

74305 - PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE OBTIDAS POR *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE* ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

*Geisi Maria Henrique da Silva*¹, *Gilanna Falcão Ferreira*², *Nathália Souza Bezerra*³,
*Laísa Macedo Tavares*⁴, *Andréa Farias de Almeida*⁵, *Adna Cristina Barbosa de Sousa*⁶

¹Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: geisimaria.jr@gmail.com

²Graduanda do Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: gilannaferreira@gmail.com

³Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: nathaliasouza_13@hotmail.com

⁴Graduanda do Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: macedolaisa@gmail.com

⁵Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

⁶Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: adnasousa@cbiotec.ufpb.br

RESUMO: As enzimas amilolíticas e proteolíticas são amplamente utilizadas em vários processos biotecnológicos. Na atualidade, existe uma perspectiva para utilização de processos fermentativos em estado sólido na produção de enzimas de interesse industrial, utilizando substratos de baixo custo. Dentre esses substratos, destacamos a algaroba, que foi utilizada neste estudo como fonte de carbono e energia para crescimento do fungo. Portanto, o presente estudo teve como objetivo delinear as condições de cultivo para produção e estabilidade térmica das enzimas amilolíticas e proteolíticas obtidas por *Metarhizium anisopliae* através da fermentação em estado sólido na fibra da algaroba. O substrato utilizado foi caracterizado e para produção das

enzimas por FES, foram utilizados 30 g de fibra da algaroba, 0,3 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL), umidade de $70 \pm 10 \%$, temperatura ($T = 29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). A atividade amilolítica foi determinada pelo método DNS. A termoestabilidade foi avaliada numa faixa de temperatura de 40° a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Na caracterização foram obtidos pH 5,4, densidade aparente 0,23 g/mL, 19,12 mg/mL de ART, 12,33 °brix de sólidos solúveis, 48,65% de umidade e 13,60 mg/mL de proteínas totais. Os extratos brutos do processo fermentativo mostrou atividade amilolítica de 6,627 U/g às 72 horas de produção e proteolítica de 175,8 U/g às 240 horas. As amilases mostraram uma melhor atividade enzimática na temperatura de produção de 30°C . Os resultados obtidos demonstraram a potencialidade da algaroba como meio de cultura alternativo para a produção de enzimas de interesse industrial.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*; Enzimas extracelulares; Algaroba.

PRODUCTION OF AMILASE AND PROTEASE OBTAINED BY *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE* THROUGH FERMENTATION IN SOLID STATE

ABSTRACT: Amylolytic and proteolytic enzymes are widely used in various biotechnological processes. At present, there is a perspective for the use of solid state fermentative processes in the production of enzymes of industrial interest, using low cost substrates. Among these substrates, we highlight the algaroba, which was used in this study as a source of carbon and energy for fungus growth. Therefore, the present study aimed to delineate the culture conditions for the production and thermal stability of the amylolytic and proteolytic enzymes obtained by *Metarhizium anisopliae* through the solid state fermentation in the algaroba fiber. The substrate used was characterized and 30 g of algaroba fiber, 0.3 ml of the conidial suspension (1×10^8 conidia/mL), humidity of $70 \pm 10 \%$, temperature ($T = 29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). The amylolytic activity was determined by the DNS method. The thermostability was evaluated at a temperature range of 40° to $70 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 minutes. In the characterization were obtained pH 5.4, apparent density 0.23 g/mL, 19.12 mg/mL of ART, 12.33° brix of soluble solids, 48.65 % of humidity and 13.60 mg/mL of proteins. The crude extracts of the fermentation process showed amylolytic activity of 6.627 U/g at 72 hours of production and proteolytic of 175.8 U/g at 240 hours. The amylases showed a better enzymatic activity at the $30 \text{ }^\circ\text{C}$ production temperature. The results obtained demonstrated the potential of algaroba as an alternative culture medium for the production of enzymes of industrial interest.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; Extracellular enzymes; Algaroba.

1. INTRODUÇÃO

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin é um importante fungo entomopatogênico utilizado no controle biológico (9, 37). Em seu processo de infecção produz exoenzimas que estão envolvidas no processo de penetração do tegumento do hospedeiro. Sabe-se que a capacidade de virulência está pautada na produção de enzimas extracelulares como proteases e quitinases, e pouco é observado na literatura sobre a sua utilização para produção dessas e de outras enzimas de interesse industrial (2, 23, 28). Na perspectiva de aproveitamento de substratos alternativos constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina tem-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitem a utilização dessa biomassa bruta tanto para a produção de enzimas, quanto em processo de hidrólise enzimática, uma vez que macromoléculas presentes nestes substratos podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis (28).

A algaroba é uma leguminosa do gênero *Prosopis* que foi introduzida e adaptada no semiárido, em razão da sua alta capacidade de desenvolvimento em lugares secos, onde dificilmente outras plantas sobrevivem (9). Possui alto teor de açúcares e fibras, mas precisamente a sacarose, como também proteínas e alguns minerais importantes para o desenvolvimento humano (33). No entanto a falta de manejo adequado, a boa adaptação regional da espécie, a facilidade de dispersão promovida pelos rebanhos, dentre outros fatores, transformaram em problema o que antes pretendia ser uma solução (28). Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que a ingestão de algaroba como suplemento ou parte integrante de rações de animais domésticos vem provocando uma doença de caráter neurotóxico (3, 4, 15). Este cenário favorece o estudo em busca de alternativas para o uso dessa espécie, um desses estudos é a sua utilização como substrato alternativo para a produção de enzimas de interesse industrial e biotecnológico (28).

As amilases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, por catalisar a hidrólise de moléculas de amido, liberando vários polímeros compostos de unidades de glicose, incluindo dextrinas (13, 27). Das enzimas industriais, as amilases estão entre as mais importantes, por apresentar alta relevância em processos biotecnológicos, vistos na indústria de alimentos, fermentação, têxtil e indústria de papel (27), representando 25 % do mercado mundial de enzimas (20).

As proteases ou peptidases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, estas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas, resultando em peptídeos ou aminoácidos livres (29, 34).

Estudos demonstraram que cerca de 60 % do mercado industrial de enzimas é referente à protease (19). Boa parte dessa produção corresponde à utilização dessas enzimas na indústria de detergentes, os demais são distribuídos na indústria cervejeira, de couro, farmacêutica e alimentícia, entre outros (8,19). Porém o grande gargalo da produção de proteases são os custos envolvendo o meio de cultura para a produção de biomassa, que é avaliado em torno de 30-40 % (18, 25).

As proteases e amilases são exemplos de enzimas produzidas por fungos filamentosos que estão disponíveis comercialmente (27). Processos industriais geralmente exigem enzimas robustas, capazes de atuar em diferentes condições de pH, temperatura, pressão, entre outros. Além disso, é esperado que as enzimas sejam produzidas com alto rendimento, por processos de fermentação simples e de baixo custo, proporcionando a geração de um produto com alto valor agregado.

Nos últimos anos, a perspectiva da utilização de processos fermentativos em estado sólido tem aumentado para produção de enzimas de interesse industrial. O alto custo das enzimas proteases, amilases e outras, é um dos fatores limitantes no processo de hidrólise enzimática para a sua produção ou utilização. Entretanto, o impacto do custo dessas enzimas pode ser reduzido a partir da seleção de microorganismos produtores proteases e amilases, pela utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo, como fermentação em estado sólido e tecnologias mais eficientes para as etapas de sacarificação e fermentação.

Neste contexto, o presente trabalho teve como intuito de analisar o potencial de utilização da algaroba para produção de enzimas hidrolíticas (proteases e amilases) a partir do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, por fermentação em estado sólido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem fúngica

Foi utilizada uma linhagem de *M. anisopliae* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (**Tabela 2**).

Tabela 1. Origem da linhagem.

<i>Metarhizium anisopliae var. anisopliae</i>	
Nº do acesso	URM 4920
Substrato	<i>Mahanarva posticata</i> (cigarrinha da cana-de-açúcar)
Origem geográfica	Usina Serra Grande – Maceió – AL
Ano de registro	2005

•URM - University Recife Mycologia; *CENARGEM - Centro Nacional Agropecuário de Recursos Genéticos. Fonte. Autor.

Origem do substrato

Foi utilizado a algaroba (fibra obtida após processo de prensagem das vagens) como substrato alternativo pra crescimento de *M. anisopliae*. A algaroba foi coletada na Cidade Japi/RN (Região do Semiárido).

Prensagem da algaroba

As vagens de algaroba foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas em uma balança eletrônica (Gural - modelo Esse - 15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram sanitizadas imergindo-as em uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos, a remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a 65 ± 2 °C, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, as vagens hidratadas foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 Kgf/cm² (33).

Meio de manutenção da linhagem fúngica

Foi utilizado o meio ágar-Sabouraud-dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 5,6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

Teste preliminar para ajustar a umidade do substrato para 70 %

O teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 30 g do substrato, contidos em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram autoclavados e, após

resfriamento, foram feitas as pesagens. Em seguida, os erlenmeyers foram levados à estufa (80 °C) para secagem dos materiais até o peso constante. Posteriormente, foi realizada uma nova pesagem e, após a subtração da massa seca, foi calculado o volume de água adicionado a cada substrato de forma a resultar numa umidade em torno de 70 % após a autoclavagem. O volume de líquido adicionado ao meio foi baseado na equação especificada abaixo (Equação 1):

$$m_{H_2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sabendo que:

m_s = massa de substrato

X_1 = umidade inicial do substrato

X_2 = umidade desejada

Avaliação da produção de *Metarhizium anisopliae* na algaroba

O experimento foi realizado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 g do substrato com umidade em torno de 70 %. Foi realizado um experimento com três repetições. Foram inoculados 0,3mL contendo 1×10^8 conídios/mL, e em seguida os frascos foram incubados ($T = 29 \pm 1$ °C) e analisados durante 10 dias.

Após esse período, foi adicionado 0,9 de água destilada + “tween” 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 e coletado uma alíquota de 0,1 mL para realização da contagem dos conídios em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (30).

Caracterização do substrato

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao teor de sólidos solúveis, densidade aparente, pH, umidade, proteínas totais e açúcares redutores totais, foi realizada com base nas metodologias descritas a seguir.

pH

Preparou-se uma suspensão com 100 mL de água e 10 g do substrato. Após homogeneização e precipitação dos sólidos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões (17).

Teor de açúcares redutores

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) (30) que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Baseia-se na redução do ácido 3-amino-5nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico (23). O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose a 1 g/L. Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

Foram pesados 30 g dos substratos em frasco erlenmeyer de 250 mL, adicionado 100 mL de água destilada. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) a 200 rpm durante uma hora. Posteriormente, foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE-0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14 µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5 mL da solução e adiciono-se 0,5 mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100 °C por dez minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

Determinação das proteínas totais solúveis

A determinação das proteínas totais solúveis do extrato enzimático foi realizada pelo Método de Bradford (12), que dosa proteínas solúveis. Adicionou-se em um microtubo 10 µL de amostra diluída em 790 µL água Milli-Q e 200 µL reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, utilizando o espectrofotômetro, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm. Utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Teor percentual de umidade

A umidade é representada pelo teor de água presente na amostra e determinada conforme Equação 2. Para análise da umidade, pesou-se aproximadamente 2,0 g da amostra em placa de Petri previamente seca e tarada. Em seguida, o conjunto amostra-

recipiente foi colocado em estufa (OLIDEF - CZ) a 105 ± 2 °C durante 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata (24).

$$Umidade \% = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} * 100 \quad Eq. (2)$$

Teor de sólidos solúveis (°brix)

Para determinação dos sólidos solúveis presente na algaroba foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do bagaço em frasco erlenmeyer de 125 mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) por uma hora sob agitação de 200 rpm. Seguida de filtração com bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil de *Buchner*, usando papel de filtro qualitativo (14 µm) para separar a fibra do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro (NOVA - ABBE REFRACTOMETER), o resultado multiplicado por dez, devido à diluição (16).

Densidade aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100 g da algaroba, em balança (MARTE - AW220). A fibra foi colocada em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado e espaços vazios (6). A densidade aparente é expressa conforme a Equação 3.

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (mL)} \quad Eq. (3)$$

Análise da atividade enzimática

Produção enzimática em fermentação em estado sólido

O experimento foi realizado em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 30 g de cada substrato com teor de umidade de 70 ± 10 %, sendo preparados em triplicata. Para umidificar os substratos foi utilizada água destilada estéril. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 120 °C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com 0,3 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL) e incubado a 29 ± 1 °C durante 10 dias (35).

Obtenção do extrato enzimático bruto

Para o processo fermentativo em estado sólido foi realizado nas mesmas condições da produção de conídios. A obtenção do extrato enzimático bruto foi realizada pela adição de 100 mL de água destilada em 30 g de amostra de cada frasco, a qual foi submetida à agitação contínua em *shaker* de bancada durante 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração a vácuo, em filtro qualitativo Whatmann nº 01, para remoção dos sólidos. O sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e a atividade enzimática.

pH dos extratos enzimáticos

Após a obtenção dos extratos enzimáticos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (mPA210) previamente calibrado com soluções padrões (17).

Determinação de proteínas totais solúveis

A determinação das proteínas do extrato enzimático foi realizada pelo Método de Bradford (12), que dosa proteínas solúveis, utilizando como padrão BSA. Adicionou-se ao microtubo 10 µL de amostra diluída em 790 µL água Milli-Q e 200 µL reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e utilizando o espectrofotômetro, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm.

Atividade amilolítica sacarificante

Foi determinada utilizando como substrato específico, solução de amido (Método Sacarificante), submetido ao contato com o extrato enzimático bruto para promover a hidrólise pela ação das enzimas e quantificada pelos açúcares redutores produzidos (23). A partir do extrato bruto foram feitas as determinações de atividade amilolítica inoculando 0,5 mL de extrato enzimático em 0,5 mL de solução de amido 1,0 % em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Os açúcares redutores foram determinados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi feita em 540 nm usando solução de glicose como padrão (23). A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 0,5 mL de água destilada substituiu a amostra, seguindo o mesmo procedimento. Para comprovação dos resultados, foi realizado um branco reacional onde não ocorreu incubação das amostras em banho, sendo realizado apenas o método de DNS. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de glicose por minuto nas condições do método proposto (1) (Equação 4).

$$\text{Amilase (U/g)} = \frac{((A-B) \cdot f \cdot d \cdot V \cdot R)}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que: A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco da amostra, f é o fator de conversão da curva, d a diluição da amostra, V é o volume total do meio de reação (mL), 0,18 é o fator de conversão de miligramas para μmol de glicose, t é o tempo de reação (min), V_e é o volume da enzima no meio de reação (mL), R é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

Atividade proteolítica

A atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, foi adicionado 100 μL do extrato do sobrenadante a 100 μL do tampão tris 0,1 M pH 9. Em seguida, foi adicionado 100 μL do substrato (azocaseína 10 mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida e adicionado 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Após a centrifugação 10.000 g por 5 minutos, foi adicionado 200 μL de NaOH 1,8 N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 429 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do sobrenadante (11).

Determinação da temperatura ótima e avaliação da termoestabilidade

O efeito da temperatura foi determinado através da atividade enzimática pelo método DNS (23). As reações enzimáticas da amilase foram realizadas nas diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 65 e 70 °C (5). Na avaliação da termoestabilidade destas enzimas, o extrato enzimático foi exposto a temperatura em que houve maior produção enzimática. Durante uma hora, em intervalos pré-definidos foram retirados uma alíquota da amostra para reagir normalmente de acordo com a metodologia da análise da atividade enzimática. A reação foi interrompida com a adição de DNS e procedida à análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do substrato

A caracterização da fibra da algaroba, utilizada como substrato no processo de produção das enzimas amilolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização da fibra da algaroba *in natura*.

Parâmetros Analisados	Unidade	Resultados
pH	-	5,4
Açúcares redutores	mg/mL	19,12
Proteínas Totais	mg/mL	13,60
Umidade	%	48,65
Sólidos Solúveis	°brix	12,33
Densidade aparente	g/mL	0,2365

Fonte: Autor

O valor de pH encontrado de 5,4 é semelhante em estudos utilizando o mesmo substrato (14), que demonstrou um pH=5,90. O que caracteriza um substrato ligeiramente ácido. As proteínas totais o valor encontrado foi de 13,60 mg/mL. Em outros estudos utilizando o mesmo substrato foi encontrado o valor de $0,0110 \pm 0,33 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ (14).

Quanto aos valores referentes aos sólidos solúveis, o valor encontrado foi de 12,33 °brix, um valor alto, no entanto mais baixo quando comparado aos valores de sólidos solúveis do caldo da algaroba, de 22,3 °brix (32). Essa diferença se dá em razão do processo de produção do mosto que favorece uma maior extração de açúcares contidos na vagem.

Fermentação em estado sólido

Durante o cultivo de 240 horas (Figura 1), as características do substrato sofreram algumas alterações visuais. A Figura 1.2 corresponde a algaroba antes de ser inoculada, onde apresentava uma coloração marrom escura após o processo de esterilização. No decorrer do processo fermentativo, após 72 horas de cultivo foi observado uma camada de micélio vegetativo de cor esbranquiçada preenchendo a superfície da algaroba, exibindo um aspecto característico de *M. anisopliae* (Figura 1.1). Às 120 horas todo o bagaço foi coberto por micélio fúngico como também o aroma foi alterado mostrando-se mais característico ao processo fermentativo. A partir das 192 horas de fermentação

começou a surgir uma camada pulverulenta de conídios visíveis a olho nu em tons de verde, o que comum da espécie. Para o controle do crescimento celular utilizamos o arroz, que de acordo com a literatura é o substrato padrão para produção de biomassa de fungos entomopatogênicos, o que também demonstrou um crescimento satisfatório esperado (22).



Figura 1. Aspecto macroscópico da fermentação em estado sólido de *Metarhizium anisopliae* em vagens de algaroba. 1) Crescimento em substrato alternativo (algaroba); 2) Controle negativo; 3) Controle positivo, crescimento celular em substrato padrão (arroz). Fonte: Autor.

pH

O pH do substrato não sofreu ajuste, correspondendo ao pH encontrado na fibra da algaroba *in natura* de 5,4. Ao longo da fermentação, o pH apresentou-se variante, porém não possuindo uma variação muito discrepante, o que poderia influenciar na produção e atividades enzimáticas. Esta variação indica a produção de metabólitos pela ação do crescimento celular no processo fermentativo, associado à ação enzimática. No início da fermentação, o pH se manteve em valores semelhante ao do substrato. Às 120 horas foi visto o menor valor de pH da fermentação de 4,27. No último dia foi encontrado o maior valor de pH com o valor de 6,63 (Figura 2).

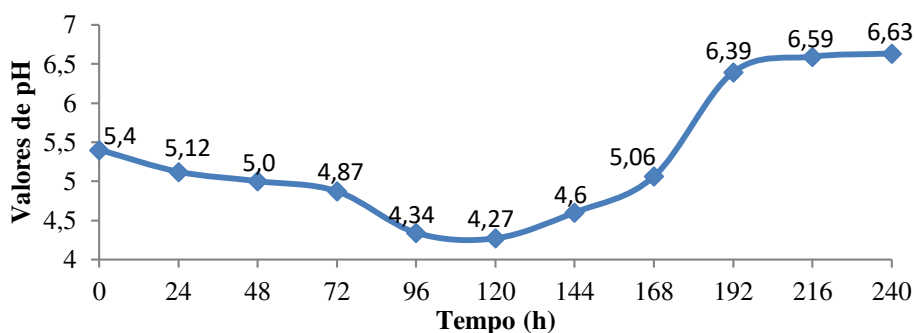


Figura 2. Valores de pH ao longo das 240 horas de fermentação. Fonte: Autor.

Atividade amilolítica sacarificante

A produção das enzimas amilolíticas sacarificantes foi analisada através da quantificação da unidade de atividade enzimática (U/g) por tempo de fermentação. O período de 72 a 96 horas correspondeu ao período de maior quantificação de atividade enzimática, com valores 6,627 U/g e 6,378 U/g, respectivamente (Figura 3), isso demonstra a escolha da fonte energética utilizada pelo fungo no início do crescimento celular. Após 96 horas até ao final da fermentação valores da atividade enzimática menores, não diferindo estatisticamente.

Estudos utilizando também um fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, com o mesmo substrato em FES demonstram valores inferiores aos vistos neste estudo (14). Em outro estudo utilizando a farinha do milho como substrato, a amilase produzida obteve comportamento semelhante, sendo 72 horas o período de maior obtenção da enzima (10). Diante desse achado pode-se inferir que o fungo *M. anisopliae* é produtor de enzimas que hidrolisam o amido presente no substrato, em moléculas de glicose, com a finalidade de crescimento celular.

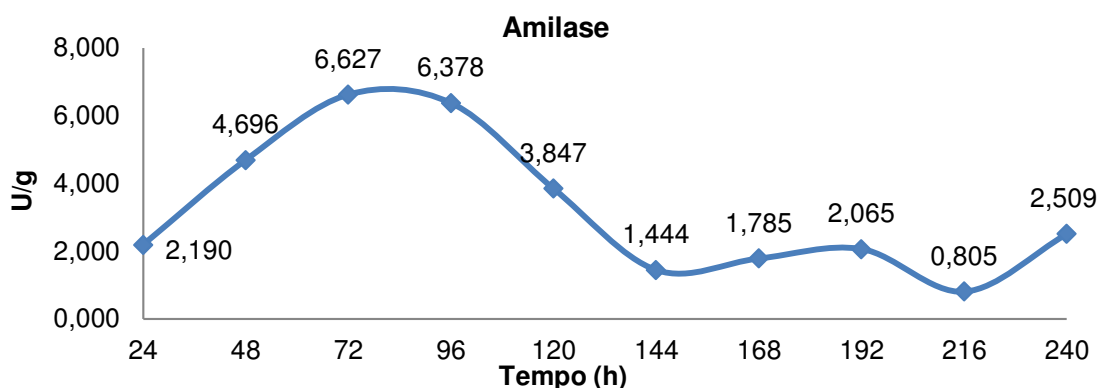


Figura 3. Análise da atividade amilolítica sacarificante de *Metarhizium anisopliae* utilizando algaroba como substrato em fermentação em estado sólido. Fonte: Autor.

Temperatura ótima

As enzimas amilolíticas foram submetidas a diferentes temperaturas para analisar qual temperatura favorece a produção enzimática e quais são capazes de provocar desnaturação enzimática. Diante disso para a amilase produzida nessa fermentação, a melhor temperatura que favoreceu a melhor produção enzimática foi à temperatura de produção (30 °C) (Tabela 3). Deste modo, observamos que a amilase produzida neste substrato não possui tolerância satisfatória para variações de temperatura.

Tabela 3. Perfil de produção enzimática em diferentes variações de temperatura.

Temperatura °C	Amilase (U/g)
30	1,17
40	0,53
50	0,25
65	0,63
70	0,75

Fonte: Autor.

Termoestabilidade

As enzimas amilolíticas ao longo de 60 minutos, foram expostas à temperatura que favoreceu a maior produção enzimática. A amilase produzida não demonstrou estabilidade satisfatória ao longo do tempo, de acordo com os valores da atividade enzimática visto na Figura 4. Sua atividade alcançou o maior valor em 20 min, porém não mostrou estabilidade da atividade durante o período analisado (Figura 4).

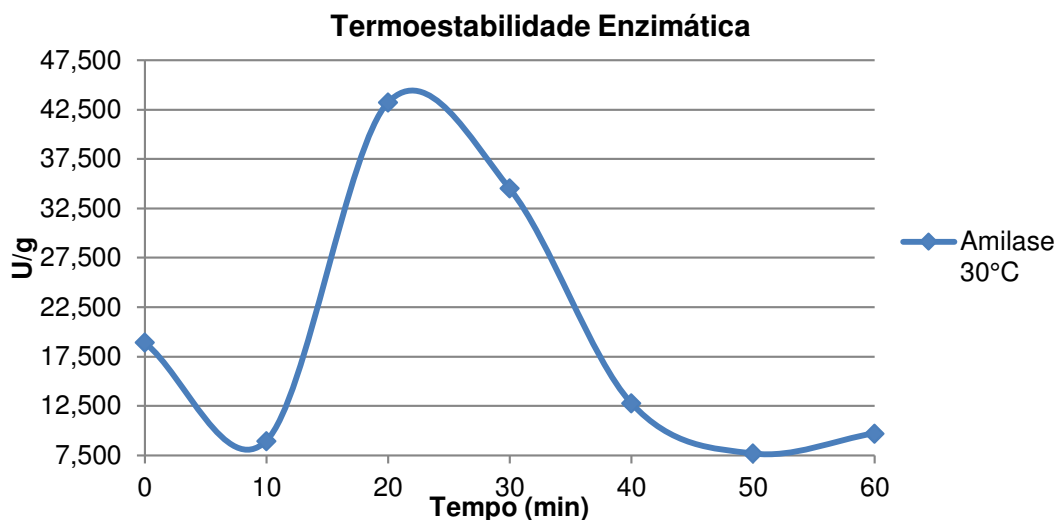


Figura 4. Avaliação da termoestabilidade enzimática das enzimas: amilase nas temperaturas ótimas. Fonte: Autor.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi analisada para comparar com as enzimas analisadas nesse estudo, tendo em vista que a produção de proteases é comum para o *M. anisopliae*, por está relacionado ao processo de infecção no hospedeiro.

Os resultados foram avaliados de acordo com a quantidade de unidade enzimática ao longo das 240 horas de fermentação. Foi observada uma considerável produção de proteases por *M. anisopliae* utilizando algaroba como substrato. A maior produção foi observada no último dia (240 h) com o valor de 175,8 U/g, como mostrado na Figura 5.

A alta atividade proteolítica pode está relacionado também ao processo de degradação da alta quantidade de enzimas produzidas nesse processo fermentativo.

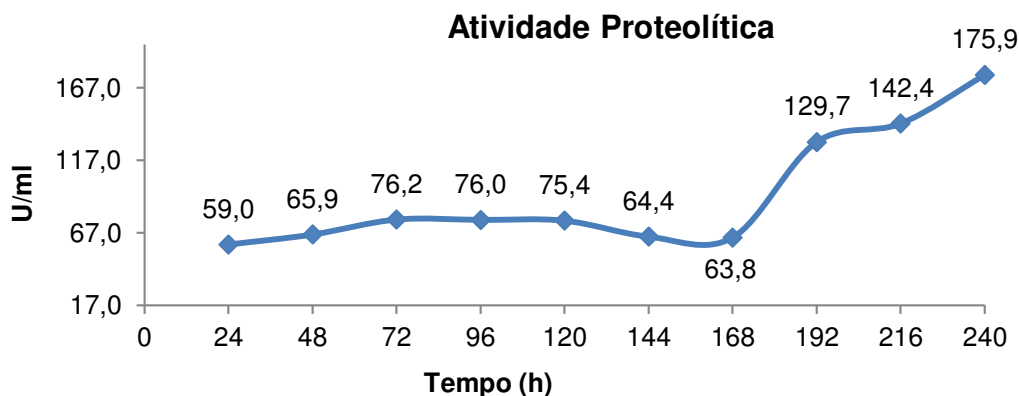


Figura 5. Análise da atividade proteolítica de *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio sólido de fibras de algaroba. Fonte: Autor.

Proteínas totais solúveis (PTS) do extrato bruto

Durante o processo, a quantidade de proteínas aumentou progressivamente, mostrando um perfil satisfatório, em detrimento ao aumento progressivo das enzimas produzidas no processo fermentativo, relacionado ao crescimento e metabolismo celular (Figura 6).

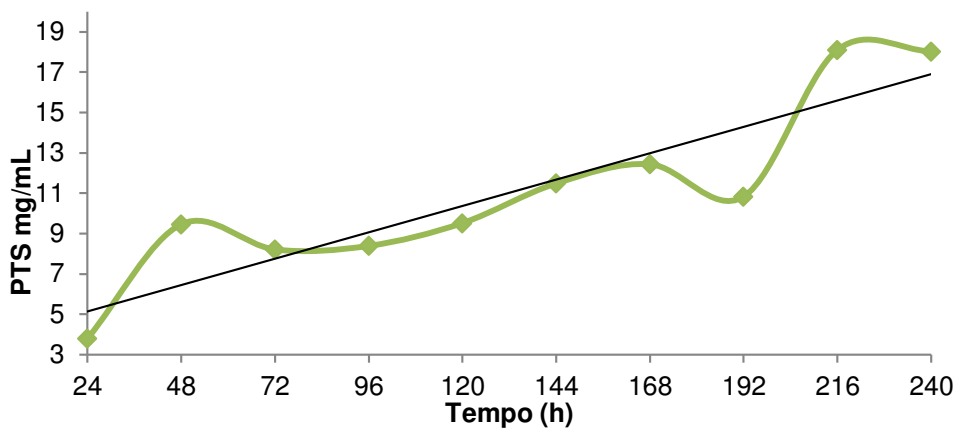


Figura 6. Produção de proteínas totais solúveis dos extratos bruto correspondente às 240 horas de fermentação. Fonte: Autor.

4. CONCLUSÕES

Os extratos brutos da algaroba oriundos da fermentação em estado sólido mostram favorável à produção de enzimas amilolíticas e proteolíticas, garantido pelo crescimento de *M. anisopliae*; As enzimas amilolíticas produzidas no processo fermentativo não são termoestáveis e apresentam atividade ótima a 30 °C; O fungo filamentoso *M. anisopliae* foi capaz de produzir altos valores de enzimas proteolíticas nos extratos brutos da algaroba. A algaroba mostrou um potencial para ser explorado na produção de enzimas de importância biotecnológica.

REFERÊNCIAS

1. Alva S. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African journal of Biotechnology. 2007; 6: 576-581.
2. Alves SB. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. 1ª. edição, Malone Ltda; 1998.
3. Barbosa JD, Oliveira C MC, Duarte MD, Albernaz TT. Intoxicações com manifestações neurológicas em ruminantes. Simpósio Mineiro de Buia Simpósio Mineiro de Buia Simpósio Mineiro De Buiatria. 2005; 5. 1-199.

4. Câmara ACL, Costa NA, Riet-Correa F, Afonso JAB, Dantas AF, de Mendonça C L, de Souza, MI. Intoxicação espontânea por vagens de *Prosopis juliflora* (Leg. Mimosoideae) em bovinos no Estado de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009; 29: 233-40.
5. Carvalho RVD, Córrea TLR, Silva JCMD, Mansur LRCDO, Martins MLL. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 2008; 39: 102-107.
6. Correia RTP. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. [Tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2004.
7. Czczot AM. Desenvolvimento de sistemas de análise da função gênica para fungos entomopatogênicos: Construção de linhagem Δ Ku70 em *Metarhizium anisopliae*. [Monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016.
8. Da Silva GA, Almeida WE, Martins E S, Cortes MS. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. 2009; 3: 47-55.
8. El Hag Mg, Al Shargi KM, Eid AA. The nutrient composition of animal feeds available in the Sultanate of Oman. Agriculture and Fisheries Research Bulletin, 2000; 1: 1-14.
9. Freitas LS, Martins ESM, Ferreira OE. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. Revista Brasileira de Biociências. 2014; 12: 57-68.
10. Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
11. Godoy MG. Produção de lipases microbianas e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009.
12. Guandalini NC. Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium*. 2007.
13. Guimarães AGLP. Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria Bassiana* (Bals) *vuillemin* (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) em diferentes substratos. [Dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2016.
14. Hughes JB, Sousa JS, Barreto RA, Silva AR, Souza CS, Silva VDA. Batatinha MJM. Cytotoxic effects of an extract containing alkaloids obtained from *Prosopis juliflora* Sw. DC (Algaroba) pods on glioblastoma cells. Rev. Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2006; 6: 67-74.
15. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ªd. São Paulo; 1985.
16. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ªd. São Paulo; 2005.
17. Joo HS, Chang CS. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. Process Biochemistry. 2005; 5: 1263-1270.
18. Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. Process Biochemistry. 2005; 40: 1701-1705.
19. Kumar V, Sahai V, Bisaria VS. Production of amylase and chlamydozoospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2012; 1: 124-128.
20. Leemon DM, Jonsson NN. Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). J of invertebrate pathology. 2012; 109: 248-259.

21. Mascarin GM, Quintela ED. Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico. Embrapa Arroz e Feijão- Documentos (INFOTECA-E); 2013.
22. Miller GL. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959; 31: 426-429.
23. Moraes JPS, Rosa MDF, Marconcini JM. Procedimentos para análise lignocelulósica. Campina Grande: Embrapa algodão; 2010.
24. Nascimento WCAD, Martins MLL. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006.
25. Oliveira IMD. Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura. [Dissertação]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2008.
26. Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Enzyme Technology. 1ª ed. New Delhi; 2005.
27. Pegado CMA, Andrade LD, Félix, LP, Pereira IM. Efeitos da invasão biológica de algaroba-*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. Acta Botanica Brasílica. 2006; 20: 887-898.
28. Rao MB, Tanksale, AM, Ghatge M S, Deshpande, VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews. 1998; 62: 597-635.
29. Santos SFM. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. [Tese] Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.
30. Sene L, Alves LFA, Lobrigatte MFP, Thomazoni D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. Arq. Inst. Biol. 2010; 7: 449-456.
31. Silva CG, Mata M, Braga MED, Queiroz VS. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 2003; 5: 51-56.
32. Silva CGMD, Filho ABM, Pires EF, Stamford TLM. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2007; 27: 69-77.
33. Souza PMD, Bittencourt MLDA, Caprara CC, Freitas MD, Almeida RPCD, Silveira D, Magalhães PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology. 2015; 46: 337-346.
34. Sturmer AT, Ito ET, Pereira GV, Miyagui DT. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde. 2003; 5: p.85-88.
35. Veen, KH. Recherches sur la maladie, due à *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. [Tese]. Veenman. Netherland: Mededingen Landbouwhoge school Wageningen; 1968.