

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Penicillium* sp. A PARTIR DE CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

EVELIZE NOGUEIRA BASSETO

DOURADOS, MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Penicillium* sp. A PARTIR DE CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

EVELIZE NOGUEIRA BASSETO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia, com
orientação do Prof. Dr. Rodrigo Simões
Ribeiro Leite.

DOURADOS, MS

2017

EVELIZE NOGUEIRA BASSETO

“Produção de amilase por Penicillium sp. a partir de cultivo em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais”

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito necessário para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados, pela banca examinadora formada por:

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Universidade Federal da Grande Dourados

Profa. Dra. Gisele Jane de Jesus
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem sua força não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço também pelas coisas que aprendi, pelos dias de dificuldades, mas, o senhor esteve sempre ao meu lado, e pelas amizades que fiz durante essa jornada.

Aos meus pais Sueli e Osvaldo, que batalharam muito para que eu pudesse chegar até aqui, por serem meu ponto de equilíbrio, que mesmo longe, sempre estiveram por perto, nas horas mais difíceis da graduação, sendo sempre o meu maior exemplo de força e superação.

A minha irmã Evelen, que mesmo longe, sempre me apoiou em todos os momentos, me aconselhou e foi uma peça fundamental para que eu conseguisse chegar até o fim dessa jornada, assim como os meus pais.

Ao meu Noivo Wagner, por ser minha válvula de escape durante toda a graduação, me apoiando nas horas mais difíceis, acreditando em mim e me incentivando a chegar até aqui. Faltam-me palavras para expressar o tamanho da minha gratidão e do meu amor.

Aos meus sogros Denilce e Volmir, por me adotarem como uma filha, fazendo com que essa caminhada se tornasse menos árdua. Isso foi fundamental para que eu conseguisse ficar longe dos meus pais.

Aos meus amigos Pedro e Sabrina, por serem meus companheiros desde o começo da faculdade, a quem eu aprendi a amar e construí laços eternos. Sem a presença de vocês a caminhada até aqui não seria a mesma.

As minhas amigas Taiane, Thais, Stephanie e Maria Isabela, que mesmo estando longe, sempre estiveram presentes na minha vida, me apoiando e me dando forças para continuar.

A V turma pela amizade, ajuda, carinho e por ter se tornado a minha família durante esses quatro anos.

Ao meu orientador Rodrigo Leite, pela sabedoria, atenção, paciência, ajuda, compreensão e por ter dedicado uma parte do seu tempo para me orientar nesse trabalho.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma durante esses quatro anos, eu só tenho a agradecer a cada um de vocês, pois vocês foram fundamentais para a pessoa que eu me tornei hoje.

“Leve na memória para o resto da vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades, elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO	12
2.1. ESTRUTURA DO AMIDO	12
2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO	13
2.3. CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM ESTADO SÓLIDO	14
2.4. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS	15
3. METODOLOGIA	16
3.1. MICRORGANISMO	16
3.2. INÓCULO	16
3.3. PRODUÇÃO DE AMILASE POR CES	16
3.4. EXTRAÇÃO DA ENZIMA	17
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMILASE	17
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. SELEÇÃO DE SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AMILASE	17
4.2. TEMPERATURA ÓTIMA PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA	18
4.3. VARIAÇÃO DA UMIDADE INICIAL DO MEIO DE CULTIVO	29
4.4. TEMPO DE CULTIVO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
7. REFERÊNCIAS	24

LISTA DE FIGURAS

Estrutura do amido. (a) amilose e (b) amilopectina (CORRADINI et al., 2005).....	12
Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas (SPIER et al., 2005).....	13
Produção de amilase a partir do fungo <i>Penicillium</i> sp. em função da temperatura em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido, em 60% de umidade por 96 horas de cultivo.....	19
Produção de amilase a partir do fungo <i>Penicillium</i> sp. em função da umidade inicial do meio em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido por 96 horas de cultivo em 30°C.....	20
Produção de amilase a partir do fungo <i>Penicillium</i> sp. em função de cultivo em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido em uma temperatura de 30°C em 55% de umidade.....	21

LISTA DE TABELAS

Produção de amilase a partir do fungo <i>Penicillium</i> sp. em diferentes substratos por Fermentação em Estado Sólido em 60% de umidade, em uma temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.....	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FES	Fermentação em Estado Sólido
sp	Espécie
α	Alfa
β	Beta
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente
UNICAMP	Universidade de Campinas
°C	Grau célsius
mL	Mililitros
rpm	Rotações por minuto
g	Grama
U/g	Unidades por grama
%	Porcentagem

RESUMO

A utilização do Cultivo em Estado Sólido (CES) a partir de subprodutos agroindustriais possibilita a obtenção de várias biomoléculas de interesse industrial. As amilases são enzimas que hidrolisam amido, podendo ser de origem vegetal, animal ou microbiana, liberando assim, diversos produtos como dextrinas, maltose e glicose. Essas enzimas possuem aplicações na indústria têxtil, na indústria química, farmacêutica, sucroalcooleira e na fabricação de alimentos e bebidas. No entanto, o elevado custo na produção dificulta o emprego em ampla escala, dessa forma, o cultivo de fungos filamentosos e resíduos agroindustriais se torna uma alternativa viável para baratear o custo de produção de enzimas de interesse industrial, além de evitar seu acúmulo no ambiente. Com o presente trabalho avaliaram-se as condições de cultivo em estado sólido do fungo *Penicillium* sp. para a produção de amilase. Os ensaios foram realizados utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato (farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho e casca de arroz), também foram avaliados a umidade inicial do meio (50-80%), temperatura (25-45°C) e o tempo de cultivo (24-144 horas). A maior produção da enzima foi obtida no cultivo em farelo de trigo contendo 55% de umidade, após 96 horas a 30°C, atingindo $43,39 \pm 0,15$ U/g de substrato seco.

Palavras-chave: Enzimas microbianas; Amido; Farelo de trigo.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país agroindustrial, sendo assim, gera uma grande quantidade de resíduos. Devido à quantidade encontrada de nutrientes nos resíduos agroindustriais, estes podem ser utilizados como matérias-primas para processos secundários. Neste contexto, o Cultivo em Estado Sólido (CES) é uma técnica de cultivo microbiano que possibilita o aproveitamento desses resíduos, tendo em vista a síntese de diversos compostos de interesse industrial e alto valor agregado, além de ser favorável ao meio ambiente (SANTOS et al., 2016; DANTAS; AQUINO, 2010).

Os fungos são os microrganismos mais adaptados neste tipo de processo, visto que possuem a capacidade de crescimento rápido, em baixos níveis de água e o desenvolvimento das hifas que permitem que eles penetrem entre os resíduos do substrato (SANTOS et al., 2013; DANTAS; AQUINO, 2010).

O amido é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, depois da celulose, sendo o principal carboidrato de reserva das plantas, encontrado em todas as formas vegetais, sejam nas suas folhas, raízes, caules, sementes ou frutas. As amilases são as enzimas responsáveis em hidrolisar a molécula de amido, gerando maltose, glicose ou xaropes de oligossacarídeos (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

As amilases estão entre as enzimas industriais mais utilizadas e são de grande importância para a biotecnologia atual. Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise da molécula do amido em polímeros de glicose, que podem ser utilizados para a produção de alimentos, bebidas e biocombustíveis (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). Representam cerca de 25% do mercado de enzimas, encontrando aplicações em vários processos industriais que necessitam de hidrólise completa ou parcial do amido (ÖZDEMIR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

As amilases são utilizadas na produção de amidos modificados e na produção de xaropes, sendo também utilizadas em processos industriais de grande escala, como por exemplo, na produção de detergentes para máquinas de louças, na indústria farmacêutica e alimentícia (OLIVEIRA et al., 2007).

O uso de enzimas como catalisadores em processos industriais é essencial para a obtenção de qualidade dos produtos com tecnologias limpas, em equilíbrio com as necessidades tecnológicas atuais e a conversão do meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2015; PASSIN et al., 2014).

Neste contexto, com o presente trabalho objetivou-se avaliar o potencial para a produção de amilase em Cultivo em Estado Sólido (CES) pelo fungo filamentososo *Penicillium* sp. Os ensaios foram realizados utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato sendo eles farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz. Também foram avaliados a umidade inicial do meio, temperatura e tempo de cultivo.

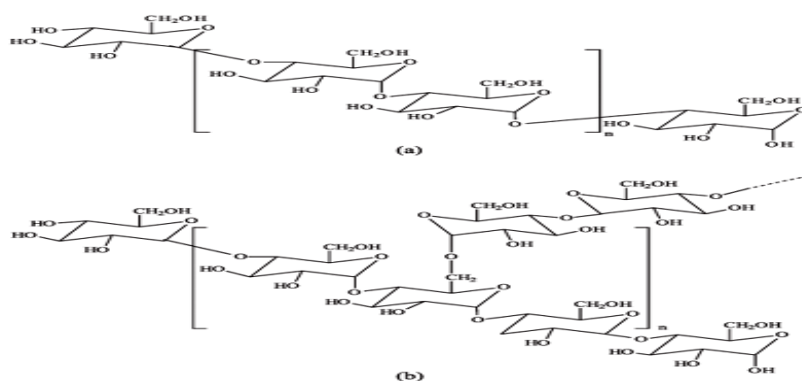
2. REVISÃO

2.1. ESTRUTURA DO AMIDO

O amido é um dos principais compostos de reserva em plantas, e tem sido utilizado não somente como reserva para a própria planta, mas também como uma das mais importantes fontes de energia para os níveis subsequentes da cadeia alimentar nos ecossistemas. Por isso, muitos organismos apresentam a capacidade de produzir enzimas que degradam o amido (AMARAL et al., 2007).

O amido é composto por unidades de glicose, organizadas em dois homopolissacarídeos: a amilose e a amilopectina (Figura 1). A amilose praticamente não apresenta ramificações. É formada a partir de várias cadeias lineares helicoidais de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina apresenta uma estrutura extremamente ramificada, sendo cadeias de resíduos de glicose ligados por uma ligação glicosídica α -1,4, onde a partir dessa ligação, partem ramificações unidas por ligações α -1,6 a cada 25 resíduos de glicose (SILVA et al., 2016; NELSON; COX, 2011).

Figura 1. Estrutura do amido. (a) amilose e (b) amilopectina (CORRADINI et al., 2005).



Fonte: CORRADINI et al., 2005.

De acordo com WATERSCHOOT et al. (2015), os grânulos são classificados de acordo com a sua forma. O amido da mandioca é redondo ou cortado, o amido do milho é redondo ou tridimensional, o da batata é oval ou redondo e os grânulos do amido do arroz são poligonais. As variações ocorrem de acordo com o grau de maturação da planta e podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas diferenciadas, interferindo em suas aplicações industriais.

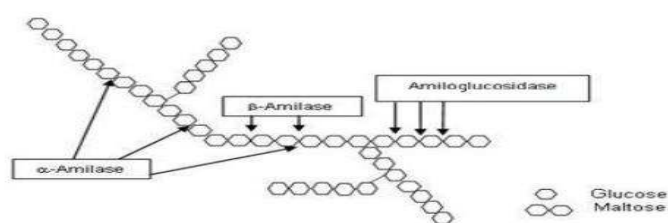
2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO

É necessária a ação de diferentes enzimas para a conversão eficiente do amido em produtos de peso molecular mais baixo, tais como dextrinas, maltose e glicose (OLIVEIRA et al., 2015).

As principais enzimas amilolíticas são a α -amilase (EC 3.2.1; glucano hidrolase 1,4- α -D-glucano), que cliva aleatoriamente as ligações α -1,4-glicosídicas internas de amido, glicogênio e polissacarídeos relacionados para produzir oligossacarídeos de diferentes tamanhos. A glucoamilase (EC 3.2.1.3; 1,4- α -D-glucanglucohidrolase) ou amiloglucosidase é uma exoamilase capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 através da remoção sucessiva de unidades de glicose, a partir das extremidades não redutoras da cadeia, liberando as moléculas de D-glicose na β -conformação (SILVA et al., 2013; PASIN et al., 2014; TORRES et al., 2012).

As enzimas endo-amilases (α -amilases) e desramificadoras (isoamilases) são responsáveis em reduzir o grau de polimerização da molécula de amido e produção de dextrinas lineares. As exoamilases são usadas em etapas subsequentes da hidrólise enzimática do amido. Essas enzimas hidrolisam dextrinas provenientes da liquefação, produzindo maltose (β -amilases) ou glicose (amiloglucosidase, α -glucosidases e glucoamilases) (Figura 2) (OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas (SPIER, 2005).



Fonte: SPIER, 2005.

De acordo com CEREDA (2003) o amido pode ser hidrolisado de duas maneiras: via química ou via enzimática. Os hidrolisados pela via enzimática são os mais importantes amidos comerciais modificados. Esse tipo de hidrólise vem sendo utilizada na indústria para a produção de etanol a partir de amiláceos.

A hidrólise enzimática tem algumas vantagens em relação ao químico, os biocatalisadores, que agem sob condições amenas de pH e temperaturas, reduzindo o consumo de energia, a corrosão de equipamentos eliminando as etapas de neutralização. No entanto, a especificidade da catálise enzimática pode ser considerada como a principal vantagem de utilizar enzimas, impedindo a formação de subprodutos indesejáveis habitualmente observados nos métodos químicos (OLIVEIRA et al., 2015).

A concentração de enzimas é um fator fundamental na hidrólise de derivados de amiláceos, podendo assim, interferir no processo (TORRES et al., 2012). Diferenças na funcionalidade da hidrólise podem ser atribuídas à morfologia e estrutura de moléculas da mesma. Existem estudos que apontam que a razão entre a amilose e amilopectina pode ser considerada um grande efeito na funcionalidade do amido e podem interferir na eficiência da hidrólise enzimática desse polissacarídeo (WISCHMANN et al., 2005).

2.3. CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM ESTADO SÓLIDO (CES)

O Cultivo em Estado Sólido (CES) é definido como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos umedecidos, no entanto, com ausência de água livre entre as moléculas do substrato. Sendo assim, o determinado microrganismo se desenvolve entre os fragmentos do substrato ou sobre o substrato, consumindo o mesmo e liberando metabólitos de interesse comercial (MITCHELL et al., 2006; RAHARDJO et al., 2005).

O CES utiliza geralmente materiais de natureza fibrosa ou granular, permitindo assim a retenção de água através da capilaridade, sendo que a capacidade de absorção de água varia de acordo com o material utilizado (SOCCOL et al., 2005).

O CES tem ganhado destaque na produção de enzimas microbianas devido a várias vantagens econômicas sobre os processos de fermentação submersa, pois os conteúdos dos meios são caros e muitas vezes inviáveis economicamente, por isso eles precisam ser substituídos pelos subprodutos agrícolas de alto volume e baratos para reduzir os custos finais das produções (MANIVANNAN et al., 2015).

O uso do CES pode reduzir o impacto ambiental e agregar valor aos subprodutos da agroindústria. Entre as vantagens do CES está a simplicidade das condições de crescimento, pois se assemelham aos sistemas ambientais onde muitos microrganismos se desenvolvem, principalmente os fungos filamentosos; menor risco de contaminação por utilizar pouca água e reduzindo o consumo de energia. Esse tipo de processo também resulta em maiores níveis de produção. A principal desvantagem é a classificação do controle dos parâmetros de cultivo como temperatura, pH e umidade, devido a heterogeneidade do processo. Esse tipo de cultivo é amplamente utilizado para a obtenção de diversas enzimas microbianas, entre elas, amilase, celulase e xilanase (GARCIA et al., 2015; REINEHRA et al., 2014).

2.4. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS

As amilases possuem um grande espaço no mercado mundial de enzimas. Essas enzimas estão disponíveis a partir de diferentes fabricantes para aplicações diversas, como sacarificação do amido e produção de xaropes, produção de biocombustíveis, desengomagem de produtos têxteis, produção de detergentes para louças, produtos farmacêuticos, fabricação de cerveja, papel, dentre outras (SHARMA; SATYANARAYANA, 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Na indústria de panificação, as α -amilases são altamente utilizadas, podendo ser adicionadas na massa do pão, degradando o amido da farinha em pequenas dextrinas. A adição dessa enzima pode intensificar a fermentação e também reduzir a viscosidade da massa do pão, obtendo assim, melhorias no volume e na textura do produto (SAHNI; GOEL, 2015).

Na indústria têxtil, as amilases vêm sendo utilizadas na eliminação de gomas de amido e derivados, em troca do uso de antioxidantes, que danificam em maiores proporções a celulase, protegendo assim as fibras. Já as α -amilases são utilizadas para a retirada de gomas de diversos tipos de tecidos, como jeans, sendo utilizadas também na limpeza destes tecidos. Assim como ocorre na indústria têxtil, na indústria de papel e celulose a cobertura do papel é feita com o intuito de proteger o papel durante o processo contra danos, além de melhorar a qualidade final do papel (SOCCOL et al., 2007).

O mercado de enzimas no Brasil é extremamente importador, possuindo um grande potencial para a produção de enzimas, tendo como motivo a abundância de matéria orgânica e maior diversidade biológica (MUSSATO et al., 2007).

3. METODOLOGIA

3.1. Microrganismo

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso mesófilo *Penicillium* sp. O microrganismo foi isolado de amostras de solo coletadas do Bioma Cerrado, localizado na região de Dourados – MS. A linhagem selecionada foi identificada pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente (CBMAI) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud dextrose e mantido a 4°C.

3.2. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura, sendo empregados 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de cálcio m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agrícolas) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão.

3.3. Produção de amilase por Cultivo em Estado Sólido (CES)

Foram utilizados diferentes resíduos agroindustriais para o cultivo microbiano: farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja, casca de arroz, sabugo de milho e palha de milho. O cultivo microbiano ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos umedecidos com solução nutriente (descrita anteriormente). Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e logo após secos em estufa a 50°C por 48 horas. O material utilizado foi esterilizado a 121°C por um período de 20 minutos. Após a inoculação do microrganismo, os frascos Erlenmeyer foram mantidos a 28°C. O substrato que apresentou melhor produção das enzimas foi adotado para a avaliação de outros parâmetros fermentativos (umidade, temperatura e tempo de cultivo), sendo adotada a condição ótima de cada experimento, nos ensaios

subsequentes. Os experimentos foram realizados em duplicatas e os resultados obtidos representam as médias obtidas.

3.4. Extração da enzima

Para a extração da enzima foram adicionados 50 mL de água destilada nos meios fermentados sendo mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizado.

3.5. Determinação da atividade de amilase

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, contendo 1% de amido de milho (Maisena®). Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (3,5-acidodinitrosalisílico) descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de produto por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2002).

3.6. Análise estatística

Para obtenção de melhores resultados, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, a 0,01% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de substrato para produção de amilase

Entre os substratos avaliados, o farelo de trigo apresentou uma maior produção em relação aos demais, atingindo 22,97 U/g de substrato seco em 96 horas de incubação (Tabela 1).

Tabela 1: Produção de amilase a partir do fungo *Penicillium* sp. em diferentes substratos por Cultivo em Estado Sólido. em 60% de umidade, em uma temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo. As médias da produção com letras diferentes indicam

diferenças significativa de acordo com o teste de Tukey realizado a 0,01% de significância.

Substrato	Amilase (U/g)
Casca de arroz	1,12±0 ^b
Farelo de trigo	22,97±6,54 ^a
Farelo de soja	4,85±1,22 ^b
Palha de milho	1,12±0 ^b
Sabugo de milho	2,74±0,20 ^b

O cultivo de microrganismos em diferentes substratos como a casca de arroz, farelo de soja, palha de milho e o sabugo de milho apresentou produção enzimática inferior quando comparado aos cultivos em farelo de trigo. Isso pode ser explicado, pois o farelo de trigo é um substrato extremamente complexo e rico em proteínas, minerais, carboidratos, lipídeos e vitaminas do complexo β . Esses nutrientes favorecem o crescimento microbiano e a produção de diversas enzimas (HAQUE et al., 2002).

O farelo de trigo pode ser considerado como um dos melhores resíduos agroindustriais para a produção de amilase a partir de fungos filamentosos (KUNAMNENI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2016).

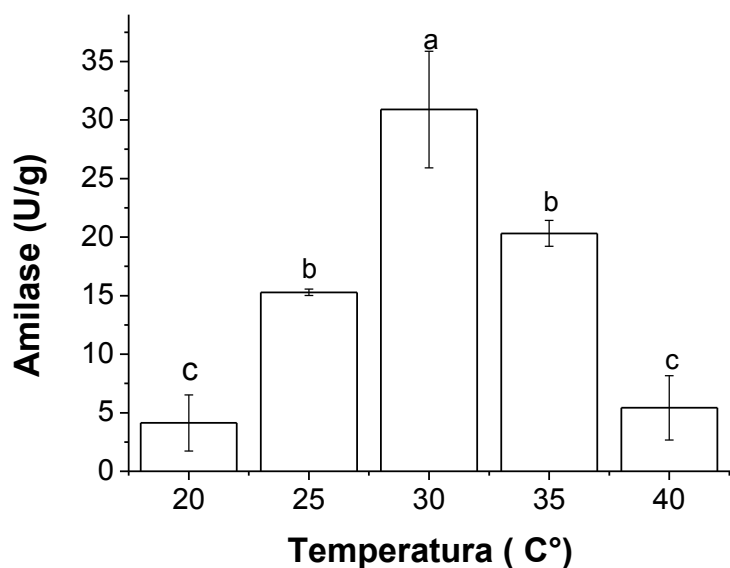
Chimata et al. (2010) avaliaram em seu trabalho três tipos de substratos, tendo como melhor resultado o cultivo em farelo de trigo do fungo *Aspergillus* sp. MK07 para produção de amilase. Manivannam et al. (2015) também obtiveram melhores resultados com farelo de trigo comparado ao farelo de arroz, utilizando o fungo *Aspergillus flavus* para produção de α -amilase.

4.2. Temperatura ótima para produção da enzima

De acordo com os dados mencionados na figura 3, o fungo *Penicillium* sp. apresentou maior produção de amilase na temperatura de 30°C, atingindo uma média de 30,9 U/g de substrato seco.

Figura 3: Produção de amilase a partir do fungo *Penicillium* sp. em função da temperatura em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido, em 60% de umidade por

96 horas de cultivo. As médias da produção com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey realizado a 0,01% de significância.



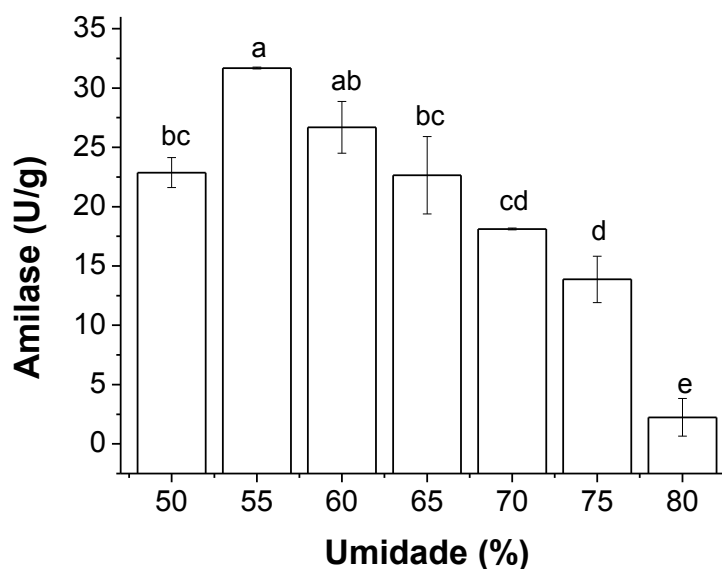
Dar et al. (2015) avaliaram em seu trabalho diferentes temperaturas de crescimento para a espécie *Penicillium chrysogenum*, sendo este do mesmo gênero do fungo utilizado no presente trabalho, tendo maior crescimento na temperatura de 30°C, o mesmo obtido no cultivo do atual trabalho.

De acordo com Chimata et al. (2010) a temperatura é considerada um dos parâmetros de maior importância para a elevada produção de enzimas. Devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, ela influencia diretamente na germinação de esporos e consequentemente a formação do produto de interesse.

4.3. Variação da umidade inicial do meio de cultivo

A maior produção de amilase pelo fungo *Penicillium* sp., 31,7 U/g de substrato seco, foi obtido em cultivos contendo 55% de umidade inicial (Figura 4).

Figura 4: Produção de amilase a partir do fungo *Penicillium* sp. em função da umidade inicial do meio em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido por 96 horas de cultivo em 30°C. As médias da produção com letras diferentes indicam uma diferença significativa de acordo com o teste de Tukey realizado a 0,01% de significância.



Geralmente os fungos filamentosos possuem a capacidade de se desenvolverem em baixas umidades, em torno de 40-60%, confirmando a umidade obtida neste trabalho. Porém a umidade depende diretamente do nível de retenção de água do substrato utilizado na fermentação (BASSO et al., 2010).

Oliveira et al. (2015) obtiveram em seu trabalho uma umidade ótima de 70% para produção de amilase por fungos leveduriformes, umidade esta, consideravelmente distinta a encontrada no presente trabalho. A produção da enzima em baixos teores de umidade é uma característica desejável, considerando que, estudos mostram que umidades acima de 80% favorecem a contaminação bacteriana (CRUZ et al, 2011).

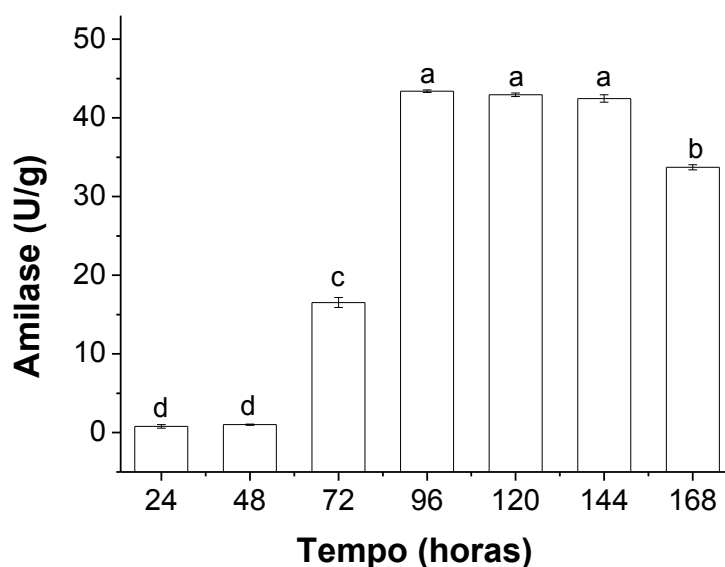
A umidade do substrato também é considerada um dos parâmetros que influenciam no sucesso do CES. A umidade ideal depende da natureza do substrato, um alto nível de umidade pode diminuir a porosidade, aumentar o risco de contaminação do meio ou reduzir as trocas gasosas do meio. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem dificultar o crescimento do microrganismo (GARCIA et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

4.4. Tempo de cultivo

O tempo de cultivo foi avaliado totalizando 168 horas. A maior produção da enzima foi obtida entre 96 a 144 horas de cultivo, cerca de 43,4 U/g de substrato seco,

sendo obtido como ótimo 96 horas por se tratar do menor tempo de incubação donde foi obtido quantidades apreciáveis de enzimas (Figura 5).

Figura 5: Produção de amilase a partir do fungo *Penicillium* sp. em função de cultivo em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido em 30°C em 55% de umidade. As médias da produção com letras diferentes indicam uma diferença significativa de acordo com o teste de Tukey realizado a 0,01% de significância.



Após o tempo de 144 horas, foi observada uma leve diminuição na produção da enzima, isso se deve provavelmente ao esgotamento de nutrientes do substrato, inibindo assim o crescimento do microrganismo e a secreção da enzima de interesse. A tendência de utilizar enzimas de origem microbiana está relacionada com menor tempo necessário para sua obtenção, principalmente quando comparada com enzimas de origem vegetal e animal (OLIVEIRA et al., 2006).

Trabalhos anteriores relatam a maior produção de enzimas amilolíticas pelo cultivo em estado sólido de diferentes espécies fúngicas, por igual ou maior período de incubação (ONOFRE et al., 2016; CASTRO et al., 2010; CHIMATA et al., 2016).

A produção obtida no presente trabalho não está entre os maiores descritos na literatura, no entanto, trabalhos anteriores relatam produções similares. Castro et al. (2010) investigaram a produção de amilase por CES com torta de babaçu, utilizando *Aspergillus awamori* IOC-3914, obtendo 40,5 de substrato para exoamilase. Ferreira et

al. (20121) relatam a produção de 16,58 U/g⁻¹ pelo fungo *Chrysosporium zonatum*, e 55,06 U/g⁻¹ pelo fungo *Malbranchea pulchella*. O microrganismo *Rhizopus oryzae* apresentou uma produção de 63,50 U/g⁻¹ quando cultivados em farelo de trigo (FERREIRA et al., 2015). Bernardes et al. (2014) relatam produção de aproximadamente 13,00 U/g⁻¹ pelo fungo *Rhizomucor miehei*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho avaliaram-se diversos parâmetros para a produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Penicillium* sp., podendo constatar que o substrato farelo de trigo apresentou melhores condições em comparação aos demais substratos agroindustriais testados.

A temperatura de 30°C e umidade inicial do meio de 55% apresentaram melhores expressões enzimáticas após 96 horas de cultivo.

Esses resultados permitem inferir que o fungo *Penicillium* sp. apresenta potencial para produção de amilase quando cultivado em meio de baixo custo e tempo relativamente baixo, o que incentiva a continuidade desse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Seleção de Microrganismos Produtores de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), Produção e Caracterização da Enzima. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 5, p. 189-196, 2002.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**. v. 34(4), p. 425-431, 2007.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.
- BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. S.; MATA, J. F.; FERREIRA, O. E. Utilização de subprodutos agroindustriais para a produção de α -amilase por *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Ambiental**. v. 08, n. 02, p. 1439-1451, 2014.
- CEREDA, M. P. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. Fundação Cargill, São Paulo. cap. 15, p. 377-448, 2003.
- CHIMATA, N. K.; SASIDHAR, P.; CHALLA, S. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* sp. in solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 32, p. 5162-5169, 2010.
- CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. C.; ANTONIO, J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATOSSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polimeros**. v. 15, p. 268-275, 2005.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SATANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduos de casca de mandioca. **Unopar Científica**. Ciências Biológicas e Saúde. v. 13, p. 245-249, 2011.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande. v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.
- DAR, G. H.; KAMILI, A. N.; NAZIR, R.; BANDH, S. A.; JAN, T. R.; CHISHTI, M. Z. Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. **Microbial Pathogenesis**. v. 88, p. 10-15, 2015.
- FERREIRA, O. M.; MONTIJO, M. A.; CACIA, M. L.; MUTTON, M. R. J. Atividade de α -amilase em *Malbranchea pulchella* e *Chrysosporium zonatum*. **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal. v. 4, 2012.
- FERREIRA O. M.; MONTIJO, M. A.; MARTINS, E. S.; MUTTON, M. R. J. Production of α -amylase by solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**. v. 14(7), p. 622-628, 2015.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial waste: characterization and catalytic properties of the enzyme extract. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 18(4), p. 314-319, 2015.

HAQUE, M. A.; SHAMS, U. D.; HAQUE, A. The effect os aqueous extractes wheat branon the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 37, p. 453-462, 2002.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal os Bioscience and Bioengineering**. v. 100, p. 168-171, 2005.

MANIVANNAN, S.; MADHAVI, P.; BHUVANESWARI, S. Production and optimization of α -amylase from *Aspergillus flavus* under the solid-state fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**. v. 7, p. 298-303, 2015.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. Solide-state fermentation bioreactor. In: the bioreactor step of SS: A complex interaction of phenomena. Ed. Springer, p. 13-32 Heidelberg, 2006.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**. v. 242, p. 28, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 5ª ed., São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, A. P.; SILVESTRE, M. A.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid-state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extrats. **African Journal of Biotechnology**. v. 14(4), p. 1215-1223, 2015.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, S. F. Produção de amilase por rizóbios usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rhizóbio nativos da Amazônia Central. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and catalytic properties of amylases from and by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**. v. 2016, p. 1-10, 2016.

ONOFRE, S. B.; ABATTI, D.; REFOSCO, D.; TESSARO, A. A.; ONOFRE, J. A. B.; TESSARO, A. B. Characterization of α -amylase produced by endophytic strain of *Penicillium digitatum* in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF). **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 28, p. 1511-1519, 2016.

- PASIN, T. M.; BENASSI, V. M.; MOREIRA, E. A.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Prospecting filamentous fungi for amylase production: Standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions. **British Biotechnology Journal**. v. 4(4), p. 482-498, 2014.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RIZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**. 2005.
- REINEHRA, C. O.; RIZZARDIA, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. A. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.
- SAHNI, T. K.; GOEL, A. Microbial enzymes with special reference to α -amylase. **Bio Evolution**. v. 2(1), p. 19-25, 2015.
- SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 15(16), p. 633-641, 2016.
- SILVA, P. L. D.; GOMES, A. M.; RICARDO, N. M.; MACHADO, T. F. Preparation and characterization of phosphorylated starch blends with chitosan and polyvinyl alcohol. **Química Nova**. v. 39, n. 4, p. 450-455, 2016.
- SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**. v. 41, p. 897-905, 2009.
- SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**. v. 48, n. 2, p. 202-211, 2013.
- SILVA, T. M.; MALLER, A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Evidence of high production levels of thermostable dextrinizing and saccharogenic amylases by *Aspergillus niveus*. **African Journal of Biotechnology**. v. 12(15), p. 1874-1881, 2013.
- 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 In. p. 221-230, 2005.
- SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 850-861, 2010.
- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**. v. 42, n. 7, p. 1327-1332, 2012.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 65, p. 1-43, 2001.

WISCHMANN, B.; BLENNOW, A.; MADSEN, F.; JORGENSEN, K.; POULSEN, P.; BANDSOLM, O. Functional characterization of potato starch modified by specific in planta alteration of the amylopectin branching and phosphate substitution. **Food Hydrocolloids**. v. 19, p. 1016-1024, 2005.

WATERSCHOOT, J.; LEE, S. V.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. **Starches/Stärke**. v. 67, p. 14-29, 2015.