriais voltados à produção de enzimas na área de alimentos sejam criados e para que os custos de processos industriais antigos sejam diminuídos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo a produção de enzimas amilolíticas a partir do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* por fermentação no estado sólido utilizando substratos de fermentação alternativos e econômicos para posterior uso na liquefação e sacarificação de amidos comerciais.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a possibilidade do aproveitamento de substratos de fermentação econômicos para a produção de amilases;
- Verificar em qual substrato ocorre a maior produção enzimática: farelo de trigo, farinha de banana verde e farelo de bagaço de laranja
- Caracterizar as enzimas produzidas quanto ao pH e temperatura de atividade e de estabilidade.
- Estudar através de planejamento experimental a hidrólise do amido com uso do extrato enzimático bruto.
- Estudar a aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise de fontes comerciais de amido como mandioca, milho e aveia.

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismo e manutenção das cepas

Foi utilizada a cepa do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, (Ahlburg) Cohn n° CCT: 3940, adquirida na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais). O fungo foi conservado sob refrigeração a 8°C em meio ágar extrato de malte, sendo repicado a cada três meses.

O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio ágar extrato de malte inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 24°C durante 5-7 dias. Após este tempo, os tubos foram mantidos sob refrigeração.

4.2 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica liquidificante foi determinada pela diminuição da capacidade de ligação entre o amido e o iodo de uma solução de amido tratada com uma solução enzimática bruta, conforme metodologia descrita por GUANDALINI, 2007, com modificações.

A solução enzimática bruta foi preparada a partir do crescimento fúngico em ágar extrato de malte sólido crescido depois de cinco dias. Foi adicionado 30mL de água em uma cultura de 50mL de meio sólido. Depois foi raspado com a ajuda de uma espátula. Após a filtração, o extrato enzimático foi guardado em um balão volumétrico onde foi usado para os testes.

A mistura foi constituída por 0,5 mL de solução enzimática bruta e 0,5 mL de solução de amido 0,5% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,1 M ajustado a pH 5. Após 10 minutos de reação a 50°C, foram adicionados 0,5 mL de reagente iodo (0,03% de I₂ + 0,3% de KI). Após homogeneização a mistura da reação foi diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.

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

enzima, substituiu-se o amido pelo volume equivalente em solução tampão. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições da reação.

4.3 Estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática

Para a avaliação do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática, após o crescimento do fungo em Agar Sabouraud Dextrose a 24°C por 7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril. Essa suspensão foi homogeneizada e filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos. O extrato obtido foi utilizado para determinar a atividade enzimática.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se 0,5 mL de solução de amido 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,1 M e pH 5 com 0,5 mL de extrato enzimático nas seguintes temperaturas: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C por 10 minutos e banho de fervura por 30 segundos. Após incubação, foram adicionados 0,5 mL de reagente iodo (0,03% de I₂ + 0,3% de KI). A mistura de reação foi homogeneizada e diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.

Na avaliação da termoestabilidade das enzimas, o extrato enzimático foi mantido por 30 e 60 minutos, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 80°C. Após este período, foram tomadas amostras para determinar a atividade enzimática, conforme descrito no item 3.2.

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi estudado incubando-se o extrato enzimático com as seguintes soluções tampão: citrato-fosfato (pH 3,0); acetato (pH 4,0 e 5,0); fosfato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e bicarbonato (pH 9,0 e 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro da faixa de capacidade tamponante. Sendo assim, alíquotas de 0,5 mL de solução de amido 0,5% (p/v) preparadas nos diferentes sistemas tampão foram adicionadas em 0,5 mL de extrato enzimático e

incubadas em banho-maria por 10 minutos a 40°C. Após incubação, foram adicionados 0,5 mL de reagente iodo (0,03% de I₂ + 0,3% de KI). A mistura de reação foi homogeneizada e diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620 nm em espectrofotômetro.

O efeito do pH na estabilidade enzimática foi determinado na faixa de pH de 3,0 a 10,0. As misturas de 3,0 mL de extrato enzimático bruto e 3,0 mL das soluções tampão de diferentes valores de pH foram incubadas pelo período de 40 minutos a 40°C. A atividade residual de cada uma das misturas de extrato enzimático nos tampões com diferentes valores de pH foi determinada incubando-se 0,5 mL de solução aquosa de amido 0,5% (p/v) com 0,5 mL de extrato enzimático na temperatura de 50°C por 10 minutos. Após incubação, foram adicionados 0,5 mL de reagente iodo (0,03% de I₂ + 0,3% de KI). A mistura de reação foi homogeneizada e diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620 nm em espectrofotômetro.

4.4 Obtenção da suspensão de esporos utilizada para inocular os meios de cultivo na FES

O meio para produção de esporos foi constituído por 50 mL do Agar Sabouraud dextrose distribuído em frascos erlenmeyers de 250 mL, posteriormente inclinados e, após solidificação, o micro-organismo foi repicado no mesmo. Após o crescimento do fungo, incubado a 24°C por aproximadamente 5-7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril, para obter uma suspensão de esporos. Em seguida foram coletados aproximadamente 15µL da suspensão com a ajuda de uma pipeta e foi adicionado na câmara de Neubauer com 16 quadrantes. Depois da contagem dos esporos concentração de esporos utilizada para inocular os meios de cultivo na FES foi de 10⁵ – 10⁶ esporos/mL.

4.5 Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção do extrato enzimático bruto

Como meio de cultivo no processo de FES para obtenção das amilases, foram utilizados: farelo de trigo, farinha de banana verde (obtidos comercialmente) e farelo de bagaço de laranja. O bagaço de laranja foi seco a 60°C em estufa de secagem e triturado em liquidificador, para obtenção de farelo sem granulometria definida. Os meios de cultivos foram armazenados em sacos de polietileno à temperatura ambiente.

A FES foi conduzida em erlenmeyer de 250mL contendo 10 g de cada meio de cultivo e água destilada em quantidade suficiente para umedecer o substrato, sem deixar água aparente. Todos os erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 20 min. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos (10^5 - 10^6 esporos/g) e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias.

Após 7 dias de crescimento do fungo, foi obtido um extrato enzimático de cada meio de cultivo, com o objetivo de estabelecer em qual meio ocorreu a maior produção de enzimas. Na obtenção do extrato enzimático bruto, para 10 g de substrato foi adicionado 50 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, em seguida, filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos.

O extrato enzimático bruto foi conservado sob refrigeração a 8°C e nos intervalos de 30 e 60 dias de armazenamento foram realizados testes de atividade enzimática, conforme descrito no item 4.2, para avaliar a estabilidade do extrato enzimático bruto. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

4.6 Determinação da umidade dos meios de cultivo

Foram realizadas análises de umidade (AOAC, 2006) para cada substrato umedecido com água destilada (farelo de trigo, farinha de banana verde e farelo de bagaço de laranja). As análises foram feitas em triplicata.

4.7 Testes preliminares para estudo da hidrólise do amido em açúcares utilizando extrato enzimático bruto do fungo *Aspergillus oryzae*

No primeiro teste preliminar para o estudo da hidrólise de amido em açúcares, o extrato bruto enzimático foi obtido com a FES do fungo *Aspergillus oryzae* no farelo de trigo. Na obtenção do extrato enzimático bruto, para cada 10 g de farelo de trigo foram adicionado 50mL de água destilada estéril. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, em seguida, filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos. O extrato enzimático bruto obtido foi utilizado nos testes.

Verificou-se a influência da concentração do amido (3, 5 e 10%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (10, 20 e 40mL) na hidrólise do amido em açúcares. O amido da marca Dinâmica foi gelificado em água e para os testes foram pesados 10 g de amido gelificado em cada erlenmeyer. Os testes foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL incubados em agitador rotatório de bancada com agitação de 200 rpm, em temperatura ambiente. As amostras foram coletadas após 12 horas de reação e para cada amostra foi medido o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro.

No segundo teste preliminar para o estudo da hidrólise do amido em açúcares, o extrato bruto enzimático foi obtido com a FES do fungo *Aspergillus oryzae* na farinha de banana verde. Na obtenção do extrato enzimático bruto, para cada 10 g de farinha de banana foram adicionados 50mL de água destilada estéril. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, em seguida, filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos. O extrato enzimático bruto obtido foi utilizado nos testes.

Verificou-se a influencia da concentração do amido (10, 20 e 30%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (10, 20 e 40mL) na hidrólise do amido em açúcares. Para preparação do amido 10%, foi pesado 1 g de amido da marca Dinâmica em erlenmeyer e foram adicionados 10mL de água destilada. Todas as soluções de amido foram gelificadas em autoclave. Os testes foram realizados em frascos erlenmeyers de 125mL incubados em agitador rotatório de bancada com agitação de 200 rpm, em temperatura ambiente. As amostras foram coletadas após 24 e 36 horas de reação e para cada amostra foi medido o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro.

Não foram feitos testes preliminares com o extrato bruto enzimático do farelo de bagaço de laranja, pois o fungo não conseguiu se desenvolver no meio o que impossibilitou a produção de enzimas que pudessem ser testadas.

4.8 Planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido em açúcares utilizando extrato enzimático bruto do fungo *Aspergillus oryzae*

Foi utilizado planejamento composto central 2^2 e metodologia de superfície de resposta para estudar a influência das variáveis: concentração do amido (1-40%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (1-10mL) na hidrólise do amido em açúcares. Os ensaios totalizaram 12 experimentos, incluindo quatro ensaios referentes ao fatorial 2^2 (-1 e +1), quatro repetições no ponto central (0) para se estimar o erro e consequente análise de variância e quatro ensaios nos pontos axiais ($\alpha = 1,41$) para se obter o modelo polinomial quadrático, gerando após validação estatística, a superfície de resposta e curva de contorno. A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) e o coeficiente de determinação (R^2). A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e os valores decodificados do planejamento experimental.

TABELA 2 - Valores decodificados utilizados no planejamento experimental

<i>Variável</i>	<i>Valor</i>				
	<i>-α</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>	<i>+α</i>
Concentração de amido (%)	1,0	6,7	20,0	34,0	40,0
Volume de enzima (mL)	1,0	2,2	5,0	8,5	10,0

O extrato bruto enzimático foi obtido com a FES do fungo *Aspergillus oryzae* na farinha de banana verde. Na obtenção do extrato enzimático bruto, para cada 10 g de farinha de banana foram adicionados 50 mL de água destilada estéril. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, em seguida, filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos. O extrato enzimático bruto obtido foi utilizado nos ensaios do planejamento experimental.

Para preparação do amido 20%, foram pesados 2 g de amido da marca Dinâmica em erlenmeyer e foram adicionados 10 mL de água destilada. Todas as soluções de amido foram gelificadas em autoclave. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL incubados em agitador rotatório de bancada com agitação de 200 rpm, em temperatura ambiente. As amostras foram coletadas após 36 horas de reação e para cada amostra foi medido o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro.

4.9 Aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise de fontes comerciais de amido como mandioca, milho e aveia

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido em açúcares, ficou definido usar concentração do amido de 40% (p/v) e volume de extrato enzimático bruto de 5 mL para o estudo da hidrólise de fontes comerciais de amido em açúcares.

O extrato bruto da enzima foi obtido conforme descrito no item 4.5 e para preparação das soluções contendo amido 40%, foram pesados 4 g de polvilho doce (fonte comercial de amido de mandioca), amido de milho e flocos finos de aveia em erlenmeyers e foram adicionados 10 mL de água destilada. Todas as soluções

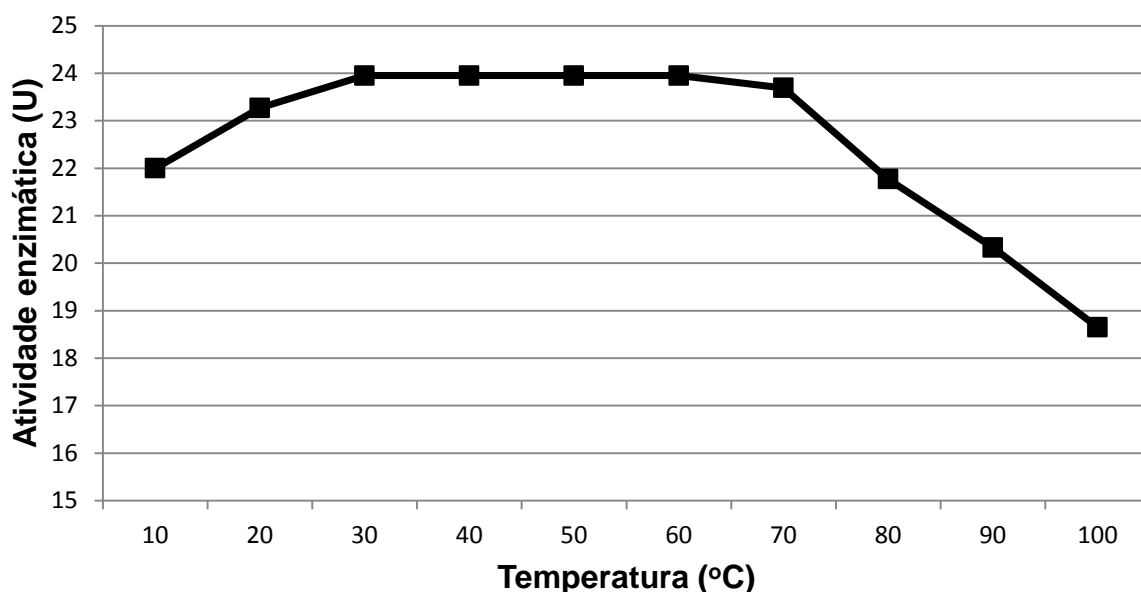
contendo amido foram gelificadas em autoclave. Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos erlenmeyers de 125 mL incubados em agitador rotatório de bancada com agitação de 200 rpm, em temperatura ambiente. As amostras foram coletadas após 36 horas de reação e para cada amostra foi medido o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*

A atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* em meio de cultivo ágar Saboraud dextrose foi medida em diferentes temperaturas como mostra a Figura 3, onde a faixa de temperatura em que as enzimas obtiveram maior atividade foi entre 30°C e 60°C. Observa-se também que a partir dos 70°C há um declínio gradual da atividade enzimática, mas não chegando a uma ausência da atividade.

FIGURA 3 - Influência da temperatura na atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*. Incubou-se 0,5mL de solução de amido 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,1M e pH 5 com 0,5mL de extrato enzimático em diferentes temperaturas por 10 minutos e banho-maria por 30 segundos. Após a incubação, foram adicionados 0,5mL de reagente iodo e diluída em 10mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.



Fonte – Próprio autor

No trabalho de FARID, 2011 as amilases produzidas pelo *Aspergillus oryzae* LS1 (no tampão fosfato de pH 6 e tendo como substrato o amido solúvel) mostraram um aumento gradual da atividade enzimática com o aumento da temperatura, com atividade máxima em 55°C. Acima de 55°C a atividade começou a declinar. No

trabalho de NWAGU, 2011 as enzimas amilolíticas produzidas por *Fusarium* sp. obtiveram alta atividade enzimática na faixa de temperatura de 40 a 70°C, sendo a atividade máxima na temperatura de 50°C. Como pode se notar as amilases produzidas pelo fungo *A. Oryzae* deste estudo tiveram uma faixa de atividade enzimática comparável com os outros trabalhos, mostrando que as enzimas fúngicas têm atividade numa faixa de temperatura bastante versátil para as atividades industriais.

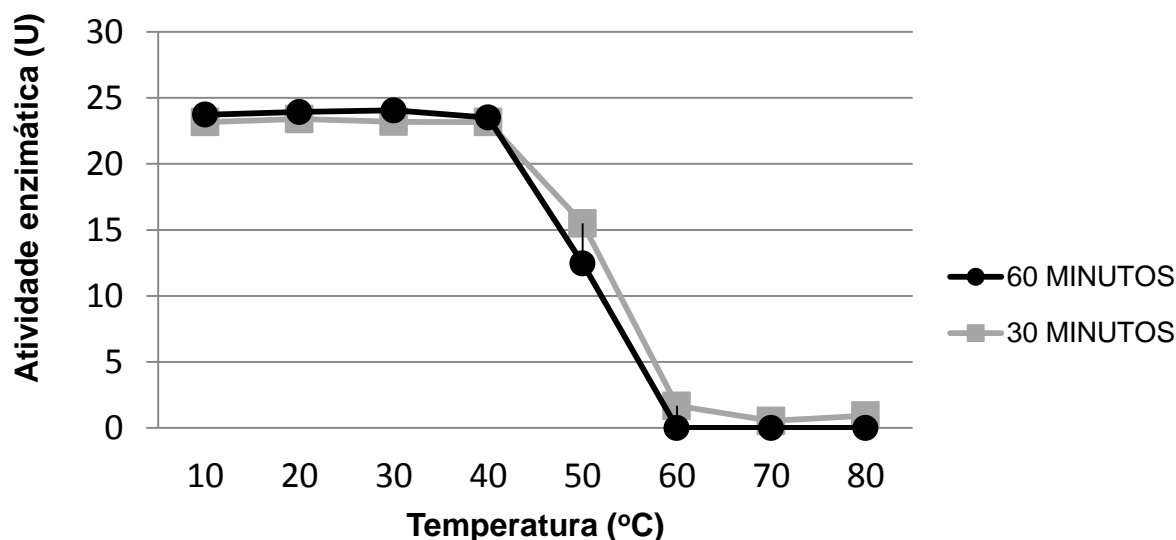
No estudo da estabilidade enzimática, foi observado que as amilases produzidas por *A. oryzae* não são termoresistentes. Na Tabela 3 e Figura 4 observou-se que a atividade enzimática ficou estável em uma faixa de temperatura de 10°C a 40°C, apresentando declínio na temperatura de 50°C, tendo praticamente perdido a atividade a partir da temperatura de 60°C.

TABELA 3 – Atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae* no estudo da estabilidade térmica

Temperatura - °C	Atividade – U	
	30 minutos	60 minutos
10	23,17	23,73
20	23,40	23,94
30	23,20	24,06
40	23,17	23,51
50	15,49	12,47
60	1,67	0
70	0,53	0
80	0,93	0

Fonte – Próprio autor

FIGURA 4 - Influência da temperatura na estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*. O extrato enzimático foi mantido por 30 e 60 minutos, em ausência de substrato, em diversas temperaturas. Após, incubou-se 0,5mL de solução de amido 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,1M e pH 5 com 0,5mL de extrato enzimático em diferentes temperaturas por 10 minutos e banho-maria por 30 segundos. Após a incubação, foram adicionados 0,5mL de reagente iodo e diluída em 10mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.



Fonte – Próprio autor

Os resultados deste estudo de estabilidade térmica foram similares ao reportados por ZAMBARE, 2010 onde a maior atividade de glicoamilase produzida por *A.oryzae* ocorreu nas temperaturas de 20°C a 40°C, com atividade máxima em 30°C. No trabalho de SHIVARAMAKRISHNAN, 2007 foi relatado boa síntese de α -amilase de *A. oryzae* nas temperaturas de 20°C a 45°C, com atividade máxima em 30°C. FRANCIS, 2003 obtiveram a maior atividade de α -amilase produzida por *A.oryzae* nas temperaturas de 25°C a 30°C, com declínio da atividade em temperaturas superiores.

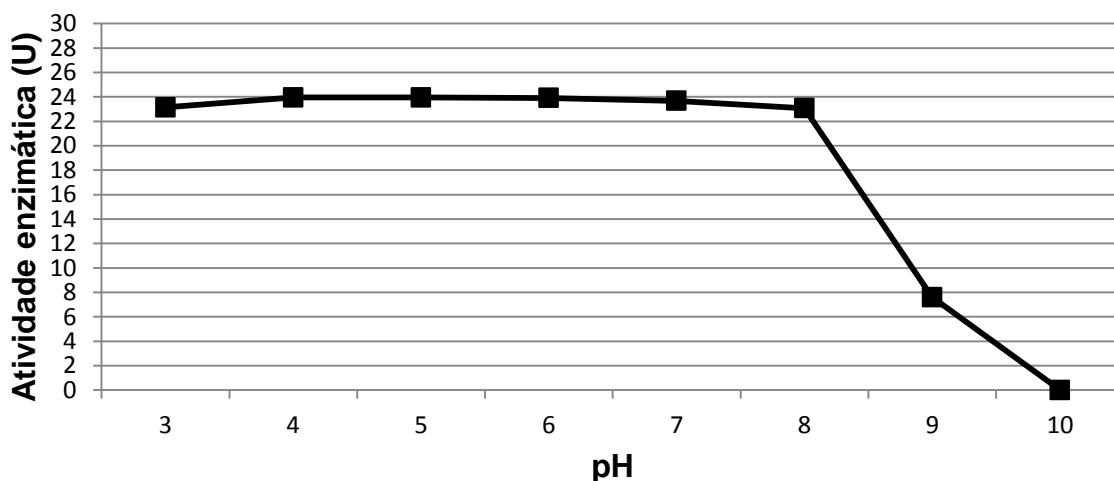
Neste estudo as amilases produzidas pelo *A.oryzae*, após 60 minutos de incubação do extrato enzimático, apresentaram, atividade enzimática de 94%, 50% e 0% nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C, respectivamente. Segundo FARID, 2011 as amilases produzidas por *Aspergillus oryzae* LS1, depois de noventa minutos de incubação da enzima, mostraram melhor estabilidade térmica com atividade

enzimática de 94%, 73% e 13% nas temperaturas de 50°C, 60°C e 65°C, respectivamente. Já no trabalho de NWAGU, 2011 as enzimas amilolíticas produzidas por *Fusarium* sp. foram termicamente mais estáveis, apresentando atividade enzimática de 78% a 70°C, após 30 minutos de incubação do extrato. Os testes de estabilidade térmica são importantes, pois definem as condições para as várias utilizações que as enzimas possuem industrialmente.

5.2 Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

A atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* em meio de cultivo Agar Saboraud Dextrose foi medida em diferentes valores de pH, utilizando sistemas tampões, que estabilizam a solução mantendo seu pH estável. Os resultados se encontram na Figura 5, onde foi observado uma grande faixa de pH na qual as enzimas amilolíticas conseguem trabalhar, facilitando assim o uso em diferentes processos industriais. A faixa de pH de maior atividade enzimática ficou entre 3,0 e 8,0, apresentando declínio da atividade em pH 9,0, com perda de atividade enzimática em pH 10,0.

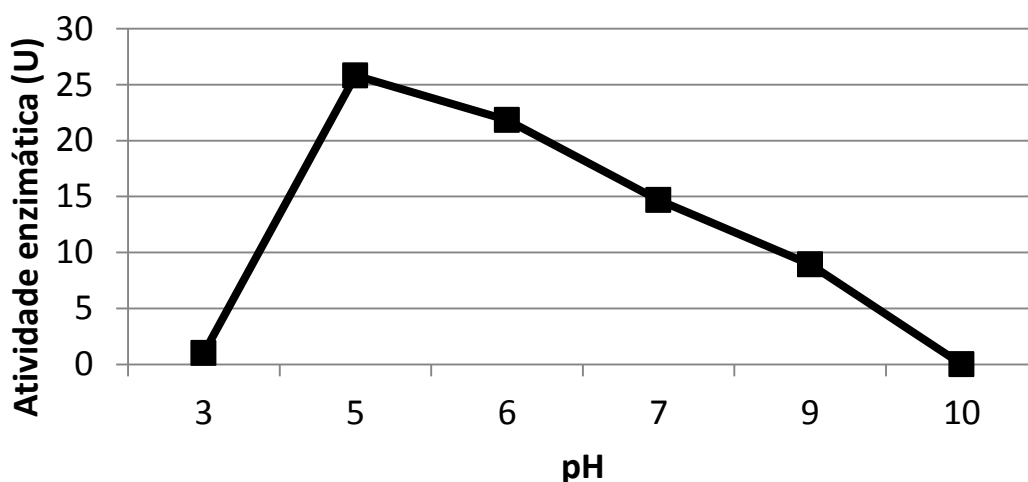
FIGURA 5 - Influência do pH na atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*. Foram feitas alíquotas de 0,5mL de solução de amido 0,5% (p/v) em diversos tampões de pH diferentes na concentração de 0,1M, adicionando posteriormente 0,5mL de extrato enzimático incubando em temperatura de 40°C por 10 minutos e banho-maria por 30 segundos. Após a incubação, foram adicionados 0,5mL de reagente iodo e diluída em 10mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.



Fonte - Próprio autor

No estudo da estabilidade enzimática em diferentes valores de pH (Figura 6), foi observado que as amilases produzidas por *A. oryzae* tiveram maior atividade em pH 5,0, apresentando declínio gradual da atividade com aumento do pH e perda de atividade enzimática em pH 10.

FIGURA 6 - Influência do pH na estabilidade das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*. Foi incubado o 3,0mL de extrato enzimático em 3,0mL de solução tampão de diferentes pH e concentração de 0,1M por 40 minutos a 40°C. Posteriormente incubou-se 0,5mL de extrato enzimático na temperatura de 50°C por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 0,5mL de reagente iodo e diluída em 10mL de água destilada. A leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro.



Fonte – Próprio autor

Os resultados deste estudo foram similares ao estudo de ZAMBARE, 2010 onde a glicoamilase de *A. oryzae* apresentou atividade considerável na faixa de pH de 3,0 a 9,0, com atividade máxima em pH 5,0. No estudo de SHIVARAMAKRISHNAN, 2007 também foi relatado boa síntese de α -amilase de *A. oryzae* na faixa de pH de 3,0 a 9,0, com atividade máxima em pH 5,0.

5.3. Fermentação no estado sólido (FES) pelo fungo *Aspergillus oryzae* para obtenção do extrato enzimático bruto

No processo de FES para obtenção das amilases, foram utilizados os substratos de fermentação farelo de trigo, farinha de banana verde e farelo de bagaço de laranja. A FES foi conduzida em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de

cada meio de cultivo umedecido. Todos os erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 20 min. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos (10^5 - 10^6 esporos/g) de *A. oryzae* e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias.

Após 7 dias de incubação, os meios fermentativos do farelo de trigo e da farinha de banana verde, todos comerciais, proporcionaram um bom crescimento ao fungo, possibilitando assim a produção das enzimas amilolíticas para posterior extração e avaliação de atividade enzimática. Já o meio com o farelo de bagaço de laranja inibiu completamente o crescimento do fungo, não possibilitando assim a continuação da sua utilização como um possível meio para a produção enzimática pelo fungo em estudo. Foram realizadas análises de umidade nos substratos de fermentação (farelo de trigo, farinha de banana verde e farelo de bagaço de laranja), umedecidos com água destilada (Tabela 4).

TABELA 4 - Análise de umidade dos substratos utilizados na FES.

Após a incubação a leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Meio de cultivo	Umidade (%)
Farelo de trigo	32,99 ± 0,33
Farinha de banana	45,30 ± 0,36
Farelo de bagaço de laranja	38,23 ± 0,37

Fonte – Próprio autor

O material sólido, utilizado na 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 (SOCCOL et al., 2005).

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio.

Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado. Esses fatores causados pela alta umidade podem facilitar a contaminação bacteriana. Em oposição, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado (DEL BIANCHI et al., 2001).

Os resultados de umidade dos substratos deste trabalho (32,99-45,30%) foram similares com o trabalho de GUANDALINI, 2007 que utilizou farelo e casca de arroz na proporção 7/3 (p/p), hidratados até 47% de umidade para produzir amilases por FES a partir fungo *Metarhizium anisopliae*. No estudo de CRUZ, 2011 o efeito da umidade do farelo de casca de mandioca foi avaliado na FES para produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger*. Foi adicionada água destilada ao resíduo seco, de maneira a se obter aproximadamente 45, 55, 65 e 75 % de umidade. Foi observada maior atividade enzimática no substrato com 45% de umidade e tendência de queda na atividade enzimática com aumento da umidade.

Vários trabalhos já utilizaram o farelo de trigo para a produção de enzimas. No trabalho de SINGH, 2012 os autores usaram farelo de trigo na FES para produzir amilases e xilanases a partir de *Streptomyces* sp., sendo que a produção de amilases foi superior a produção de xilanases. No trabalho de SHABBIRI, 2012, o farelo de trigo foi o segundo melhor meio de fermentação para a produção de proteases por *Brevibacterium linens*. No estudo de SINGH & KAUR, 2012 o farelo de trigo foi utilizado para a produção de celulase por *Bacillus* sp. A vantagem do farelo de trigo é ser um subproduto agrícola de baixo custo, sendo uma fonte de carboidratos que ajuda na produção enzimática dos fungos e/ou bactérias.

A farinha de casca de banana verde também é uma rica fonte de carboidratos. No trabalho de SILVA, 2002 foi utilizada casca de banana para a produção de pectinase pelo *Penicillium viridicatum*. Quanto ao bagaço de laranja não foi possível o crescimento do *A. oryzae*, mas trabalhos como o de SILVA, 2002 utilizaram esse material para a produção de pectinases pelo *Penicillium viridicatum*.

Mesmo que o *A. oryzae* tivesse conseguido se desenvolver no bagaço de laranja, provavelmente a produção de amilases não seria boa, pois de acordo com AHMED, 2013 esse substrato não contém amido em sua composição, sendo composto por 50,4% de pectina, 5,1% de proteínas, 4% de cinzas e 4% de umidade.

Alguns autores afirmam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer à indução da produção de amilases por microrganismos (GUPTA et al., 2003; PANDEY, 2005). 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 enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples, neste caso as amilases, que convertem o amido em açúcares simples, garantindo, assim, o seu crescimento e desenvolvimento.

Na obtenção do extrato enzimático bruto, para 10 g de substrato foi adicionado 50 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, em seguida, filtrada em papel filtro para remoção dos sólidos. Observou-se um maior rendimento em volume de extrato enzimático bruto obtido a partir da farinha de banana, que também se apresentava menos turvo após filtração. O farelo de trigo absorveu parte do tampão adicionado durante o processo de extração das enzimas e assim, obteve-se menor volume de extrato enzimático bruto.

O extrato enzimático bruto foi conservado sob refrigeração a 8°C e nos intervalos de 30 e 60 dias de armazenamento foram realizados testes de atividade enzimática, para avaliar a estabilidade do extrato enzimático bruto (Tabela 5).

TABELA 5 - Atividade enzimática do extrato bruto obtido a partir do farelo de trigo e da farinha de banana em 1, 30 e 60 dias de armazenamento na temperatura de 8°C. Após a incubação a leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Meio de cultivo	Atividade enzimática (U)		
	1 dia	30 dias	60 dias
Farelo de trigo	121,87 ± 0,01	119,57 ± 0,01	107,17 ± 0,01
Farinha de banana	121,55 ± 0,01	120,72 ± 0,02	108,15 ± 0,01

Fonte – Próprio autor

Os resultados mostraram que tanto no farelo de trigo como na farinha de banana, o *Aspergillus oryzae* produziu enzimas amilolíticas com alta atividade e que se mantiveram estáveis durante os 60 dias de armazenamento na temperatura de 8°C. Em 60 dias de armazenamento a 8°C, o extrato enzimático bruto obtido a partir do farelo de trigo e da farinha de banana manteve 87,93% e 88,97% de sua atividade enzimática, respectivamente. Esses dados são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas, que mesmo sem sofrer nenhum processo de concentração e purificação, mostraram elevada estabilidade por 2 meses de armazenamento.

5.4 Testes preliminares da liquefação e sacarificação do amido utilizando extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido pelo fungo *Aspergillus oryzae*

Foram realizados os testes preliminares com o extrato bruto das enzimas obtidas pela fermentação no estado sólido do *A. oryzae* utilizando o farelo de trigo. Verificou-se a influência da concentração do amido (3, 5 e 10%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (10, 20 e 40 mL) na hidrólise do amido gelificado. As amostras foram incubadas em agitador rotatório de bancada, por 12 horas em temperatura ambiente. Para cada amostra foi determinado o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro, que pode ser considerado aproximadamente como o teor de

açúcares em porcentagem (% ou g/100 mL) e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - Testes preliminares da hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do *A. oryzae* no farelo de trigo

Teste	Concentração de amido (%)	Volume de extrato enzimático (mL)	Sólidos solúveis (°Brix) 12 horas de reação
1	3,0	10,0	2,5
2	3,0	20,0	2,1
3	3,0	40,0	2,1
4	5,0	10,0	3,1
5	5,0	20,0	3,2
6	5,0	40,0	3,1
7	10,0	10,0	5,8
8	10,0	20,0	5,8
9	10,0	40,0	5,2

Fonte – Próprio autor

Pode se notar que para todos os testes com diferentes concentrações de amido, com o aumento do volume de extrato enzimático, o teor de sólidos solúveis foi o mesmo ou menor. Essa constatação sugere a possibilidade de diminuição desses volumes enzimáticos testados nos próximos experimentos. Percebe-se também que quanto maior a concentração de amido gelificado, maior foi o teor de sólidos solúveis da solução final. Esses dados sugerem a possibilidade de aumento dessas concentrações de amido testadas nos próximos experimentos.

Nos experimentos seguintes, foram realizados testes para as amilases produzidas na fermentação no estado sólido na farinha de banana verde pelo *A. oryzae*. Verificou-se a influencia da concentração do amido (10, 20 e 30%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (10, 20 e 40 mL) na hidrólise do amido em açúcares. As amostras foram incubadas em agitador rotatório de bancada, por 24 e 36 horas em temperatura ambiente. Para cada amostra foi determinado o teor de

sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro, que pode ser considerado aproximadamente como o teor de açúcares em porcentagem (% ou g/100 mL) e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 – Testes preliminares da hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do *A. oryzae* na farinha de banana

Teste	Concentração de amido (%)	Volume de extrato enzimático (mL)	Sólidos solúveis (°Brix) 24 horas de reação	Sólidos solúveis (°Brix) 36 horas de reação
1	10,0	2,0	6,5	8,1
2	10,0	5,0	5,5	7,1
3	10,0	10,0	5,0	6,0
4	20,0	2,0	12,3	13,9
5	20,0	5,0	11,3	12,0
6	20,0	10,0	8,8	9,1
7	30,0	2,0	15,8	17,5
8	30,0	5,0	15,5	16,0
9	30,0	10,0	12,0	14,0

Fonte – Próprio autor

Observou-se que para todos os testes com diferentes concentrações de amido, o aumento do volume de extrato enzimático, diminuiu o teor de sólidos solúveis das soluções. Notou-se também que quanto maior a concentração de amido gelificado, maior foi o teor de sólidos solúveis da solução final. O tempo de reação de 36 horas proporcionou maior hidrólise do amido em relação ao tempo de reação de 24 horas. O maior teor de sólidos solúveis (17,5°Brix) foi obtido no teste 7, com a mistura de reação de 10 g de amido na concentração de 30% (p/v) e 2,0 mL de volume de extrato enzimático bruto, em 36 horas de reação.

Resultados similares foram reportados no trabalho de COLLARES, 2011 onde o fator que mais influenciou a hidrólise da massa de mandioca fresca com o uso de

amilases comerciais foi a diluição da massa de mandioca em água, que resultou em maiores ou menores concentrações de amido na mistura de reação. No trabalho de COLLARES, 2011 os experimentos que resultaram nos maiores valores de sólidos solúveis (15,0-15,9°Brix) foram obtidos nas menores diluições da massa de mandioca em água, que resultou em concentração de amido de 12%. Já o experimento com o menor teor de sólidos solúveis (9,4°Brix) tinha a maior diluição da massa de mandioca em água, que resultou na menor concentração de amido de 7,3%.

5.5 Planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido utilizando extrato enzimático bruto produzido por fermentação em estado sólido na farinha de banana verde pelo *Aspergillus oryzae*

Os experimentos desta etapa foram realizados baseados nos testes preliminares da hidrólise do amido, utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do *A. oryzae* na farinha de banana. Foi utilizado planejamento composto central 2² e metodologia de superfície de resposta para estudar a influência das variáveis: concentração do amido (1-40%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (1-10 mL) na hidrólise do amido. Para cada ensaio foi determinado o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro, que pode ser considerado aproximadamente como o teor de açúcares em porcentagem (% ou g/100 mL) e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Verificou-se que o menor teor de sólidos solúveis (1,5°Brix) foi obtido no ensaio 5, que continha a menor concentração de amido (1,0%), enquanto que o maior teor de sólidos solúveis (16,9°Brix), foi obtido no ensaio 6, que continha a maior concentração de amido (40,0%).

TABELA 8 – Planejamento composto central 2² codificado e decodificado (valores reais entre parênteses), com os resultados experimentais (hidrólise do amido determinada em teor de sólidos solúveis)

Ensaio	Concentração de amido (%)	Volume de enzima (mL)	Sólidos solúveis (°Brix) 36 horas de reação
1	-1 (6,7)	-1 (2,2)	6,1
2	+1 (34,0)	-1 (2,2)	13,7
3	-1 (6,7)	+1 (8,5)	5,0
4	+1 (34,0)	1 (8,5)	12,1
5	- α (1,0)	0 (5,0)	1,5
6	+ α (40,0)	0 (5,0)	16,9
7	0 (20,0)	- α (1,0)	13,5
8	0 (20,0)	+ α (10,0)	9,1
9	0 (20,0)	0 (5,0)	11,7
10	0 (20,0)	0 (5,0)	12,0
11	0 (20,0)	0 (5,0)	12,0
12	0 (20,0)	0 (5,0)	12,0

Fonte – Próprio autor

A Tabela 9 apresenta os efeitos das variáveis independentes na hidrólise do amido pelas amilases, usando limites de 95% de nível de confiança ($p < 0,05$). Os valores de p são utilizados para checar a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta do modelo. Quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p , maior será a significância do coeficiente, como pode ser observado na Tabela 9, em que todos os parâmetros foram significativos a 95% de nível de confiança ($p < 0,05$). Analisando os parâmetros lineares, observou-se que a variável concentração de amido apresentou efeito positivo significativo, sendo a variável com a maior influência sobre a hidrólise do amido. Já a variável volume do extrato enzimático apresentou efeito negativo estatisticamente significativo.

TABELA 9 – Efeitos da concentração do amido e do volume de extrato enzimático bruto na hidrólise do amido

	Efeito	Erro padrão	t(3)	p
Média	11,9280	0,0749	159,0417	0,000001
(1) Conc. amido (L)	9,1306	0,1062	85,9566	0,000003
Conc. amido (Q)	-3,2548	0,1190	-27,3332	0,0001
(2) Vol. enzima (L)	-1,4302	0,1062	-13,4645	0,0008
Vol. enzima (Q)	-1,1422	0,1190	-9,5925	0,0024
1L x 2L	1,3500	0,1500	9,0000	0,0028

Fonte – Próprio autor

A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) e o coeficiente de determinação (R^2). A análise de variância (ANOVA) está apresentada na Tabela 10.

TABELA 10 – Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	189,37	3	63,12	35,66
Resíduos	14,14	8	1,77	-
Falta de ajuste	14,07	5	-	-
Erro puro	0,07	3	-	-
Total	203,51	11	-	-

Coeficiente de determinação $R^2 = 0,93$, F tabelado $0,95,3,8 = 4,07$

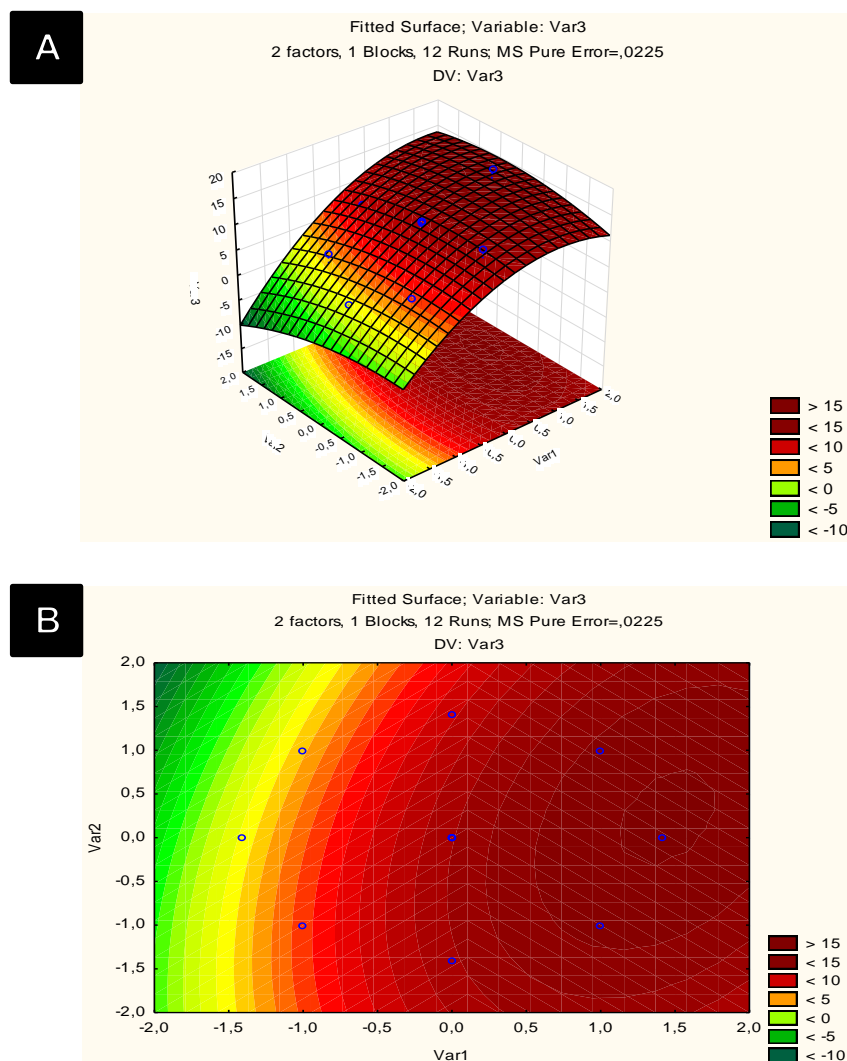
Fonte – Próprio autor

A partir da ANOVA foi obtido o modelo que possui um valor F significativo, o que caracteriza um modelo que pode ser utilizado para prever as respostas de atividade enzimática em função das variáveis independentes. A adequação do

modelo pode ser verificada pelo coeficiente de determinação (R^2), que explica 0,93 da variância total das respostas. O valor de F obtido apartir da ANOVA (35,66) foi 8,76 vezes maior do que o valor de F tabelado (4,07) e indicou que o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança.

A Figura 7 mostra os efeitos da concentração do amido e do volume de extrato enzimático bruto na hidrólise do amido. Foi possível observar que a faixa ótima de concentração de amido para se obter uma maior hidrólise pelo extrato enzimático bruto situou-se entre 34 e 40% (p/v).

FIGURA 7 – Superfície de resposta e curva de contorno com as interações da concentração do amido e do volume de extrato enzimático bruto na hidrólise do amido. A – Gráfico em 3D; B – Gráfico em 2D.



Fonte – Próprio autor

5.6 Aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise de fontes comerciais de amido como mandioca, milho e aveia

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental para estudo da hidrólise do amido em açúcares, ficou definido usar concentração do amido de 40% (p/v) e volume de extrato enzimático bruto de 5 mL para o estudo da hidrólise de fontes comerciais de amido em açúcares. O extrato bruto da enzima foi produzido por fermentação em estado sólido na farinha de banana verde pelo *Aspergillus oryzae*. As fontes comerciais de amido utilizadas foram polvilho doce (fonte comercial de amido de mandioca), amido de milho e flocos finos de aveia, todas gelificadas na concentração de 40%. As amostras foram incubadas em agitador rotatório de bancada com agitação de 200rpm, em temperatura ambiente, por 36 horas e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 – Hidrólise de fontes comerciais de amido utilizando o extrato enzimático bruto obtido pela fermentação no estado sólido do *A. oryzae* na farinha de banana. Após a incubação a leitura foi realizada a 620nm em espectrofotômetro. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Amostra	Sólidos solúveis (°Brix) 36 horas de reação
Polvilho doce	20,33 ± 0,58
Flocos finos de aveia	17,17 ± 0,76
Amido de milho	11,83 ± 0,29

Fonte – Próprio autor

Neste estudo da hidrólise de diferentes fontes comerciais de amido (amido de mandioca, amido de milho e flocos de aveia), o amido de mandioca foi o que apresentou melhores resultados. Após 36 horas de incubação de 10 g de amido de mandioca gelificado na concentração de 40% (p/v) e 5 mL de extrato enzimático foi obtido uma solução açucarada de 20,33°Brix. No trabalho de ARCE, 2005 foi descrito a hidrólise do amido de mandioca com enzimas comerciais e obteve-se um resultado

similar aos obtidos nesse trabalho. ARCE, 2005 obtiveram uma solução de 20,50°Brix, após hidrólise da massa de mandioca fresca com alfa amilase fúngica e amiloglicosidase.

Amidos de diferentes fontes botânicas têm mostrado diferenças na susceptibilidade à hidrólise enzimática. Nos estudos realizados por ROCHA, 2010 com amidos de mandioca, batata-doce, mandioquinha- salsa e batata, o amido de mandioca se mostrou mais susceptível à hidrólise enzimática, com 20,9 % de hidrólise, enquanto que o amido de batata foi o mais resistente a hidrólise enzimática, apresentando 5,9 % de hidrólise. Segundo GUNARATNE e HOOVER, 2002 as diferenças dos amidos na susceptibilidade à hidrólise enzimática têm sido atribuídas ao tamanho do grânulo, área superficial, proporção entre amilose e amilopectina, cristalinidade e comprimento da distribuição dos pontos de ramificação α - (1,6) entre as áreas amorfas e cristalinas da amilopectina. As áreas cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo tornam o mesmo relativamente resistente ao ataque enzimático e químico.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, através do uso de substratos de fermentação econômicos como o farelo de trigo e a farinha de banana verde, foi obtido através de FES do fungo *Aspergillus oryzae*, enzimas amilolíticas com alta atividade e que mantiveram sua atividade durante 60 dias de armazenamento na temperatura de 8°C. Com o uso de planejamento experimental foi possível estudar a hidrólise do amido com uso do extrato enzimático bruto. A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental, ficou definido usar concentração do amido de 40% (p/v) e volume de extrato enzimático bruto de 5 mL na hidrólise de fontes comerciais de amido como polvilho doce (amido de mandioca), amido de milho e flocos finos de aveia. Após 36 horas de incubação do amido de mandioca foi obtida uma solução açucarada de 20,33°Brix. Os resultados deste trabalho são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas.

As perspectivas para a continuação do trabalho, a fim de verificar a viabilidade na área industrial, tem como próximos passos: concentração das enzimas e secagem do conteúdo enzimático através do spray dryer ou pelo método de liofilização. Essas etapas deverão aumentar a duração da enzima, sem perda da atividade. Utilização de cromatografia para saber o perfil glicídico produzido após a incubação do extrato enzimático nos diversos amidos. E por fim, aplicar essas enzimas na produção de maltodextrinas, primeiro em escala laboratorial e posteriormente em escala industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. A.; MOSTAFA, F. A. Utilization of orange bagasse and molokhia stalk for production of pectinase enzyme. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, pg. 449 – 456, 2013.

ARCE, L. S. D.; PASCOLI, M. C.; VILPOUX, O. **Tiquira produzida com enzimas comerciais**. CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2005, Campo Grande, MS. Ciência e tecnologia para a raiz do Brasil: anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.

AOAC - **Official methods of analysis**, Washington, 18 ed., 2006.

BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração**. 229 p., Mestrado em Engenharia de Alimentos, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, Santa Catarina, 2005.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; MÁRQUEZ, J. E.; FRANCO, T.T.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 991 – 1000, 2009.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. Caracterização da farinha de banana verde. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 333 – 339, 2009.

BOTELLA, C.; ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINOI, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace, **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.

COLLARES, R. M. **Otimização do processo hidrólise da mandioca "in natura", com o uso de enzimas amilolíticas e pectinase**, 80 p., Mestrado em Engenharia de Processos, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, Santa Maria, 2011.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca, **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n.4, p.245-249, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em estado sólido**. In: SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial. Engenharia bioquímica, vol. II. Editora Edgard Blucher, 1a. edição. São Paulo, Brasil, 2001.

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

FARID, M. A. F.; SHATA, H. M. A. H. Amylase production from *Aspergillusoryzae*LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, pg. 267 – 274, 2011.

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

GALDINO, A. S. **Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Cryptococcus flavuse* sua aplicação na degradação do amido**, 123 p., Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2008.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**, 77 p., Mestrado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 373-403, 2002.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, **Process Biochemistry**, p. 1-18, 2003.

KAPNOOR, S.; MULIMANI, V. H. Production of α -galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk galacto oligosaccharide hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 211 – 218, 2010.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria de aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242 p.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono, **Boletim do CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa, **Química Nova**, v.33 n.2, p. 324-328, 2010.

MARESMA, B. G.; CASTILLO, B. G.; FERNÁNDEZ, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; RODRIGUES, M. F. A. Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* PT-301 to improve the production of β -fructofuranosidase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 186 – 195, 2010.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis**. 110 p. Mestrado em Biologia Molecular, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2014.

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

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp isolated from Eastern Nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, pg, 649 – 658, 2011.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.1, p.19-26, 2013.

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

PINTO, A. C. R. T. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana**, 57 p., Mestrado em Biologia Molecular, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2012.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24. n. 2, p. 161-179, 2006.

ROCHA, T. S; CARNEIRO, A. P. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 544- 551, 2010.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori***, 81 p., Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2006.

SHABBIRI, K.; ADNAN, A.; JAMIL, S.; AHMAD, W.; NOOR, B.; RAQUIFE, H.M. Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM20158, using statistical approach. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n.3, pg. 1051 – 1061, 2012.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3, **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, 2005.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.4, pg. 318-324, 2002.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.4, p. 805-811, 2007.

SINGH, J.; KAUR, P. Optimization of process parameters for cellulose production from *Bacillus* sp. JA14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n.4, pg. 505 – 512, 2012.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, pg. 1545 – 1552, 2012.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M., SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66, p. 621 – 626, 2007.

SOARES, I. A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

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, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.

ZAMBARE V. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues, **International Journal of Life Sciences**, v. 4, p. 16-25, 2010.

ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912 – 919, 2011.