



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

RENATA SAMPAIO MAFRA DE SANTANA

**ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
2012**

RENATA SAMPAIO MAFRA DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:
Prof.^o Dr.^o Marcelo Franco

Co-orientador:
Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL

2012

660.634 S223p	<p>Santana, Renata Sampaio Mafra de.</p> <p>Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. / Renata Sampaio Mafra de Santana. – Itapetinga, BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. 73 fl.</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - <i>Campus</i> de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. DSc. Marcelo Franco e co-orientação da Prof^a DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.</p> <p>1. Enzimas amilolíticas – Produção – Culturas alternativas – Indústrias. 2. Enzimas – Usos – Indústrias. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, <i>Campus</i> de Itapetinga. II. Franco, Marcelo. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Título</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 660.634</p>
------------------	--

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Enzimas amilolíticas : Produção
2. Enzimas : Usos : Indústrias
3. Culturas alternativas : Obtenção : Enzimas amilolíticas



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMINOLÍTICAS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO”.

Autor: RENATA SAMPAIO MAFRA DE SANTANA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco, DSc., UESB

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Marcelo Franco, DSc., UESB

Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis, DSc., UEFS

Prof^a. Dr^a. Daniela Deitos Fries, DSc., UESB

Data da Realização: 27 de fevereiro de 2012.

Praça Primavera, Nº 40, Bairro Primavera – Telefone: (77) 3261-8629 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA CEP: 45.700-000 – e-mail: ppgeal.uesb@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por conceder mais essa vitória em minha vida, ter me abençoado e me iluminado em todos os momentos.

Aos meus pais Luiz e Clélia, sempre presentes em minha vida, responsáveis pela minha educação, agradeço pelos incentivos e conselhos constantes.

À minha filha Clara, foi por você que cheguei até aqui, e é por você que seguirei em frente.

Ao meu irmão Luiz Gustavo e a todos os demais familiares pelo apoio e torcida.

Ao professor Marcelo Franco pela grandiosa orientação, paciência e compreensão por entender minha situação em relação à distância.

À professora Renata Bonomo pela co-orientação e ajuda nos trabalhos.

Às professoras Daniela e Sandra por ter aceitado participar da banca.

Ao professor Marcondes Viana, pela orientação no estágio supervisionado.

Ao meu primo e professor Nívio pela grande ajuda durante os trabalhos, pelos conselhos, pelas correções e dicas que me ajudaram muito.

Aos grandes amigos Ciça, Ilza, Rael e família, pela amizade e hospitalidade durante todo o período do curso.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo programa de Pós Graduação.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao amigo Zanon, pela valiosa ajuda nos trabalhos de laboratório.

Aos colegas do LABRA Tamires, Thiago, Alê, Ane, Jobson pelos momentos que passamos juntos no laboratório, e pela contribuição nas atividades executadas.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!!!!

RESUMO

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. 73p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos – Ciência dos Alimentos).*

Objetivou-se no presente estudo utilizar os meios de cultura alternativos (farelo de cacau, casca de mandioca e palma forrageira), para obtenção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido utilizando os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* Na fermentação em estado sólido o micro-organismo é inoculado em um substrato onde a água promove o crescimento e metabolismo celular e não excede a capacidade máxima de ligação de água a matriz sólida. A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/g de meio de sólido e as fermentações foram conduzidas em três tempos (24, 72 e 120 horas), três temperaturas (25°C, 30°C e 35°C) e em três umidades (55, 60 e 65% para o cacau; 45, 55 e 65% para a mandioca; 50, 60 e 70% para a palma). A atividade enzimática foi determinada pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). Em todas as fermentações foi possível identificar a presença de enzimas amilolíticas, onde as quantidades obtidas em cada ensaio variaram de acordo com a quantidade de água adicionada e o tempo de fermentação das amostras. É possível observar que todos os meios de cultura utilizados foram viáveis para produzir enzimas amilolíticas, mostrando que é possível obter produtos de alto valor agregado de resíduos que são rejeitados pela indústria sem nenhum valor, podendo a partir daí obter enzimas e utilizar em diversos ramos da indústria.

Palavras – chave: amilase, bioconversão, fungos filamentosos.

*Orientador: Prof^o. Marcelo Franco, Dr^o., UESB e Co-orientadora: Prof^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dr^a., UESB.

ABSTRACT

SANTANA, R. S. M. **Production of amylolytic enzymes by solid state fermentation.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. 73p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos – Ciência dos Alimentos).*

The objective of the present study using the alternative culture media (bran, cocoa, cassava and cactus), to obtain amylolytic enzymes by solid state fermentation using the fungi *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* In solid-state fermentation micro-organism is inoculated in a substrate where the water promotes cellular growth and metabolism and does not exceed the maximum capacity of binding water to a solid matrix. The concentration of spores used as inoculum was 10^7 spores / g of medium and solid fermentations were conducted in three stages (24, 72 and 120 hours), three temperatures (25 ° C, 30 ° C and 35 ° C) and three moisture contents (55, 60 and 65% for cocoa, 45, 55 and 65% for cassava, 50, 60 and 70% for the palm). The enzyme activity was determined by dinitrosalicílico acid (DNS). In all fermentations was possible to identify the presence of amylolytic enzymes, where the quantities obtained in each assay varied according to the amount of water added and the fermentation time of the samples. You can see that all culture media were used to produce viable amylolytic enzymes, showing that it is possible to obtain products of high added value of waste that is rejected by the industry with no value and may thereafter obtain enzymes and use in various branches of industry.

Keywords: amylase, bioconversion, filamentous fungi.

*Adviser: Prof^o. Marcelo Franco, Dr^o., UESB e Co-adviser: Prof^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dr^a., UESB.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características da FES quanto as suas vantagens e desvantagens	22
Tabela 2 – Reagentes utilizados durante as análises	40
Tabela 3 – Equipamentos utilizados durante o experimento	40
Tabela 4 – Valores codificados e valores “reais” para cada fator em estudo	46
Tabela 5 – ANOVA para modelo quadrático da superfície de resposta para a produção de enzimas amilolíticas	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cacau – <i>Theobroma cacao</i>	16
Figura 2 – Fluxograma do processamento de cacau em chocolate	17
Figura 3 – Mandioca	18
Figura 4 – Palma forrageira (<i>Opuntia ficus indica</i> – Mill)	20
Figura 5 – Representação da fermentação em estado sólido	21
Figura 6 – Hifas penetrativas e aéreas	28
Figura 7 - Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus niger</i>	29
Figura 8 - <i>Aspergillus niger</i>	30
Figura 9 – Imagem do <i>Aspergillus niger</i> vista ao microscópio óptico	31
Figura 10 – Imagem de esporângios do fungo <i>Rhizopus sp.</i> vista ao microscópio óptico	32
Figura 11 – Classificação das enzimas amilolíticas	35
Figura 12 – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas	36
Figura 13 – Farelo de cacau	41
Figura 14 – Farelo de casca de mandioca	41
Figura 15 – Palma forrageira	42
Figura 16 – Câmara de Neubauer	43
Figura 17 – Fermentação em estado sólido	43
Figura 18 – Produção de amilase no farelo de cacau (a) e na palma forrageira (b)	50
Figura 19 – Produção de amilase no farelo de cacau	52
Figura 20 – Produção de amilase na palma forrageira	53
Figura 21 – Produção de amilase na casca de mandioca	54
Figura 22 – Efeito do pH na atividade de amilase para o farelo de cacau	55
Figura 23 – Efeito do pH na atividade de amilase para a casca de mandioca	56
Figura 24 – Efeito do pH na atividade de amilase para a palma forrageira	57
Figura 25 – Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica do farelo de cacau	58
Figura 26 – Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica da casca de mandioca	59
Figura 27 – Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica da palma forrageira	60
Figura 28 – Estabilidade térmica da amilase no farelo de cacau	61
Figura 29 - Estabilidade térmica da amilase na casca de mandioca	62
Figura 30 – Estabilidade térmica da amilase na palma forrageira	63

LISTA DE SÍMBOLOS

FSm	Fermentação submersa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FES	Fermentação em estado sólido
CEPLAC	Comissão executiva do plano da lavoura cacaueteira
MAC	Metabolismo ácido das crassuláceas
pH	Potencial hidrogeniônico
Aw	Atividade de água
PDA	Potato dextrose agar
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UBU	Concentração em base úmida
DNS	Ácido dinitrosalicílico
BSA	Albumina de soro bovino
ANOVA	Análise de variância
DCCR	Delineamento composto central rotacional
MSR	Método de superfície de resposta
SAS	Sistema para análises estatísticas
LABRA	Laboratório de resíduos agroindustriais
EEB	Extrato enzimático bruto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Meio de cultura alternativo	15
2.1.1	Farelo de cacau	16
2.1.2	Cascas de mandioca	18
2.1.3	Palma forrageira	19
2.2	Fermentação em estado sólido	20
2.2.1	Fatores que influenciam a FES	23
2.2.1.1	Umidade	23
2.2.1.2	Temperatura	24
2.2.1.3	pH	25
2.3	Micro-organismos empregados na FES	26
2.3.1	<i>Aspergillus</i>	28
2.3.2	<i>Rhizopus sp.</i>	31
2.4	Enzimas	32
2.4.1	Enzimas amilolíticas	34
2.4.1.1	α -amilase	37
2.4.1.2	β -amilase	38
2.4.1.3	Glucoamilase	38
3	OBJETIVO	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Material e equipamentos	40
4.2	Substrato	41
4.3	Seleção de micro-organismos	42
4.4	Obtenção da solução de esporos e preparo do inoculo	42
4.5	Fermentação em estado sólido	43
4.6	Obtenção do extrato enzimático bruto	43
4.7	Determinação da atividade amilolítica	44
4.7.1	Atividade amilolítica sacarificante	44
4.8	Determinação de proteínas – Bradford	44
4.9	Determinação do pH e temperatura ótimos e avaliação da termoestabilidade	45
4.10	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Fermentação em estado sólido	47
5.2	Quantificação da produção de amilase com o fungo filamentoso <i>Aspergillus niger</i>	50
5.3	Quantificação da produção de amilase com o fungo filamentoso <i>Rhizopus sp.</i>	52
5.4	Determinação do pH ótimo com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	55
5.4.1	Determinação do pH ótimo para o farelo de cacau	55
5.4.2	Determinação do pH ótimo para a casca de mandioca	55
5.4.3	Determinação do pH ótimo para a palma forrageira	56

5.5	Determinação da temperatura ótima com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	57
5.5.1	Determinação da temperatura ótima para o farelo de cacau	57
5.5.2	Determinação da temperatura ótima para a casca de mandioca	59
5.5.3	Determinação da temperatura ótima na palma forrageira	60
5.6	Termoestabilidade	61
5.6.1	Estabilidade térmica da amilase produzida no farelo de cacau	61
5.6.2	Estabilidade térmica da amilase produzida na casca da mandioca	62
5.6.3	Estabilidade térmica da amilase produzida na palma forrageira	62
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Processos fermentativos são utilizados pela humanidade para a produção de bebidas alcoólicas, pães, vinagre, iogurte, queijos entre outros, mas somente a partir do século XIX é que se descobriu que os responsáveis pela fermentação eram micro-organismos. A fermentação é uma ferramenta muito utilizada nos processos industriais e apresenta importância crescente em diversos setores da economia. Muitos produtos são comercializados através de produtos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI, 2001).

Há muito tempo o homem utiliza enzimas para catalisar uma série de reações. De acordo com Leadlay (1993), as enzimas já eram utilizadas diariamente na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula, muito antes de se entender a natureza e função. O uso do malte da cevada para conversão do amido em açúcares e o uso similar de preparações fúngicas brutas em países orientais são exemplos de alguns usos antigos de enzimas. Entre as enzimas produzidas por técnicas biotecnológicas, aquelas com atividade amilolítica apresentam um papel importante na indústria de alimentos, pois a maioria dos processamentos industriais do amido envolve a hidrólise desse polímero, que passa então a ser convertido em xaropes de glicose, maltose, frutose, maltotetose, dextrinas e ciclodextrinas. Cada tipo de xarope requer diferentes tipos de enzimas amilolíticas (GOMES *et al.*, 2007).

A produção de enzimas amilolíticas teve início no começo do século passado, em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados. Também foram isolados ou desenvolvidos micro-organismos capazes de produzir enzimas em altas concentrações (COSTA, 1996).

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

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

industriais e em aplicações agrobiotecnológicas, pois requerem baixa tecnologia e maior economia de processo quando comparada ao processo de fermentação submersa.

Os setores agro-industriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. A observação ao longo dos tempos demonstrou que esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e, serem potenciais poluentes, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agro-industriais.

De uma forma particular, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias apresentam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis.

A FES consiste em uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (PALMA, 2003).

Na fermentação em estado sólido, os fungos representam os micro-organismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima, sendo a espécie de *Aspergillus niger* de grande destaque. Duas importantes razões que justificam o uso comercial deste fungo em grande escala são a grande variedade de produtos que é capaz de produzir e o fato de ser considerado um micro-organismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2009)

Mundialmente, as atuais linhas de pesquisa em FES são o enriquecimento protéico de resíduos agro-industriais, nos quais os micro-organismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

Nesse sentido, a FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como de agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros, e com isso contribuir para uma maior diversificação do agro-negócio nacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

Os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente difundidos em vários segmentos industriais e possuem uma série de vantagens em relação aos processos químicos convencionais. Isto porque a maioria dos materiais de natureza orgânica, como subprodutos da agroindústria de baixo valor comercial, porém de elevado teor de carboidratos, podem constituir o substrato para os processos fermentativos (MEINHARDT *et al.*, 2005).

O aprofundamento na utilização dos recursos potencialmente aproveitáveis merece mais que uma simples reflexão passageira, pois no setor agroindustrial não há o reconhecimento pela sociedade como sendo um setor que polui o meio ambiente (SENHORAS, 1995). Por outro lado, com as medidas de proteção e recuperação ambiental que vem se expandindo em todos os setores, a sociedade está sendo conduzida para uma reflexão mais profunda quanto às práticas adotadas pelo setor agroindustrial.

O setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade de resíduos que podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente nesse material é 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.*, 2005a; PANDEY *et al.*, 1999a).

Estima-se que a produção anual de resíduos agroindustriais esteja na ordem de bilhões de toneladas. A América Latina produz mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo que o Brasil é responsável por mais da metade (SANTOS *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, segundo Pandey *et al* (2000), houve um crescente interesse na biotransformação desses resíduos, por ser um material de baixo custo e altamente renovável. Deste modo, a utilização desses resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à disposição inadequada, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção.

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

Alguns resíduos agroindustriais apresentam limitações no seu uso como fertilizantes ou na alimentação animal, devido à presença de compostos tóxicos, alergênicos ou antinutricionais. Além disso, esses fatores tornam problemática a sua disposição no meio ambiente, podendo levar a sérios problemas ambientais. Diversas tentativas têm sido realizadas para eliminar esses fatores (GODOY, 2009).

2.1.1 Farelo de cacau

O cacaueteiro é originário de regiões de floresta pluviais da América Tropical, onde até hoje, é encontrado em estado silvestre, desde o Peru até o México. É denominado cientificamente como *Theobroma cacao* (Figura 1), pertence à família das Esterculiáceas, e foi citado pela primeira vez na literatura botânica por Charles de l' Ecluse, que o descreveu sob o nome de *Cacao fructus*. Em 1937, foi descrito como *Theobroma fructus* por Linneu, que, em 1753, propôs o nome *Theobroma Cacao*, que permanece até hoje.



Figura 1: Cacau – *Theobroma cacao*. Fonte: Indeca, 2011

No estado da Bahia, a produção cacaueteira constitui uma importante atividade agrícola brasileira, uma vez que é responsável pela produção de aproximadamente 175 mil toneladas, representando cerca de 83% do cacau produzido no país, vindo em seguida os estados do Pará, com 10% e Rondônia, com 5% (CEPLAC, 1999; PERES, 1998). Segundo dados do IBGE, o Brasil produziu 218,48 mil toneladas de amêndoa de cacau em 2009, sendo as Regiões Norte/Nordeste responsáveis por mais de 96% dessa produção. Nesse mesmo ano, o Nordeste produziu 137,92 mil toneladas da amêndoa do fruto, respondendo a Bahia por 100% da produção regional e cerca de 64% da nacional (SENA, 2011).

O grão do cacau é utilizado para fabricação de chocolate e durante o processamento (Figura 2) gera uma grande quantidade de resíduo denominado farelo de cacau.

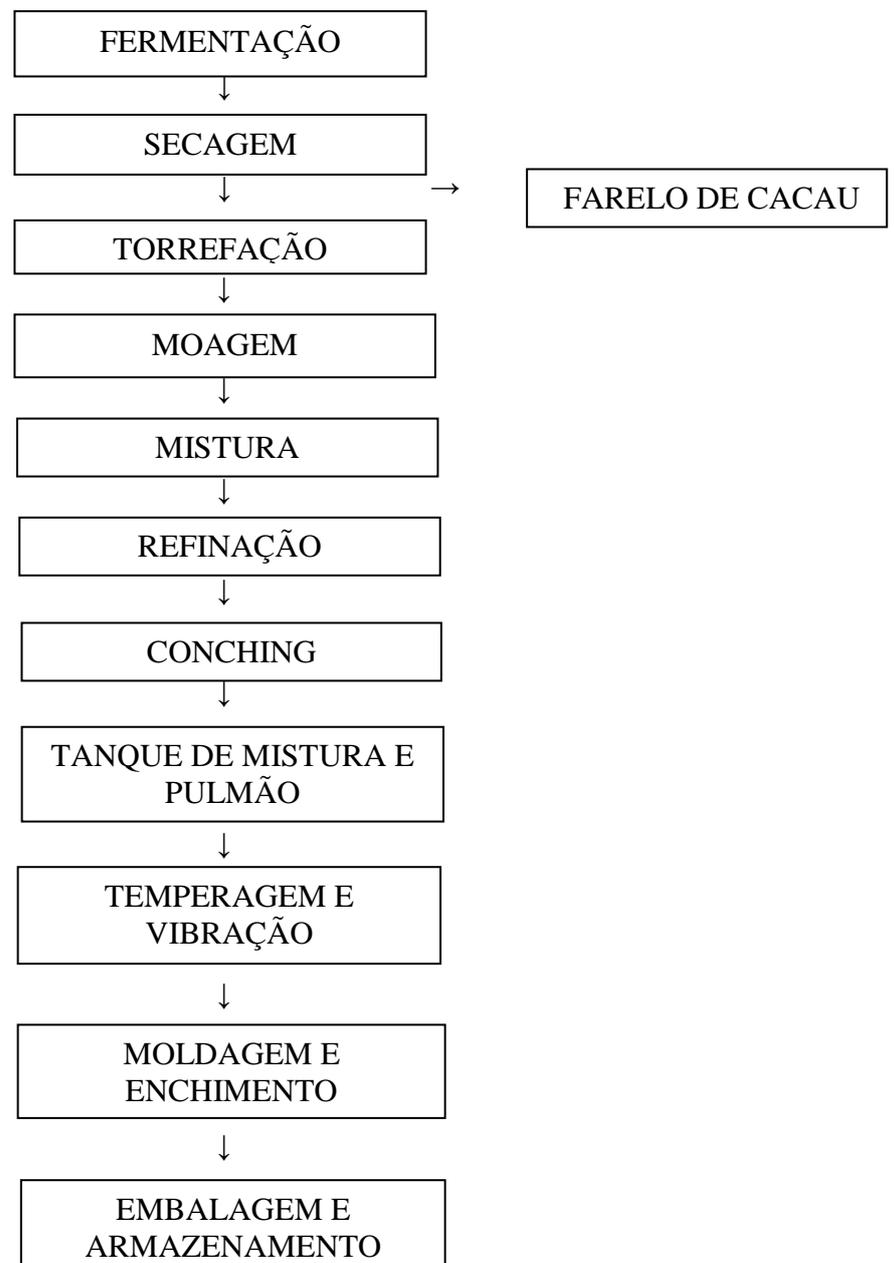


Figura 2: Fluxograma do processamento de cacau em chocolate. Fonte: Amorim, 2011

Considerando-se que o farelo de cacau representa 10% da produção das amêndoas secas (NETO *et al.*, 2008), a qual correspondeu a 218.000 t no ano de 2009, estima-se que a produção brasileira desse resíduo, neste ano, foi de 21.800 t.

A proporção aproveitável de subprodutos e resíduos do cacau é bastante expressiva, pois menos de 8% do peso do fruto do cacauzeiro, em estado normal de maturação, é usado pela indústria beneficiadora. Em geral, um fruto com peso médio de 500g é constituído de 80% de

casca, e 20% de semente, na qual estão presentes o grão seco, a amêndoa, a testa e outros constituintes do total do fruto (FREIRE *et al.*, 1990). A tostagem, operação que se realiza após a fermentação dos grãos, com temperatura em torno de 150°C, reduz a umidade dos mesmos para cerca de 2%. Na tostagem, os compostos fenólicos, como taninos, presentes no grão, são oxidados, sendo, nesse processo, eliminado também o ácido acético formado durante a fermentação, ésteres e outras substâncias aromáticas não desejáveis, além de ovos de eventuais parasitos. Após tratamento térmico, o aroma e a cor dos grãos são reforçados, tornando os grãos duros e quebradiços, com desprendimento da casca da semente (BELITZ; GROSCH, 1988). Essa casca constitui o farelo de cacau, que possui composição variando de acordo com processo usado nessa separação. Aderidos à casca, podem se soltar pedaços do grão, cuja maior ou menor quantidade, confere ao farelo de cacau diferenças em sua composição química, principalmente, em proteína e fibra. Além da torrefação, outro processo pode ser usado para separar a casca do grão, que consiste em lavá-los após secagem ao ar e, em seguida, submetê-los a vapor em equipamento apropriado; dessa maneira, o grão incha e a casca se solta (PIRES *et al.*, 2005).

2.1.2. Cascas de mandioca

A mandioca (Figura 3), também conhecida por aipim e macaxeira é uma cultura amplamente difundida por todo o território nacional, sendo um dos principais alimentos de milhões de pessoas de países tropicais, inclusive o Brasil (CONCEIÇÃO, 1981). É denominada cientificamente como *Manihot esculenta*, e cultivada em todo território brasileiro, com exceção do sul do Rio Grande do Sul, região muito fria para o desenvolvimento desta cultura (KOLICHESKI, 1995).



Figura 3: Mandioca. Fonte: Embrapa, 2005

A produção nacional anual de mandioca é estimada em 23 milhões de toneladas, sendo os maiores registros nos Estados do Pará, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Maranhão. A cultura da mandioca é explorada em mais de 90 países, devido à significativa função social

exercida, principalmente, junto às famílias de menor poder aquisitivo, contribuindo para a alimentação de, aproximadamente, meio bilhão de pessoas em todo planeta (CEPA, 2004).

A indústria farinheira é a principal consumidora das raízes produzidas, utilizando aproximadamente 80% da produção brasileira de mandioca. Embora não existam dados absolutos a respeito da quantidade total de resíduos produzidos a partir da industrialização farinheira, sabe-se que cerca de 10% da mandioca total utilizada na fabricação de farinha é eliminada na forma de casca e aproximadamente 3% a 5% na forma de farinha de varredura (CALDAS *et al.*, 2000).

As farinhas que passam por torrefação, tais como farinha seca, farinha d'água ou farinha do Pará, são, geralmente, utilizadas no consumo direto à mesa, enquanto que as farinhas provenientes de raízes secas, farinha de raspa ou farinha de apra são utilizadas em panifícios, destinando-se também para as massas, em mistura com a farinha de trigo, na composição de rações e de lama aquosa, para mineração do petróleo, na produção de álcool e agentes ligantes e na indústria de fundições (EMBRAPA, 2003).

A casca de mandioca é o resíduo obtido durante o início da fabricação da farinha de mandioca, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas de mandioca e apresentando elevado teor de umidade (85%). A casca de mandioca desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta e 28,6% de fibra em detergente neutro (MARTINS *et al.*, 2000).

Segundo Cereda (1994) os resíduos do processamento da mandioca são partes constituintes da própria planta que são gerados em função do processo tecnológico adotado. A qualidade dos resíduos é determinada por fatores como cultivar, idade da planta, tempo após a colheita, tipo e regulação de equipamento industrial, etc. Peters (2003) cita que o processamento de 1 tonelada de raiz de mandioca gera 10,7 m³ de água residual e cascas e que, em média, 47% do beneficiamento de uma safra torna-se resíduo. Segundo o mesmo autor a poluição da água e do solo normalmente são as mais observadas e a poluição visual gerada através das montanhas de resíduos não é citada ou levada em consideração quanto ao aspecto da paisagem.

2.1.3 Palma

A palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) (Figura 4) é uma cultura adaptada ao clima semi-árido e tem se destacado como alternativa de sustentabilidade para a pecuária regional, por ser uma cultura com maior eficiência no uso da água, apresentando elevada capacidade produtiva de biomassa, além de ser uma planta de múltiplos usos pela variedade dos seus produtos e subprodutos (BLAMONT, 2002).



Figura 4: Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill). Fonte: Natureza bela, 2011

A zona fisiográfica do Semi-árido da Bahia ocupa 360 mil km², área que corresponde a 64% do território baiano, onde residem 48% da população estadual. O semi-árido é caracterizado por solos rasos, pedregosos ou arenosos e pouca matéria orgânica. As precipitações pluviométricas são irregulares e concentradas no verão. A cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem. Dentre estas, a palma forrageira tem sido utilizada como forragem (CHIACCIO *et al.*, 2006; BLAMONT, 2002; SOUSA *et al.*, 2009). Além dessa aplicação, a palma pode ser utilizada como matéria-prima para bioprocessos, visando à produção de compostos orgânicos como as enzimas (ARAÚJO *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009; GHORAI *et al.*, 2009, PANDEY *et al.*, 2005).

2.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A Fermentação em estado sólido (FES) vem sendo utilizada desde a antiguidade, com o uso do molho de soja na China, desde 3000 a.C e no Japão e sudoeste da Ásia, desde 1000 a.C (ARAÚJO, 2004).

Nas últimas décadas, várias estratégias têm sido desenvolvidas para o aproveitamento da vasta quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados anualmente, pelas atividades agrícolas e florestais e pelas indústrias de processamento de alimentos (BUSWELL *et al.*, 1998).

A FES é definida como o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre (Figura 5). Neste caso, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL *et al.*, 2006a; RAHARDJO *et al.*, 2005).



Figura 5: Representação da fermentação em estado sólido. Fonte: O autor

Pandey *et al.* (2001) acreditam que a tecnologia de FES não deve ser encarada como uma técnica que substitui a fermentação submersa. Na verdade, cada uma dessas técnicas possui suas potencialidades e particularidades. No entanto, existe o consenso da necessidade de investigação contínua dos fatores relacionados à FES para permitir que o pleno potencial desta tecnologia seja utilizado.

A água livre, indispensável ao crescimento dos micro-organismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida RAIMBAULT; ALAZARD (1980), MAHEVA *et al* (1984), LONSANE *et al* 1985, TANGERDY (1985), MUDGETT (1986) e ORIOL (1987), SOCCOL, (1992).

O material sólido utilizado em FES 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 são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial, no entanto, os substratos celulósicos permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados – 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL, 1992).

Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água, na qual as condições de crescimento aproximam-se do habitat natural de fungos, o que facilita o crescimento destes no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (MITCHELL; LONSANE, 1992).

Os principais micro-organismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos, cujas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOL, 1987). A matriz porosa pode ser

constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em umidades muito baixas, da ordem de 12%, porém os níveis de umidade relativa variam de 12 a aproximadamente 80%. A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE *et al.*, 1985), suportando também pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), tais características não são encontradas nas leveduras e bactérias.

Lonsane *et al.* (1991b) por sua vez, mencionam que a fermentação em estado sólido apresenta algumas limitações que devem ser levadas em consideração em operações em grande escala. Destaca-se o fato de o metabolismo do micro-organismo gerar calor, que é removido com grande dificuldade, ao contrário dos cultivos submersos em que a grande quantidade de água presente no meio facilita o controle da temperatura.

Os processos de FES necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos (GUTIERREZ *et al.*, 1998). Para garantir o sucesso da FES, essas condições podem afetar o crescimento do micro-organismo e a formação de produtos, de modo que esses fatores devem ser controlados (PRIOR *et al.*, 1992).

Ao longo dos anos e através de diversas pesquisas com FES vários autores constataram uma série de características na utilização da técnica, demonstradas na Tabela 1, o que permite analisá-la, comparativamente, através das suas vantagens e desvantagens no processo.

Tabela 1: Características da FES quanto as suas vantagens e desvantagens. Fonte: (PALMA, 2003).

Vantagens	Desvantagens
O meio é, geralmente, simples, consistindo de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo.	FES é restrita a micro-organismos que podem crescer em níveis reduzidos de umidade, e, entretanto, a gama de produtos a ser obtida é mais restrita.
Tratamento de efluentes e disposição de resíduos é, geralmente, simples ou minimizados, pois todo o produto é utilizado, principalmente, se é intencionado o uso como suplementação alimentar de animais.	A remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano durante seu crescimento pode ser um problema, principalmente em grande escala, podendo haver perda de umidade do meio.

O custo em esterilização é reduzido, pois se aquece menos água.	A natureza sólida do substrato causa problemas no monitoramento dos parâmetros do processo.
Redução ou eliminação do capital e custos de operação para a agitação, desde que a agitação ocasional seja suficiente.	A medida da biomassa, parâmetro fundamental para a caracterização do crescimento microbiano, torna-se praticamente impossível de ser medida diretamente em cultivo sólido, pois o micro-organismo amarra-se no interior das partículas do substrato, e os métodos indiretos são de confiabilidade questionável.
A baixa umidade requerida neste tipo de fermentação reduz o risco de contaminação.	A transferência de massa na fase sólida é limitada à difusão.
A aeração é facilitada pelos espaços entre as partículas do substrato.	O tempo de cultivo é relativamente mais longo da FES devido à taxa de crescimento específico dos micro-organismos serem mais baixa.

2.2.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A FES

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto.

Segundo Del Bianchi *et al* (2001) e Pandey (2002) o controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Dessa forma pode afirmar que a observação desses fatores e o trato correto em relação a cada um deles com certeza trará um melhor resultado ao processo de fermentação em estado sólido.

2.2.1.1. Umidade

A água representa um papel primordial na FES, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular (PANDEY, 2003).

Como a quantidade de água é sempre limitada, ao contrário do processo submerso onde há um grande excesso, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo

em estado sólido. O teor de umidade adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (DESCHAMPS *et al.*, 1985).

De acordo com Pandey (1992), durante um cultivo em estado sólido com fungos filamentosos, altas atividades de água favorecem a esporulação, enquanto que as baixas atividades há o favorecimento do crescimento micelial ou da germinação dos esporos.

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de trocas gasosas. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE *et al.*, 1985).

A umidade nos processos de FES geralmente varia entre 30 e 85%. A umidade ótima para o cultivo do micro-organismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água. Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger* em arroz é de 40%, entretanto, para polpa de café é de 80%. Isto ilustra a insegurança de usar a umidade como parâmetro do crescimento do micro-organismo (DOELLE *et al.*, 1992).

Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

Para cada espécie de micro-organismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, as enzimas (Narahara *et al.* 1982).

De acordo com Correia (2004), o preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais. A adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo.

Na fermentação em estado sólido, o micro-organismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. Uma pequena flutuação nos valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e metabolismo dos micro-organismos (ANDRADE, 1999).

2.2.1.2. Temperatura

Os processos fermentativos em estado sólido caracterizam-se por serem exotérmicos, uma vez que grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente na germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em

todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado (PINTO, 2003).

Sato e Sudo (1999) reportam que a temperatura afeta tanto o crescimento quanto a produção das enzimas, sendo necessária uma eficiente remoção de calor. Nesse sentido, Bianchi *et al.* (2001) complementam que devido as atividades metabólicas dos micro-organismos, e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo em estado sólido. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos micro-organismos e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado para que o aumento da temperatura não prejudique o processo.

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos dependendo dos parâmetros de controle do sistema. Nesse caso podem ser formadas zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, que afetam negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (PALMA, 2003).

2.2.1.3. pH

No que se refere ao pH nas fermentações sólidas, para os micro-organismos, aceita-se que exista um amplo limite de variação, que difere do pH para o crescimento microbiano e o pH para formação do produto, porém, deve-se levar em conta que o pH apresenta significativos efeitos sobre os resultados de um processo fermentativo, tanto submerso como em estado sólido (PANDEY, 2003). Lonsane *et al* (1985) mencionam que em cultivos em estado sólido, o monitoramento e o controle desta variável geralmente não são feitos, devido as dificuldades técnicas, e este problema muitas vezes é evitado com o uso de substratos com elevada capacidade tamponante.

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio (PANDEY, 2003).

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada micro-organismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 6,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5 – 7,0). O

pH do meio afeta o metabolismo dos micro-organismos por alterar sua produção enzimática. Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro durante a FES, não é fácil de ser realizado (PERAZZO NETO, 1999; PANDEY, 2003).

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos microambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003).

O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do micro-organismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou lático, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio causa o aumento do pH. A utilização de fonte de nitrogênio causa variação de pH, como exemplo os sais de amônia o pH geralmente decresce durante o crescimento celular, devido a formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia (DOELLE *et al.*, 2002).

2.3. MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS NA FES

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos, e, contudo, são os fungos filamentosos, os micro-organismos mais adaptáveis a este tipo de processo. Os fungos são capazes de crescer em baixos valores de atividade de água e altas pressões osmóticas. O próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os micro-organismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelo micro-organismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (PINTO, 2003).

A seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES (PANDEY, 1992). Eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio. Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto e apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico, ser patogênicos, exigir condições de processo muito complexas a exigir meio de

cultura dispendiosos (SCHMIDELL, 2001). Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais utilizados nos processos no estado sólido, devido, principalmente, à grande capacidade de crescer na ausência de água livre e apresentarem versatilidade em suas aplicações, além de sua facilidade de adaptação e manipulação (COSTA, 1996). Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZE, 2004). Ward (1989) salienta que os micro-organismos que crescem bem nas fermentações sólidas são geralmente organismos que podem tolerar uma atividade de água (a_w) baixa. Os micro-organismos possuem respostas distintas frente à atividade de água, de forma que quando a a_w é inferior a 0,95, o crescimento bacteriano é inibido, enquanto os fungos e leveduras podem crescer a uma a_w de aproximadamente 0,7.

A amilase pode ser produzida por 28 tipos diferentes de culturas microbianas. O *Aspergillus niger*, por exemplo, tem a capacidade de produzir diferentes tipos de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato.

Os fungos filamentosos microscópicos são predominantemente pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução sexuada e/ou assexuada. Sua estrutura morfológica fundamental é a hifa, que pode ser uni ou multinucleada septada ou cenocítica, sendo que o seu conjunto constitui o que denominamos de micélio. Seus esporos ou conídios, estruturas reprodutivas de origem sexuada ou assexuada respectivamente, são oriundos da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos podendo ser endógenos ou exógenos (LACAZ, 1992).

A reprodução dos fungos filamentosos pode acontecer pelos esporos, que são germinados, formando estruturas filamentosas chamadas hifas, cujo crescimento é limitado na sua porção terminal. É importante ressaltar que, um mesmo micélio, formado pelo conjunto das hifas, apresenta diferentes estágios fisiológicos, uma vez que as hifas próximas à extremidade, que apresentam crescimento, são mais jovens que as demais, localizadas no interior do micélio, onde não se detecta crescimento. Como as hifas de extremidade são proporcionalmente muito menores em relação à fração interna do micélio, pode-se dizer que a proporção de biomassa nova em relação à massa total diminui com o avanço da cultura (PANDEY, 2002).

O crescimento dos fungos filamentosos em FES é apresentado por dois tipos de hifas (Figura 6), assim denominadas: 1) hifas aéreas; 2) hifas penetrativas. As hifas aéreas aparecem sobre a interface ar-líquido e as hifas penetrativas estão em contato direto com o substrato. As hifas penetrativas podem desempenhar um importante papel na disponibilidade do substrato, pois, na maioria das vezes, estes são polímeros insolúveis em água que precisam ser degradados em frações monoméricas, solúveis em água, para serem, então, consumidos pelos fungos. Portanto, esta degradação enzimática do substrato, pela fração penetrativa das hifas, é um fator

determinante para o processo, pois, a partir daí, os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados, pela ação de outras enzimas, em compostos metabolizáveis.

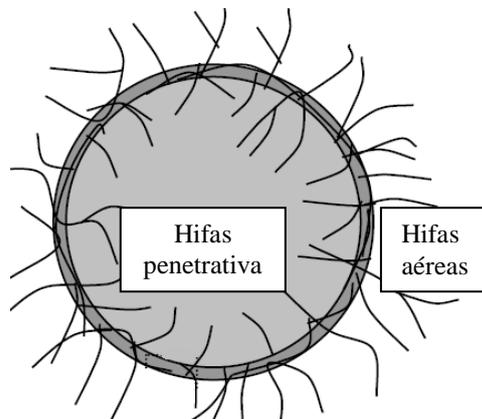


Figura 6: Hifas penetrativas e aéreas. Fonte: Mitchell *et al.*, 2006b

Segundo Conney (1981), o crescimento de um micro-organismo, assim como a formação de um produto, ocorre como resposta às condições ambientais, e deste modo é essencial a compreensão da relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico.

A temperatura para o crescimento dos fungos fica entre 0°C e 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20°C e 30°C. O pH em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies (PUTZKE, 2004).

2.3.1. *Aspergillus*

Espécies do gênero *Aspergillus* formam o grupo mais importante de micro-organismos utilizados para produção de enzimas empregadas na indústria alimentícia. Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem esse gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície sólida, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Muitas das espécies de *Aspergillus niger* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem e para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas (ROSA *et al.*, 2002).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas a amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com

conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídeos (ROSA *et al.*, 2002).

Conforme Wainwright (1995) existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*.

As estruturas morfológicas são características importantes para a sua classificação. As espécies pertencentes a este grupo produzem tipicamente o “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, que consiste de uma haste (estípede) asseptado que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídeos com diferentes pigmentações e ornamentações. Uma cabeça aspergillar simples (uniseriada) é formada por uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídeos. Quando se diz que a cabeça aspergillar é bisseriada, é porque, antes da camada de fiálides, esta apresenta uma camada de células que as geraram, chamadas de métulas. A anatomia da cabeça aspergillar, forma da estrutura anamórfica que caracteriza o gênero esta apresentada na Figura 7. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estípede) e a célula pé, é chamada de conidióforo (WAINWRIGHT, 1995).

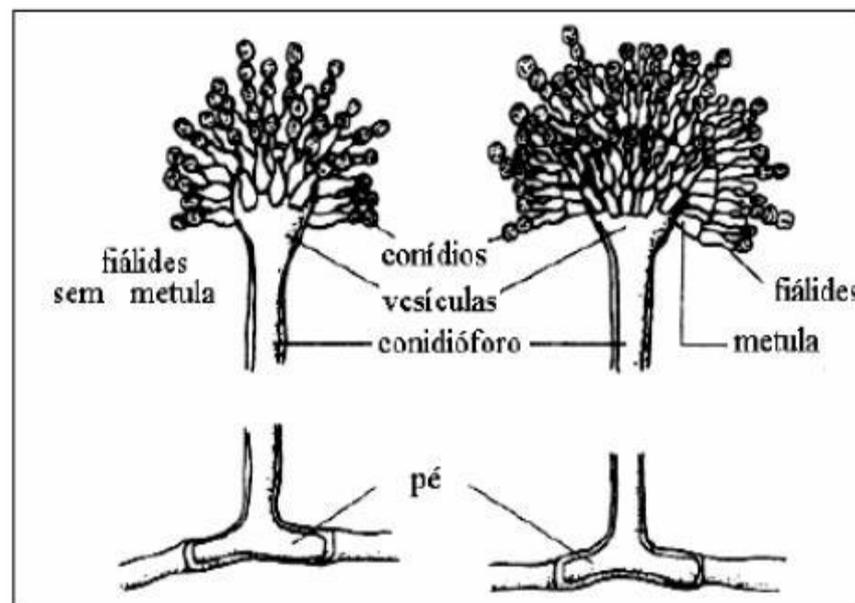


Figura 7: Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*. Fonte: Rosa *et al.*, 2002

O *Aspergillus niger* (Figuras 8 e 9), como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). Caracteriza-se por

colônia de 4-5 cm de diâmetro, quando desenvolvida em agár Czapek a 25°C por 7 dias. Consiste de uma base compacta branca ou amarela, com uma densa camada de conidióforos marrom escuro ou preta. A cabeça tem forma radiada, preta, e composta de cadeias de conídeos que tendem a se dividir com a idade. Os conidióforos são formados por estípede liso hialino, também de coloração marrom, vesículas globulares com 50-100 µm de diâmetro, fialides ou métula com 7,0-9,5 µm x 3-4 µm, métulas hialina ou marrom, muitas vezes septada com 15-25 x 4,5-6,0 µm, conídia globular com 3,5-5 µm de diâmetro, marrom, ornamentadas com verrugas, lombadas e cume. Tem como importante metabólito tóxico naphtho-T-pyrones, malformins (SAMSON *et al.*, 1995).

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005).

A variedade de fungo *Aspergillus* empregado em fermentação em estado sólido, apresenta como característica relevante o fato de ser de grau alimentar, ou seja, seguro do ponto de vista alimentar.

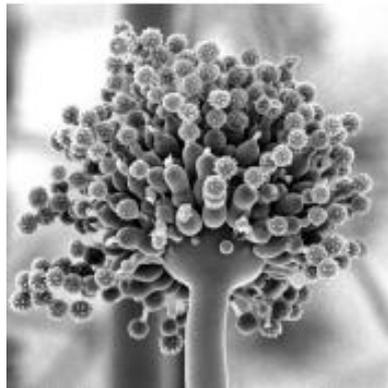


Figura 8: *Aspergillus niger*. Fonte: Amorim, 2011

Pandey *et al* (1999) relataram que o *Aspergillus niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, amilase, glucoamilase, poligalacturonase. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação.

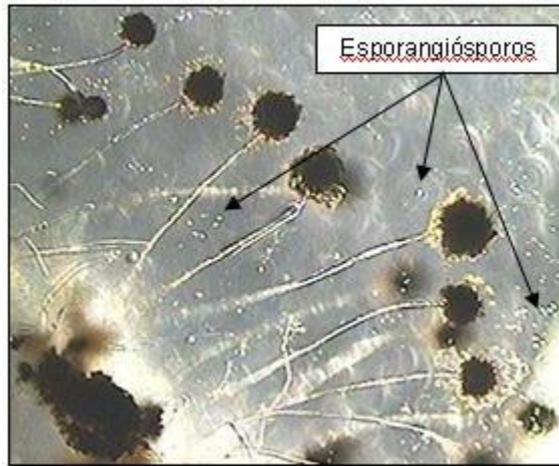


Figura 9: Imagem do *Aspergillus niger* vista ao microscópio óptico. Fonte: Spier, 2005

2.3.2. *Rhizopus sp.*

O prefixo “rhizo” é pertinente as raízes, o sufixo “pus” deve-se aos rizóides da base dos esporangiosporos ou das hifas que são característicos de algumas espécies desse gênero.

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

Os *Rhizopus sp.* também podem ser fungos infecciosos oportunistas que podem infectar em conjunto com *Aspergillus fumigatos*. Um estudo de infecções, em pacientes renais transplantados, contaminados por *Aspergillus fumigatos*, *Rhizopus spp.* e outros fungos apresentaram alto índice de mortandade (75%) (ALTIPARMAK *et al.*, 2002). Sua proliferação, dentro das condições que lhe são propícias, ocorre amplamente pela facilidade de produzir esporos.

Estudos demonstraram que o fungo do gênero *Rhizopus sp.* é utilizado para a produção de enzimas, como a amiloglucosidase (SOCCOL, 1992; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996), proteases ácidas, pectinases e lípases (WAINWRIGHT, 1995); ácido L(+) láctico (SOCCOL, 1992), ácido fumárico (SOCCOL, 1992).

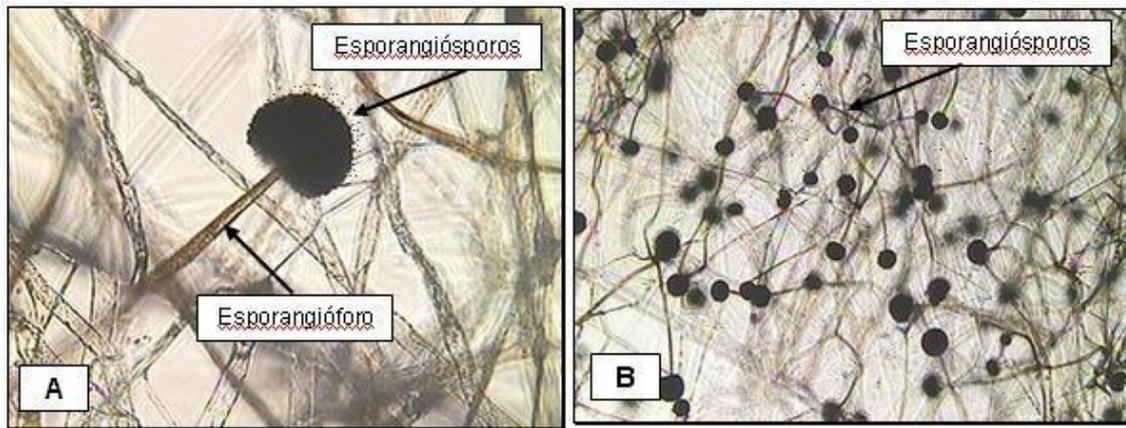


Figura 10: Imagem de esporângios do fungo *Rhizopus sp.* visto ao microscópio óptico. Fonte: Spier, 2005

2.4. ENZIMAS

Provavelmente, a primeira utilização de uma enzima pelo homem foi pela adição do extrato do estômago do bezerro para coagular o leite, a fim de se obter queijo. Foi também uma protease que pela primeira vez foi imobilizada, conforme registra Plínio, filósofo grego, ao descrever como um soldado romano usava um bastão de figueira para agitar e eventualmente coagular o leite. Os fermentos para pão, vinho e cerveja, o coalho para queijo e a “mãe do vinagre” são outros exemplos da utilização desses catalisadores biológicos, manipulados até a metade do século XIX. A aplicação das enzimas amilolíticas fúngicas ganhou impulso sob o estímulo da Segunda Guerra Mundial, permitindo a fabricação de vários tipos de xaropes, além do malte de cereais. A introdução de enzimas amilolíticas fúngicas para aplicação na panificação ocorreu no início de 1950, enquanto o emprego dessas enzimas nas destilarias de álcool também foi revivido durante a Segunda Grande Guerra em virtude da necessidade de abastecimento daquele combustível (ROITMAM *et al.*, 1988).

Atualmente, o uso de complexos enzimáticos produzidos naturalmente pelo processo da FES está revolucionando o aproveitamento e disponibilidade do alimento balanceado na indústria de alimentação animal. Cada vez mais fica comprovado que o uso destes complexos é fundamental para seguir o conceito evolutivo da indústria, que envolve a redução de custos e a melhora dos parâmetros produtivos dos animais (PANDEY, 2002).

As enzimas são compostos orgânicos, produzidos por células vivas, que catalisam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar de forma independente se condições apropriadas forem mantidas. Todas as enzimas são basicamente proteínas, embora muitas possuam um grupo prostético não protéico. Uma das principais características das enzimas é sua especificidade sobre o substrato, agindo sobre um número muito limitado de compostos e sem efeito sobre os outros (SANT’ANA JR, 2001).

Em biotecnologia, as enzimas são de extrema importância e a maioria delas provém de micro-organismos. O mercado mundial de enzimas é grande, sendo que essas enzimas são produzidas por micro-organismos que foram selecionados na natureza e, geralmente, modificados geneticamente para uma produção mais eficiente e para atuar em processos que possam ser realizados em temperaturas mais elevadas ou em outras condições de estresse (SERAFINI *et al.*, 2001).

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. O desenvolvimento do processo de produção de enzima, em escala industrial, de qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem, o meio de produção, o processo de fermentação, os métodos de recuperação e a demanda de mercado (BON, 2002; MITIDIARI *et al.*, 2002).

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

A indústria da bioconversão é responsável pela demanda de quatro principais enzimas que são: a protease, a amiloglucosidase, a α -amilase e a glicose-isomerase. Essas enzimas são compostos de natureza protéica que possuem capacidade única de catalisar as numerosas reações bioquímicas que ocorrem em organismos vivos. A singularidade desses compostos decorre de alto grau de especificidade ao substrato em que atuam (ROITMAN *et al.*, 1988).

As vantagens da produção de proteínas microbianas a partir dos resíduos agroindustriais são de interesse, com base nas seguintes considerações: o tempo de geração dos micro-organismos é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular; o conteúdo de proteína dos micro-organismos é geralmente mais elevado que a maioria dos vegetais; sua produção independente é mais acessível; exigem pequena disponibilidade de água e espaço e a diversificação de substratos utilizáveis, principalmente os resíduos agroindustriais, contribuindo para minimizar os problemas de perda na industrialização das frutas tropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.4.1 ENZIMAS AMIOLÓTICAS

Aguero (1998) cita que o amido e a celulose são os mais abundantes polímeros encontrados na natureza dentre os quais o amido é constituído de dois compostos de elevado peso molecular, a amilose e a amilopectina. A amilose é formada por resíduos de α -D-glicose unidos por ligações α -1,4, e a amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, na qual os resíduos de α -D-glicose unidos por ligações α -1,4 são interconectadas por ligações α -1,6. O conteúdo desses dois polímeros varia com a fonte de amido.

Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. As enzimas que degradam o amido também são empregadas na obtenção de açúcares fermentescíveis utilizados nas indústrias cervejeiras, na produção de bebidas alcoólicas e na modificação de farinhas empregadas em panificação (WARD, 1989).

As amilases começaram a ser produzidas no começo do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. O pesquisador TAKAMINE (1994) desenvolveu o primeiro método para produção microbiana, em grande escala, da enzima α -amilase fúngica, denominada Takadiastase, citado por SOCCOL *et al.* (2005). Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados.

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

Outro conceito dado por Gupta *et al* (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases (α -amilases) catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases (glucoamilase) hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido. As enzimas responsáveis pela degradação do amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas, as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do

substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975).

Para a conversão eficiente do amido em compostos de baixa massa molecular, é necessária uma ação coordenada das enzimas citadas anteriormente. Essas enzimas serão descritas a seguir em relação a sua especificidade.

Costa (1996) apresenta um esquema (Figura 11) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

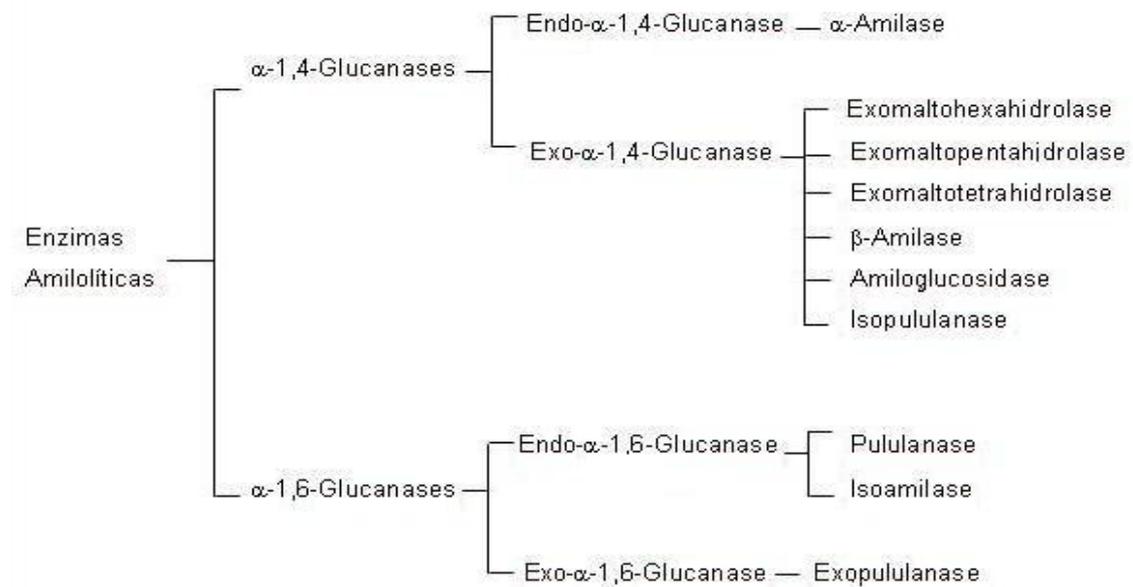


Figura 11: Classificação das enzimas amilolíticas. Fonte: Costa, 1996

As amilases têm grande importância em biotecnologia, apresentando largo campo de aplicação. Enzimas amilolíticas são utilizadas na indústria de panificação para dar a estes produtos um volume maior, cor melhor e maciez. Na produção de glicose e frutose, as amilases são usadas para hidrolisar as moléculas de amido. Nas indústrias de papel, utilizando-se amilases para proteção do papel contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final.

Amilases também têm sido utilizadas em alimentos para bebês e adicionadas aos cereais para baixar sua viscosidade e em fábricas de cervejas para produzir cerveja clara (NOROUZIAN *et al.*, 2006; SPIER *et al.*, 2005). HANSEN *et al.* (1994) citam o uso da amiloglicosidase para fabricação de sorbitol um edulcorante utilizado para diabéticos. As amiloglicosidases são glicoproteínas secretadas usualmente com diferentes pesos moleculares (HEIMO *et al.*, 1997).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido, que contém dois tipos de polissacarídeos: amilose

(15-20%), que é linear, e amilopectina (80-85%), que é ramificada, estão presentes nos grânulos na forma associada (LEHNINGER *et al.*, 2002; HARGER, 1982).

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

A amilopectina é um polissacarídeo ramificado; na sua molécula, cadeias mais curtas de glicose unidas por ligações α -1,4 são também unidas entre si por ligações α -1,6 (das quais se podem obter a isomaltose). A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. Desse modo, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original – denominado dextrina limite – é o produto dessas enzimas. Uma outra enzima, a α -1,6 glucosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glicose e maltose (CONN; STUMPF, 1975). A Figura 12 mostra uma representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas sobre uma molécula de amido, que é considerada molécula polissacarídica.

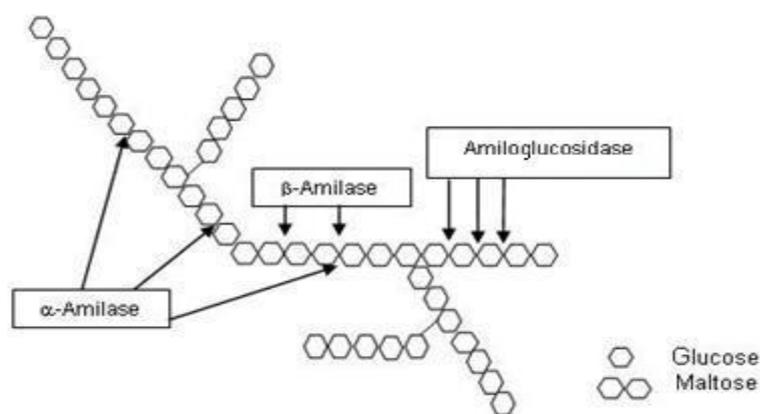


Figura 12: Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas. Fonte: Spier, 2005

O sucesso comercial de amilases está ligado à utilização de biomassa amilácea crua na indústria. Para produção industrial de etanol, têm sido utilizadas várias matérias-primas como milho, trigo, arroz, sorgo e batata, as quais são produzidas em grande escala no mundo todo e seus resíduos podem ser utilizados como fontes de energia renovável (SONI *et al.*, 2003).

Deste modo, a obtenção de enzimas amilolíticas baseia-se no fato de que para que o micro-organismo cresça num meio contendo polissacarídeos como principal fonte de carbono, existe necessidade de que o mesmo converta as macromoléculas em moléculas menores. Com

este fim, o micro-organismo sintetiza carboidrases, sendo a glucoamilase uma delas (AGUERO, 1998).

2.4.1.1 α -amilase

Dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α -amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo.

Pandey *et al* (2005) definem α -amilase (1,4- α -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.) como sendo uma enzima que quebra as ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva (tipo endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose (BRUCHMANN, 1980). Após a ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. Atua, isolada ou simultaneamente, com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de sementes de cereais são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto as de origem microbiana são empregadas em processos onde é necessária a sacarificação e a liquefação do amido.

Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do amido produzindo glicose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato produzindo, predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis pela rápida redução da viscosidade do amido em comparação com as primeiras (DECLERCK *et al.*, 2000).

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

O pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0. Possui caráter ácido e é solúvel em água. Sua atividade diminui rapidamente acima de 50°C. A faixa ótima de temperatura para sua atividade é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte (REED, 1975). Miller *et al* (1953) citado por Reed (1975) estudou a estabilidade da enzima com o aumento da temperatura até 80°C. As amilases fúngicas perderam sua atividade e em 80°C somente alcançou 1% de sua atividade, enquanto nessa mesma temperatura, as amilases bacterianas

preservaram 92% de sua atividade. Moreira *et al* (1999) comentam em seu trabalho que as enzimas α -amilase e amiloglucosidase, parcialmente purificadas, exibiram máxima atividade na faixa de pH entre 4,5-6,0, apresentando grande estabilidade sob condições ácidas (pH 4,0 a 7,0). A máxima atividade ocorreu em temperaturas entre 50 e 60°C, apresentando estabilidade por mais de 10 horas a 55°C.

2.4.1.2 β -amilase

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

A β -amilase participa do processo de mobilização do amido durante a germinação das sementes de cereais. Esta é acumulada durante o processo de desenvolvimento das sementes de cevada e permanece ligada aos grânulos de amido, sendo considerada a isoforma específica do endosperma, havendo também uma isoforma ubíqua, presente em órgãos vegetativos como folhas e raízes (ZIEGLER, 1999). Em sementes de arroz, a forma específica do endosperma é ausente, ocorrendo a sua síntese na camada de aleurona durante a germinação e ao contrário do que se observa para a α -amilase, a indução da expressão e síntese "de novo" da β -amilase não estão sob controle de giberelinas (YAMAGUCHI *et al.*, 1999)

Esse tipo de enzima está distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em β -maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 a 50°C.

2.4.1.3 Glucoamilase

A glucoamilase, também conhecida como amiloglucosidase, enzima glucogênica, amido glucogenase, gama-amilase e exo-1,4- α -D-glucano glucohidrolase, EC. 3.2.1.3 conforme a "Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry". Ao contrário de α -amilase, muitas glucoamilases também são hábeis em hidrolisar as ligações α -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, embora em uma razão menor que as ligações α -1,4, fornecendo quase a degradação completa do amido em glicose (SELVAKUMAR *et al.*, 1997).

Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas, como maltose, dextrinas e glicogênio, são hidrolisadas pela enzima. Também chamadas de enzimas de sacarificação, elas são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos

períodos. Ocorrem em muitos micro-organismos, principalmente em fungos filamentosos, bactérias e trato digestivo de mamíferos (CRUZ; CIACCO, 1980).

A amiloglucosidase é, na sua maior parte, produzida por linhagem dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus sp.*, sendo que, dentre essas, a amiloglucosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável. Essa enzima catalisa eficientemente a reação de sacarificação do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura (LEMOS *et al.*, 2003).

A principal utilização da glucoamilase está na indústria de processamento de alimentos para produzir açúcares solúveis do amido (MACKENZIEA *et al.*, 2000). A glucoamilase produz xaropes com alto teor de glicose, em torno de 96 a 98% (CEPEDA *et al.*, 2001). A indústria de amido é a segunda maior consumidora de enzimas, movimentando milhões de dólares todos os anos, e a principal enzima consumida para conversão de amido em xaropes e etanol. A glucoamilase é amplamente utilizada na indústria alimentícia para a produção de xaropes com alto teor de glicose e também empregada na produção de álcool e xarope com alto teor de frutose (LEMOS *et al.*, 2003). Os mesmos autores complementam que vários micro-organismos e plantas produzem a glucoamilase, das quais a maior parte disponibilizada comercialmente é produzida por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus sp.* sendo a enzima produzida por *Aspergillus* mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas de 50-55°C sendo, entretanto, rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Produzir enzimas amilolíticas em meios de cultura alternativos (farelo de cacau, casca de mandioca e palma forrageira), através da fermentação em estado sólido.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do pH e da temperatura na produção enzimática;
- Avaliar o efeito do tempo de fermentação e do teor de água na produção de enzimas amilolíticas;
- Comparar em qual substrato ocorre à maior produção enzimática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA) na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Campus de Itapetinga-Ba. A tabela 2 mostra a relação de reagentes utilizados durante as análises.

Tabela 2: Reagentes utilizados durante as análises

PDA (Potato Dextrose Agar)	Agar-agar
Ácido dinitrosalicílico	Ácido acético glacial
Tartarato de sódio e potássio	Iodo
Fosfato de sódio dibásico	Fosfato de sódio monobásico
Hidróxido de sódio	Etanol
Amido solúvel	Iodeto de potássio
Acetato de sódio	Ácido clorídrico
Azul brilhante Coomassie	Ácido fosfórico

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Equipamentos utilizados durante o experimento

Balança analítica	Balança de umidade
Incubadora – Shaker	Câmara de Fluxo Laminar
Centrífuga	Espectrofotômetro UV/VIS
Estufa para Incubação	Moinho de Facas
Autoclave	Banho Maria
Microscópio	Secador de Bandejas

4.2 SUBSTRATO

Como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido para obtenção de amilases, foram utilizados dois resíduos, sendo eles farelo da casca de cacau, farelo da casca de mandioca e palma forrageira que serão descritos a seguir.

O farelo de cacau (Figura 13) foi adquirido por fábricas produtoras de cacau, localizadas na região Sul da Bahia. Para obtenção do farelo, a casca de cacau, foi submetida a um processo de separação granulométrica, a partir da trituração (20 mesh) em moinho de facas tipo Willey e armazenado a temperatura ambiente.



Figura 13: Farelo de cacau. Fonte: O autor

O resíduo do descascamento da mandioca (Figura 14) foi adquirido de um comerciante local da cidade de Itapetinga-Ba. O mesmo foi lavado, desidratado a 70°C em secador de bandejas e triturado em moinho de facas tipo Willey, para obtenção de uma farinha sem granulometria definida. Em seguida armazenada e conservada em vasos de polietileno à temperatura ambiente.



Figura 14: Farelo de casca de mandioca. Fonte: O autor

Assim como os rejeitos acima utilizados em fermentação em estado sólido, a palma forrageira (Figura 15) também foi utilizada nesse processo. A palma gigante foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus de Itapetinga, os cladódios da palma forrageira foram extraídos nas articulações, utilizando apenas aquelas em bom estado fitossanitário, a partir das terciárias, conforme a colheita realizada tradicionalmente na região. O processo de secagem foi efetuado na estufa com circulação de ar forçada (SOLAB) a 70°C até atingir umidade de 2%, após esse procedimento, a palma foi triturada em moinho de facas tipo Wiley (20 mesh), e armazenada em temperatura ambiente.



Figura 15: Palma forrageira. Fonte: O autor

4.3 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas cepas de fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*), pertencente ao Laboratório de Resíduos Agroindustriais - LABRA, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga.

4.4 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS E PREPARO DO INÓCULO

O repique do fungo foi feito em câmara de fluxo laminar, sendo que a obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação dos esporos da cepa de *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* utilizando meio de cultura com Agar-agar e PDA (*Potato Dextrose Agar*) em erlenmeyers de 250 mL autoclavados e incubados a 35 °C por sete dias em estufa bacteriológica (SOLAB modelo SL 101). Após esse período foi obtida a solução de esporos, pela adição de pérolas de vidro, sob agitação, e água destilada estéril ao meio. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer (Figura 16), com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/g de meio sólido.

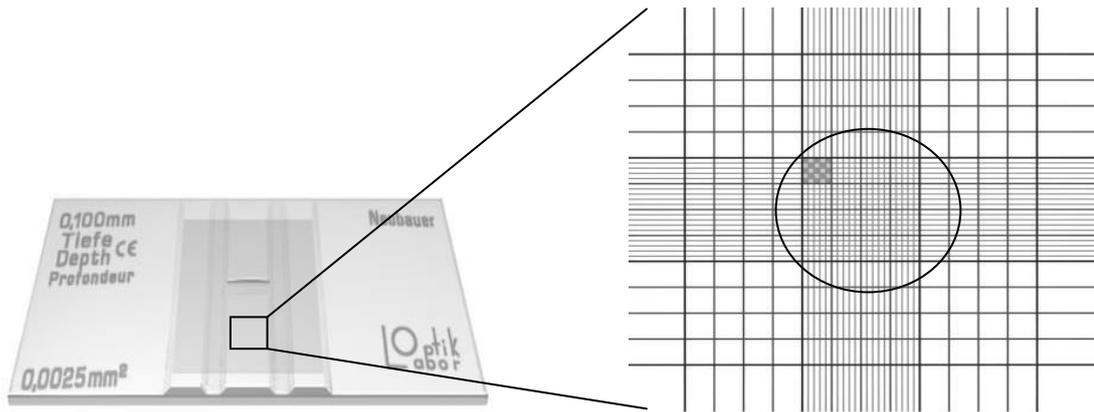


Figura 16: Câmara de Neubauer. Fonte: Barga, 2007

4.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação foi conduzida em erlemeyer de 250 mL contendo 10g de substrato. Os meios de cultivo utilizados foram farelo de cacau, farinha da casca de mandioca e palma forrageira. As fermentações ocorreram em três diferentes tempos (24, 72 e 120 horas), três temperaturas (25°C, 30°C e 35°C) e em três umidades diferentes para cada substrato. Todos os erlemeyeres foram autoclavados a 1,0 atm por 15 minutos e após o resfriamento, inoculava-se a suspensão de esporos (Figura 17). A amostragem foi determinada nos tempos e temperaturas acima. Água destilada foi adicionada ao resíduo seco de maneira a se obter aproximadamente as seguintes concentrações em base úmida (UBU): para o farelo de cacau as umidades foram (55%, 60% e 65%), a casca de mandioca (45%, 55% e 65%) e a palma (50%, 60% e 70%).



Figura 17: Fermentação em estado sólido. Fonte: O autor

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, foram separadas 10 g de amostra a qual foi misturada a 100 mL de água destilada. Essa suspensão permaneceu sob agitação contínua em

shaker de bancada durante 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração para remoção dos sólidos. O extrato obtido foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos (Centrífuga CentriBio 310) e o sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e a atividade enzimática.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA

A atividade amilolítica foi determinada utilizando amido como substrato, denominado de método sacarificante, baseia-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959).

4.7.1 Atividade amilolítica sacarificante

A partir do extrato foram feitas as determinações de atividade amilolítica inoculando 1 mL de extrato enzimático em 1 mL de solução de amido 1% 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 570 nm usando solução de glicose como padrão (MILLER, 1959). A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 1 mL de água destilada substituíu a amostra, seguindo o mesmo procedimento. Uma unidade de atividade enzimática corresponde á quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições do método proposto (ALVA *et al.*, 2007).

4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS – BRADFORD

A determinação de proteínas do extrato enzimático foi feita pelo Método de Bradford (GODOY, 2009), que dosa proteínas solúveis.

Preparo do reagente: foram utilizados 50 g do de Azul Brillhante Coomassie (G-250), 25 ml de etanol (95%), 50 ml de ácido fosfórico (85%) e água destilada. O azul brilhante foi solubilizado no etanol, com auxílio de agitador magnético. Em seguida foi adicionado o ácido fosfórico, e posteriormente o volume do balão foi completado e o mesmo foi enrolado no papel alumínio. A solução tampão usada foi fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0).

Preparo das soluções-padrão de BSA: Pesou a quantidade de BSA (albumina de soro bovino) adequada para a maior concentração e foram solubilizadas na solução tampão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ($\lambda = 595$ nm).

4.9 DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS E AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE

O efeito do pH na atividade da amilase foi determinada pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS), denominado de atividade sacarificante, baseado na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). Pelas variações de pH, faz-se necessário investigar a atividade da enzima nos diferentes intervalos de pH, mostrando, portanto, a ação da enzima na simulação das diferentes concentrações hidrogeniônicas (4, 6, 7, 8) (CRUZ *et al.*, 2011).

A temperatura ótima foi determinada incubando-se 1 mL do extrato enzimático em 1 mL de solução de amido 1% em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0. A atividade amilolítica foi realizada incubando as amostras nas temperaturas de 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 95°C (CARVALHO *et al.*, 2008). Em seguida foi feita a leitura através da técnica do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

Na avaliação da termoestabilidade das enzimas, os ensaios foram realizados na temperatura e pH ótimos, previamente determinados. Durante 1 hora, em intervalos pré-definidos a reação foi interrompida com a adição de DNS e procedida à análise como no item 4.7.1.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} adicional de 4 repetições no ponto central foi implementado a fim de avaliar a influência da temperatura, teor de água e tempo de fermentação sobre a atividade enzimática da amilase. Os valores dos níveis das variáveis estudadas estão apresentados na tabela 4. Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e os efeitos foram considerados significativos para $p < 0,07$.

A partir dos resultados da ANOVA para os experimentos do fatorial fracionado, um primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) foi usado para otimizar ou verificar uma tendência de otimização do processo enzimático.

Tabela 4: Valores codificados e valores “reais” para cada fator em estudo

Ensaio	Planejamento fatorial em Valores codificados			Planejamento fatorial em Valores reais				
	Tempo (X ₁ , h)	Temperatura (X ₂ , °C)	Teor de água (X ₃ , %m/m)	Tempo (X ₁ , h)	Temperatura (X ₂ , °C)	Teor de água do cacau (X ₃ , %m/m)	Teor de água da mandioca (X ₃ , %m/m)	Teor de água da palma (X ₃ , %m/m)
	1	-1	-1	-1	24	25	55	45
2	-1	+1	-1	24	35	55	45	50
3	+1	-1	-1	120	25	55	45	50
4	+1	+1	-1	120	35	55	45	50
5	-1	-1	+1	24	25	65	65	70
6	-1	+1	+1	24	35	65	65	70
7	+1	-1	+1	120	25	65	65	70
8	+1	+1	+1	120	35	65	65	70
9	0	0	-1	72	30	55	45	50
10	0	0	+1	72	30	65	65	70
11	-1	0	0	24	30	60	55	60
12	+1	0	0	120	30	60	55	60
13	0	-1	0	72	25	60	55	60
14	0	+1	0	72	35	60	55	60
15	0	0	0	72	30	60	55	60
16	0	0	0	72	30	60	55	60
17	0	0	0	72	30	60	55	60
18	0	0	0	72	30	60	55	60

Os efeitos significativos foram estudados em dois níveis, com quatro repetições no ponto central, que foram utilizados para avaliar o erro experimental e da adequação do modelo proposto. Para cada uma das variáveis independentes estudadas, maior valor (valor codificado: +1) e menor valor (valor codificado: -1), os pontos definidos foram selecionados de acordo com os resultados obtidos a partir de planejamento fatorial fracionado.

Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. 1) foram ajustados os dados experimentais e os coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (\text{Eq. 1})$$

A partir dos resultados deste DCCR, foi instalado um novo DCCR com novos valores para as variáveis a fim de otimizar o processo. As variáveis utilizadas neste novo delineamento foram às mesmas do primeiro DCCR, porém com valores que tendiam para a região de ótimo. Nos dois delineamentos Composto Central Rotacional, os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análises de variância e de regressão, considerando-se a falta de ajuste, a significância dos parâmetros e o coeficiente de regressão. Por meio da análise da metodologia de superfície de resposta, determinaram-se as melhores condições de extração das proteínas nos intervalos de condições experimentais utilizados.

Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico *Statistical Analysis System*® versão 9.0, procedimento RSREG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fim de avaliar os fatores que mais influenciaram na ação enzimática da amilase, uma ANOVA (Tabela 5) com parâmetros de análise de estimativa foram conduzidos com fatorial 2^{3-1} fracionários.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para os modelos e o grau de significância foi analisado através do teste estatístico de Fisher (teste-F) aplicado as diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a regressão, a falta de ajuste e o coeficiente de determinação múltipla. Uma vez que os modelos de segunda ordem não foram aceitos pelos testes mencionados, os mesmos foram melhorados até que as condições determinadas fossem cumpridas. Os fatores que não tiveram significância de 7% foram então agrupados no termo de erro e um novo modelo reduzido foi obtido para as variáveis através da regressão múltipla utilizando o fator significativo listados anteriormente.

Tabela 5: ANOVA para o modelo quadrático da superfície de resposta para a produção de enzimas amilolíticas.

Fonte	GL	SS	QM	F	P > F
Modelo	6	5605286	934214	6,22	0,0046
Falta de Ajuste	11	1652437	150222		
Erro Puro	3	10828,991	3609,6664		

Total	17	7257723			
CV	38,22442				
R ²	0,7723				

Fonte	GL	SS	QM	F	P > F
Modelo	3	3204667	1068222	11,19	0,0005
Falta de Ajuste	11	1336204	95443		
Erro Puro	3	131006,300	43668,767		
Total	17	4540871			
CV	42,74906				
R ²	0,7057				

Fonte	GL	SS	QM	F	P > F
Modelo	4	3472428	868107	9,88	0,0007
Falta de Ajuste	13	1142427	87879		
Erro Puro	3	89860,913	29953,638		
Total	17	4614855			
CV	35,35740				
R ²	0,7524				

Fonte	GL	SS	QM	F	P > F
Modelo	6	231615	38602	3,49	0,0350
Falta de Ajuste	11	121737	11067		
Erro Puro	3	6175,0813	2058,3604		
Total	17	353351			
CV	39,05395				
R ²	0,6555				

Fonte	GL	SS	QM	F	P > F
Modelo	5	644193	128839	8,77	0,0011
Falta de Ajuste	12	176383	14699		
Erro Puro	3	32513,6646	10837,8882		
Total	17	820576			
CV	26,35546				
R ²	0,7850				

Os modelos reduzidos podem ser descritos pelas equações (2), (3), (4), (5) e (6), em termos de valores não codificados.

$$AC_1 = 78390 + 26.65827 X_1 - 553.57778 X_2 - 2428.26390 X_3 + 18.06612 X_3^2 - 1.16747 X_1 X_2 + 11.24470 X_2 X_3 \quad (\text{Eq.2})$$

$$AC_2 = -5125.00810 + 59.36172 X_1 + 205.38562 X_2 - 2.12404 X_1 X_2 \quad (\text{Eq.3})$$

$$AC_3 = 18589 - 48.47454 X_1 - 551.58960 X_3 + 4.17446 X_3^3 + 0.81237 X_1 X_3 \quad (\text{Eq.4})$$

$$AC_4 = -1829.95122 - 10.19683 X_1 + 185.36500 X_2 - 20.05758 X_3 + 0.06450 X_1^2 - 4.15817 X_2^2 + 1.03287 X_2 X_3 \quad (\text{Eq.5})$$

$$AC_5 = 3482.82545 - 1.97974 X_1 + 87.91564 X_2 - 146.65879 X_3 + 1.80442 X_3^2 - 1.84132 X_2 X_3 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde, AC₁, AC₂, AC₃, AC₄ e AC₅ são respectivamente as atividades enzimáticas do farelo de cacau fermentado com *A. niger*, farelo de cacau fermentado com *Rhizopus sp.*, casca de mandioca fermentada com *Rhizopus sp.*, palma fermentada com *A. niger* e palma fermentada com *Rhizopus sp.*

Usando o método de superfície de resposta (MSR), com o valor da temperatura fixa nas condições ideais, as relações entre os fatores e a resposta pode ser melhor compreendida mostrando que o conteúdo de água e o tempo afetam o comportamento dos ativos enzimáticos. Com os dados obtidos a partir do gráfico de superfície de resposta, usando um valor ideal para a temperatura, uma atividade enzimática pode ser observada a partir do conteúdo de água e do tempo de fermentação.

A produção de enzimas é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Conforme KOLICHESKI (1995) citada por PRADO (2002), algumas cepas de *A. niger* produzem enzimas

que são capazes de hidrolisar o amido liberando glicose. Outros autores também afirmam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer a indução da produção de amilases por fungos, leveduras e bactérias (FELLOWS, 1994; PANDEY *et al.*, 1999 e GUPTA *et al.*, 2003). Os micro-organismos não assimilam diretamente moléculas complexas como é o caso do amido, um polissacarídeo. Não havendo outro componente assimilável no meio, o micro-organismo passa a sintetizar aquelas enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples - neste caso as amilases - para que estas convertam o amido (fécula) em açúcares assimiláveis garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo.

Dentre as cepas estudadas, *Rhizopus sp.* e *Aspergillus niger*, todas elas apresentaram crescimento no meio, sendo que os melhores resultados foram evidenciados com o fungo filamentososo *Aspergillus niger*.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE COM O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus niger*

Observa-se na figura 18 (a) que, para o farelo de cacau, o tempo não foi significativo para a produção da enzima, e os fatores temperatura e umidade foram considerados significativos para a produção enzimática. Para a palma forrageira, figura 18 (b), a umidade não foi considerada um fator significativo para a produção enzimática, enquanto que a temperatura e o tempo foram sim considerados fatores significativos para a produção de amilase.

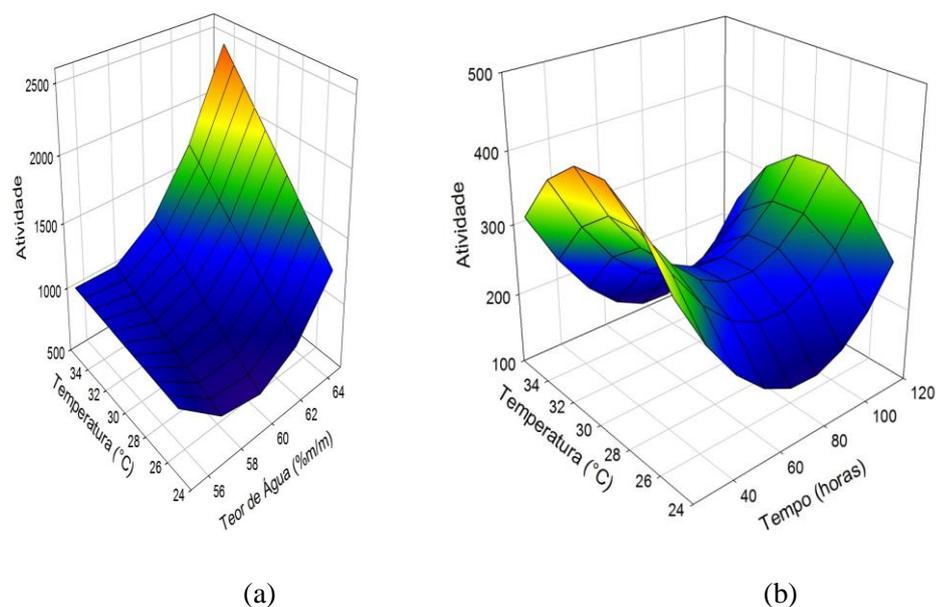


Figura 18: Produção de amilase no farelo de cacau (a) e na palma forrageira (b)

Na figura 18 (a) a maior produção enzimática ocorreu numa temperatura de 35°C. Palacios-Cabrera *et al.*, 2005 relatam que o crescimento de *A. niger* não é afetado em temperaturas de 25 a 35°C, temperatura essa considerada ótima para o desenvolvimento desses micro-organismos.

A umidade considerada significativa para a maior produção enzimática nesse resíduo foi de 65%, devido a maior afinidade dos fungos filamentosos por baixos valores de umidade. Estudos relatam que o crescimento de *Aspergillus niger* não é afetado por baixas atividades de água (CRUZ *et al.*, 2011). Os fungos filamentosos são micro-organismos capazes de crescer na ausência de água livre (COSTA, 1996).

Para a palma forrageira, figura 18 (b), além da temperatura de 35°C, temperatura ótima para o crescimento de fungos filamentosos, o tempo também influenciou de forma significativa a produção enzimática, sendo a maior produção amilolítica obtida em 24 horas de fermentação.

Valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares simples (WHITAKER, 1994). Enzimas geralmente apresentam mecanismos de controle de expressão que podem ser estimulados ou inibidos por produtos do meio. Os produtos finais de cada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback* negativo ou autoalimentação (WHITAKER, 1994).

A menor produção enzimática na palma forrageira foi obtida em 72 horas de fermentação, esse fato pode está relacionado com a inibição do fungo marcado pela extrapolação do nível do teor de água ideal, o que promove inibição na excreção enzimática, reduzindo a atividade de amilase (DANTAS, 2002).

Shaktimay *et al.*, 2010 afirmam que acima de 60% de capacidade de retenção de umidade houve decréscimo da atividade amilolítica termoestável de *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cultivada em FES utilizando resíduo fibroso de mandioca. O declínio pode ser atribuído a menor porosidade, baixa transferência de oxigênio e aeração e adsorção da enzima nas partículas do substrato.

Kunamneni *et al.* 2005 encontraram maior atividade de amilase de *Thermomyces lanuginosus* em 120 horas de fermentação em umidade inicial para o substrato de 90%. Teores de umidade acima de 80% podem levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica.

Comparando os valores obtidos em ambos os meios de cultura, é possível verificar maior produção enzimática no farelo de cacau, tendo o mesmo apresentado maiores atividade enzimáticas.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE COM O FUNGO FILAMENTOSO *Rhizopus sp*

Observa-se na figura 19, que a umidade não foi significativa na produção enzimática do farelo de cacau. O tempo de fermentação e a temperatura influenciaram significativamente na produção de enzimas.

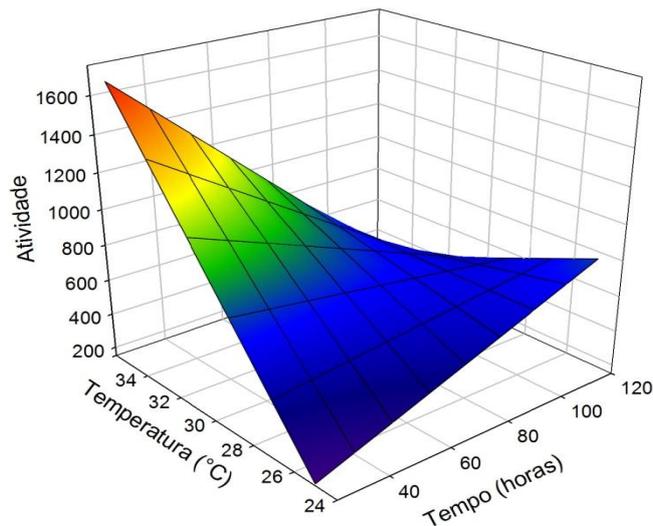


Figura 19: Produção de amilase no farelo de cacau

A maior produção enzimática foi obtida em 24 horas de fermentação a 35 °C. Palácios-Cabrera *et al.*, 2005 relatam que o crescimento de fungos filamentosos não é afetado em temperaturas de 25 a 35 °C. A temperatura afeta a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos micro-organismos e a formação do produto, por isso temperaturas elevadas acabam prejudicando o processo (BIANCHI *et al.*, 2001).

Em relação ao tempo, valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para a geração de açúcares simples (WHITAKER, 1994).

Para a palma forrageira, o tempo de fermentação não influenciou na produção enzimática como mostra a figura 20.

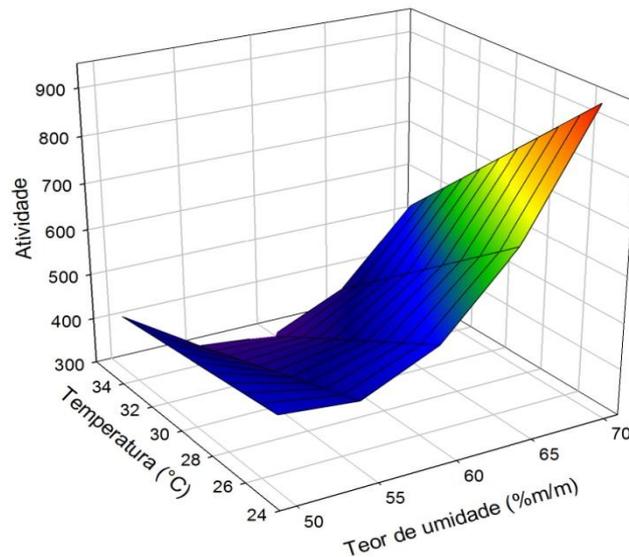


Figura 20: Produção de amilase na palma forrageira

A temperatura e a umidade influenciaram significativamente na produção de amilase. O conteúdo de água é um fator muito importante no processo de fermentação. A maior produção enzimática ocorreu a 25 °C com 70% de umidade, o que se pode notar que esse teor de água adicionada foi ideal para a obtenção enzimática. A otimização realizada foi necessária para o ajuste de produção da enzima. Umidades elevadas provocam a diminuição da porosidade do substrato, reduzindo assim a troca de gases, por outro lado baixas quantidades de água podem resultar na redução do crescimento microbiano (SANTOS *et al.*, 2011).

A menor produção enzimática produzida na palma forrageira foi em 120 horas de fermentação. O decréscimo na atividade da enzima com o aumento do tempo de incubação pode ser devido à produção de coprodutos resultante do metabolismo microbiano, além da formação de metabólitos secundários e o esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima (GUPTA *et al.*, 2010; SHAFIQUE *et al.*, 2009). O declínio na produção de enzimas pode também ser atribuído a menor porosidade, baixa transferência de oxigênio e aeração, e adsorção da enzima nas partículas do substrato (DALSENTER, 2005).

Para a casca de mandioca a temperatura foi um fator que não influenciou na produção enzimática (Figura 21). Os fatores que influenciaram de forma significativa foram o tempo de fermentação e a umidade. A maior produção enzimática foi obtida em 24 horas de fermentação com 45% de umidade. A produção de amilase não é afetada em baixas atividades de água (CRUZ *et al.*, 2011).

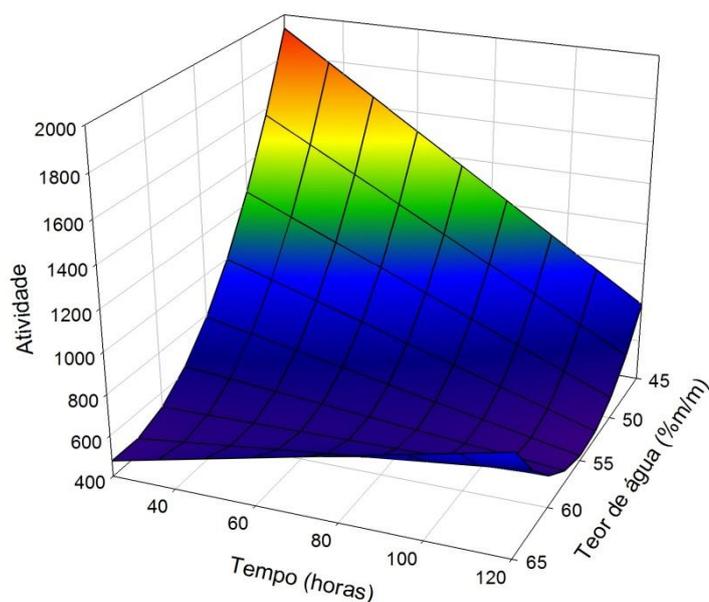


Figura 21: Produção de amilase na casca da mandioca

A menor concentração enzimática obtida foi em 120 horas de fermentação. Fato que pode estar relacionado com a inibição do fungo, marcado pela extrapolação do nível de água ideal para o desenvolvimento da linhagem selecionada, o que poderia estar influenciando o metabolismo responsável pela produção da enzima (ALVA *et al.*, 2007). Geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle de expressão que são estimulados ou inibidos por produtos presentes no meio de cultivo (WHITAKER, 1994).

Shaktimay *et al.*, 2010 afirmam que acima de 60% de capacidade de retenção de umidade houve decréscimo da atividade da α -amilase termoestável de *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cultivada em FES. *A. niger* e *A. terreus*, cultivados em resíduo de mandioca com 70% de umidade a 28 ± 1 °C, apresentaram picos de atividade amilolítica com 6 dias de fermentação. Ao final de 10 dias de fermentação, não foi possível detectar atividade da enzima nestas fermentações (POTHIRAJ *et al.*, 2006).

Teores de umidade acima de 80% podem levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica. Alto teor de umidade também diminui a porosidade, a difusão de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento (DALSENTER *et al.*, 2005).

5.4. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO COM O FUNGO *Aspergillus niger*

5.4.1 Determinação do pH ótimo para o farelo de cacau

Na figura 22, pode-se notar um pico na atividade enzimática quando o pH de incubação foi igual a 7,0. Abaixo e acima desse valor a atividade foi praticamente a mesma, mantendo-se constante. Omenu *et al* (2005) relata um valor ideal de pH para amilase de *Aspergillus niger* de 4,0, havendo redução em valores superiores a esse. As amilases diferem bastante quanto a um valor específico de pH ótimo, tendo seu maior valor em pH que varia entre 2 a 12 o que foi mostrado no trabalho (MINAFRA, 2007).

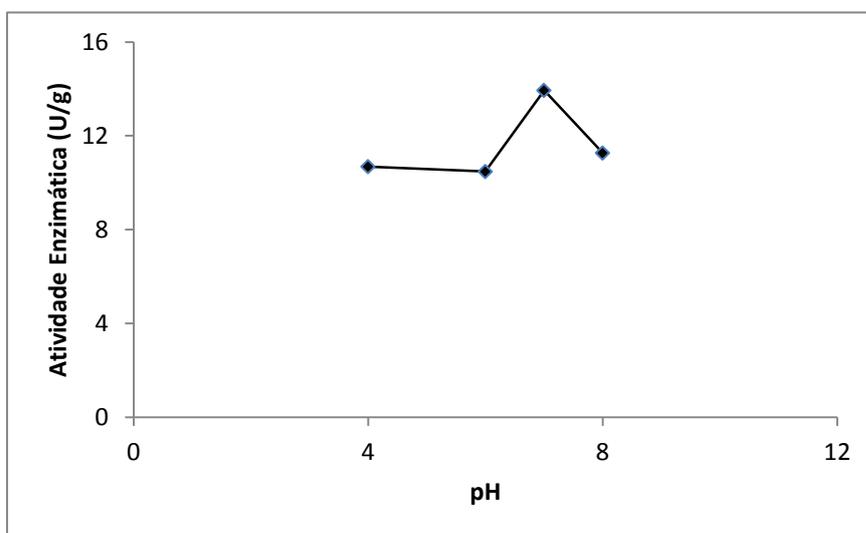


Figura 22: Efeito do pH na atividade de amilase para o farelo de cacau

5.4.2 Determinação do pH ótimo para a casca de mandioca

A inter-relação pH-atividade enzimática pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima.

Os dados apresentados na figura 23 mostram valores bem próximos de atividade enzimática nos pHs iguais a 4,0, 7,0 e 8,0, apresentando o pico de atividade em pH 6,0. Silva *et al* (2004) ao utilizar o resíduo fibroso de mandioca como substrato para a produção da amilase pelo *Penicillium notatum*, obteve atividade melhor atividade também em pH 6,0.

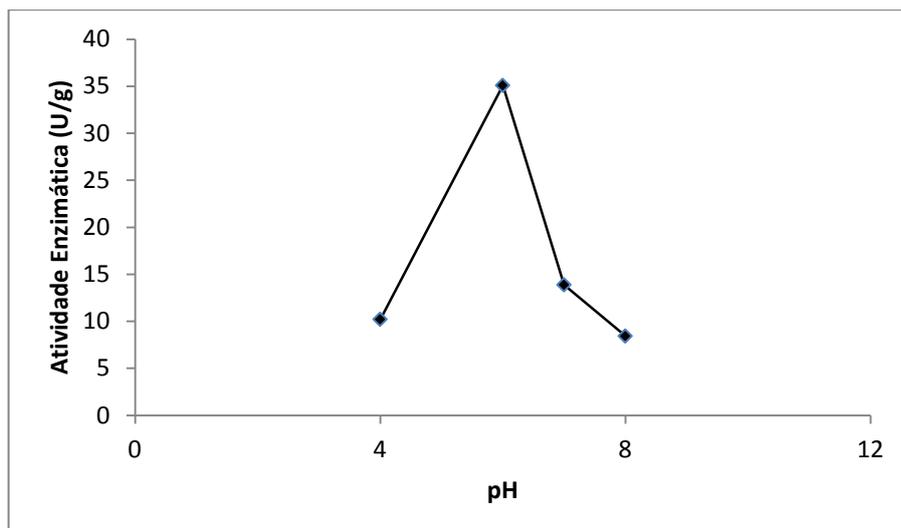


Figura 23: Efeito do pH na atividade de amilase para casca de mandioca

A maior parte das enzimas apresentam atividade máxima em pH numa faixa compreendida entre 4,5 e 8,0 (BOBBIO & BOBBIO, 1992a). Os dados mostram uma queda na atividade com o aumento do pH, após a elevação enzimática. Essa diminuição ocorre devido à desativação enzimática.

Rasiah & Rehm (2009) obtiveram uma amilase em *E. coli* recombinante que possuía pH ótimo 8,0.

5.4.3 Determinação do pH ótimo para a palma forrageira

Para a palma forrageira, os resultados encontrados estão bem próximos entre si de acordo com os valores de pH estabelecidos (Figura 24). A maior atividade enzimática ocorreu também em pH igual a 6,0 assim como na casca da mandioca, e também um decréscimo na quantidade enzimática produzida após esse valor de pH. Isso comprova que os fungos filamentosos têm a capacidade de se desenvolver e produzir enzimas nos pHs descritos, mostrando sua tendência a se desenvolver em meios semi-ácidos e alcalinos. A menor concentração enzimática foi no meio mais alcalino, com pH igual a 8,0.

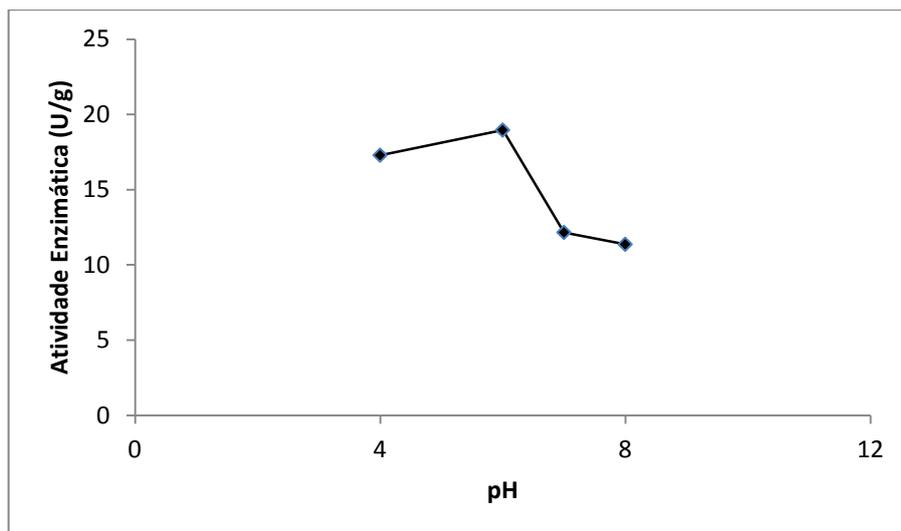


Figura 24: Efeito do pH na atividade de amilase para a palma forrageira

Semêdo *et al* (2000) encontraram pH ótimo igual a 7,0 para enzimas produzidas por *S. drozdowiczii*, com um pico extra em pH 11,0. Por outro lado, Lima *et al* (2005), encontraram com pH ótimo igual a 5,0 e a 10,0. Jan e Chen (2003) obtiveram enzimas de *Streptomyces* T3-1 com pH ótimo igual a 7,0.

As amilases demonstraram a capacidade de manter uma alta atividade amilásica em pHs em torno de 6,0. Nota-se que em todas as variações de pH determinado para obtenção da amilase, foram quantificados valores de atividade enzimática, o que mostra a capacidade dos mesmos na produção de enzimas amilolíticas.

5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA COM O FUNGO *Aspergillus niger*

5.5.1 Determinação da temperatura ótima para o farelo de cacau

O efeito da temperatura na atividade da amilase foi analisado em temperaturas variando de 25 a 95°C, conforme descrito. Pode-se observar que o pico da atividade enzimática ocorreu em 55 °C (Figura 25).

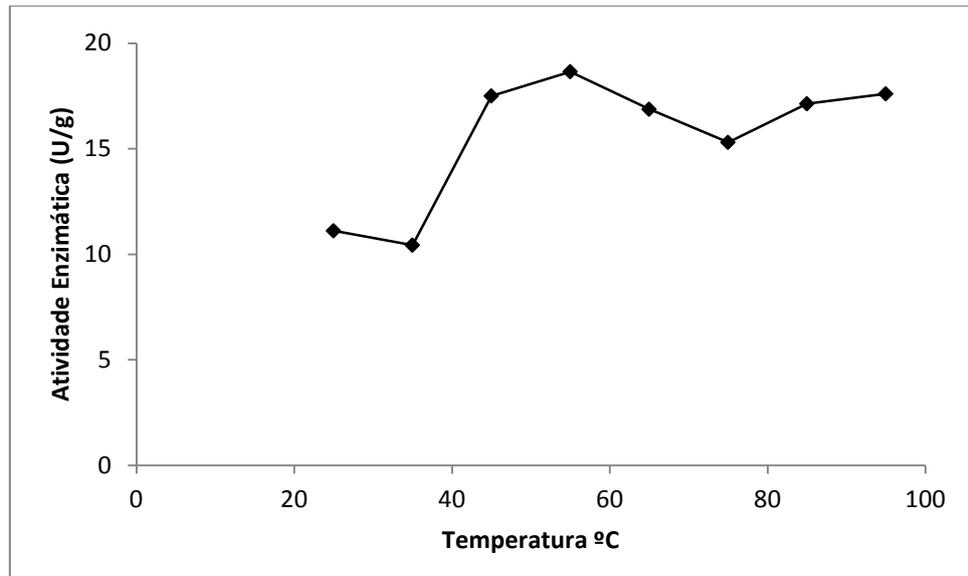


Figura 25: Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica do farelo de cacau

Diferentes picos de atividade podem indicar a síntese de outra enzima amilolítica como a amiloglucosidase que apresentam máxima atividade em temperaturas de 50-55 °C sendo, entretanto rapidamente inativada em temperaturas próximas de 60 °C. Essa termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária (ALVA *et al.*, 2007). SPIER (2005) obteve resultado semelhante aos encontradas neste estudo para uma amilase fúngica, reportando temperatura ótima entre 45-55 °C.

Negi e Banerjee (2009) caracterizaram a amilase de *A. awamori nakazawa* (MTCC 6652) e relatam que esta enzima apresenta temperatura ótima de 70 °C e pH 4,0. Isso mostra a estabilidade da enzima em condições usadas em processos industriais, o que torna o uso desta enzima ferramenta importante em processos alimentícios, de limpeza e outras indústrias. Varalakshmi *et al.* (2009) relatam pico de atividade da amilase de *Aspergillus niger*, cultivado em fermentação submersa, a 30 °C com valor mínimo a 70 °C. Em *Penicillium echinulatum*, a atividade máxima foi à temperatura de 60 °C (CAMASSOLA *et al.*, 2004).

A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60°C (REED, 1975; COSTA, 1996), que incluem a amiloglucosidase de *Aspergillus niger*. O aumento da atividade enzimática se deve a ativação pela temperatura (SHULER, 1992) na qual os átomos adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Após este período ocorre a desnaturação ou desativação térmica causada pelo rompimento das fracas interações que mantém unida a estrutura globular da proteína (BAILEY e OLLIS, 1986).

5.5.2 Determinação da temperatura ótima para casca de mandioca

Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo.

Na figura 26, nota-se que na casca de mandioca, a enzima apresenta pico de atividade enzimática quando incubado numa temperatura próxima de 45 °C. Entre 35 e 95 °C houve um decréscimo nas concentrações enzimáticas devido à desativação enzimática pelos fatores temperatura e/ou ausência de substrato no meio, como afirmam Bailey e Ollis (1986). O processo de hidrólise enzimática extrai do material, açúcares redutores, incluindo a glicose (RABELO, 2011).

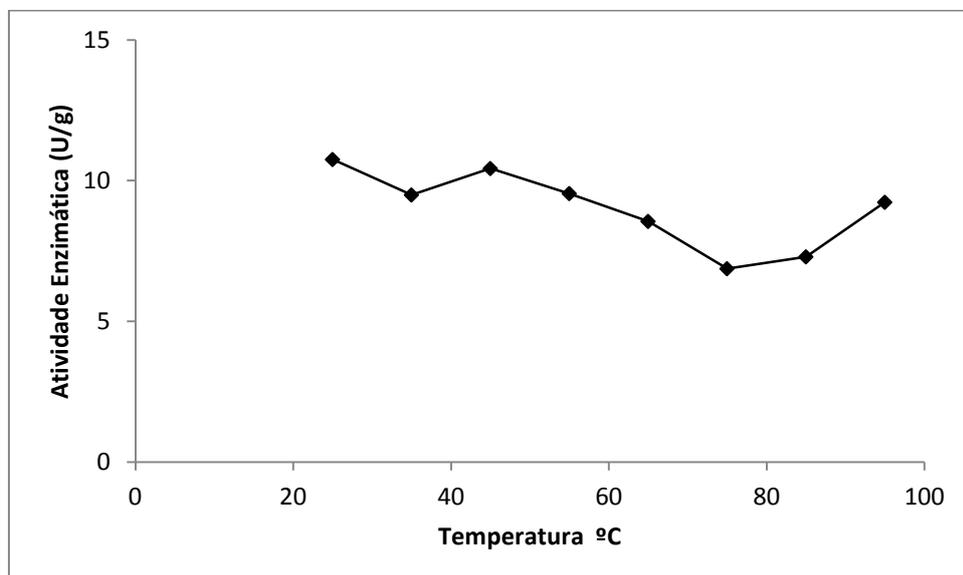


Figura 26: Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica da casca de mandioca

Desta forma, ocorre a produção de amilase de forma satisfatória para temperaturas inferiores a 45 °C, sendo que a temperatura ótima para a produção dessa enzima é inferior a 35 °C. Observa-se que as amilases encontram-se ativas no intervalo de temperatura entre 25 e 45 °C.

O crescimento nas temperaturas de 25 e 35° C é muito mais importante, pois, uma camada branca de micélio envolve totalmente o substrato, enquanto que nas temperaturas acima de 35 °C não se verifica um crescimento enzimático tão intenso como observado no presente trabalho.

5.5.3 Determinação da temperatura ótima na palma forrageira

N a figura 27 foi observado que a temperatura ótima para as atividades enzimáticas na palma forrageira ocorreu a 65 °C. Isso mostra a estabilidade da enzima em condições usadas em processos industriais, o que torna o uso desta enzima ferramenta importante em processos alimentícios. Nas temperaturas entre 75 e 95 °C ocorre uma diminuição na produção amilolítica. O aumento da temperatura pode acelerar o processo de desnaturação proteica, o que compromete na produção das enzimas amilolíticas.

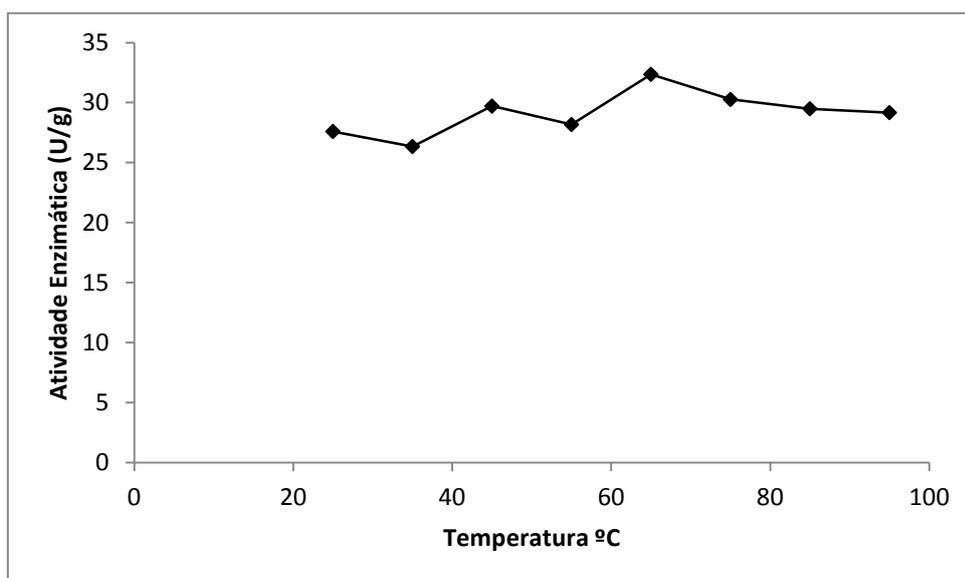


Figura 27: Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica da palma forrageira

A redução da atividade enzimática após certo tempo de hidrólise pode ter ocorrido devido à desnaturação parcial das enzimas através de fatores como o aumento da temperatura segundo Bailey e Ollis (1986). Por outro lado, de acordo com Zhang (2006), tempos muito curtos de reação não são suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como a fração cristalina da amilase. Desta forma, o tempo de hidrólise deve ser suficiente para garantir a degradação total do amido sem que ocorra desativação enzimática. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, o processo de hidrólise enzimática do amido extraído do material amilásico, açúcares redutores, incluindo a glicose (RABELO, 2011).

5.6 TERMOESTABILIDADE

5.6.1 Estabilidade térmica da amilase produzida no farelo de cacau

O efeito da temperatura sobre a estabilidade e ação das enzimas é de grande importância para aplicação desta enzima na indústria de alimentos, tendo em vista a necessidade de tratamentos térmicos dos produtos onde é aplicada e a inativação desta enzima após sua utilização. Na figura 28, pode-se observar que as maiores produções enzimáticas foram obtidas com a temperatura de 80 °C, o que torna vantajoso para processos industriais quando submetido a altas temperaturas.

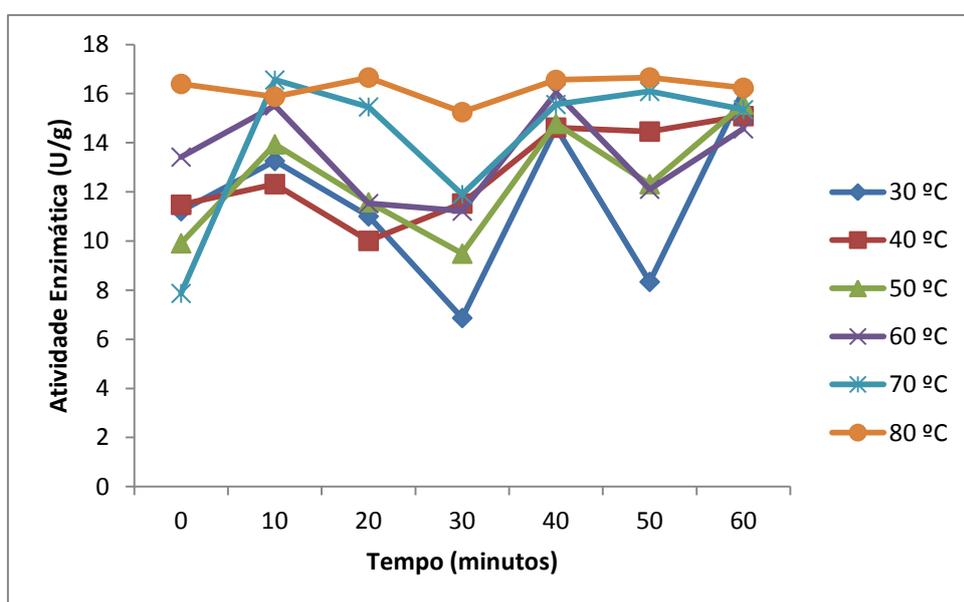


Figura 28: Estabilidade térmica da amilase no farelo de cacau

Ainda de acordo com os resultados, a produção enzimática se manteve praticamente constante a 40 °C em durante todo o período de incubação. A perda da atividade mais acentuada foi na temperatura de 70 °C.

O aumento na atividade enzimática foi notado no decorrer do tempo de incubação das amostras. Mesmo tendo algumas perdas em alguns períodos de incubação, as atividades enzimáticas se mantiveram ativas durante os 60 minutos, quando submetidas a temperaturas variantes de 30 a 80 °C, o que comprova a boa estabilidade térmica da enzima. É possível notar que mesmo a uma temperatura elevada à enzima ainda continuou ativa, não perdendo assim sua termoestabilidade.

5.6.2 Estabilidade térmica da amilase produzida na casca de mandioca

De acordo com os dados apresentados na figura 29, a produção enzimática se manteve praticamente constante durante todo o tempo de incubação a temperaturas variadas (30 a 80 °C).

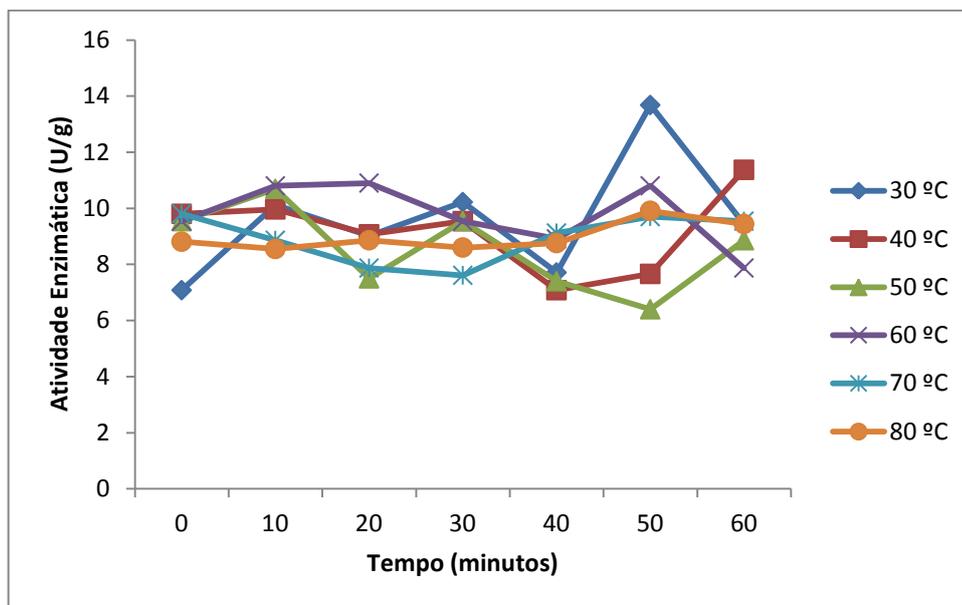


Figura 29: Estabilidade térmica da amilase na casca de mandioca

O ponto ótimo da atividade amilásica foi obtido a 30 °C num período de 50 minutos, temperatura em que a enzima se manteve ativa quando exposto a essa temperatura.

Durante todo o tempo em que as amostras estiveram incubadas os valores de atividade foram menores se comparado aos valores da casca de cacau. Esses resultados foram considerados baixos para utilização em indústrias se submetidos a altas temperaturas. Com o aumento da temperatura dos processos, poderá ocorrer a desnaturação protéica, esta termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária (LEMOS *et al.*, 2003).

5.6.3 Estabilidade térmica da amilase produzida na palma forrageira

Diante os resultados apresentados na figura 30, a estabilidade térmica da palma forrageira permaneceu ativa durante todo o tempo de incubação nas temperaturas estabelecidas. É possível observar que a mesma permaneceu constante em quase todo o período de tempo. Esse fato é importante para as enzimas utilizadas em indústrias onde altas temperaturas são

utilizadas. Nos dados da figura 3 a maior atividade enzimática ocorreu na temperatura mais elevada de 80 °C. Esta termoestabilidade é importante para o uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária.

Os resultados com a palma foram os melhores se comparado com o farelo de cacau e a casca de mandioca, o que mostra a maior estabilidade térmica da enzima principalmente quando forem utilizados em processos em que são submetidos a altas temperaturas.

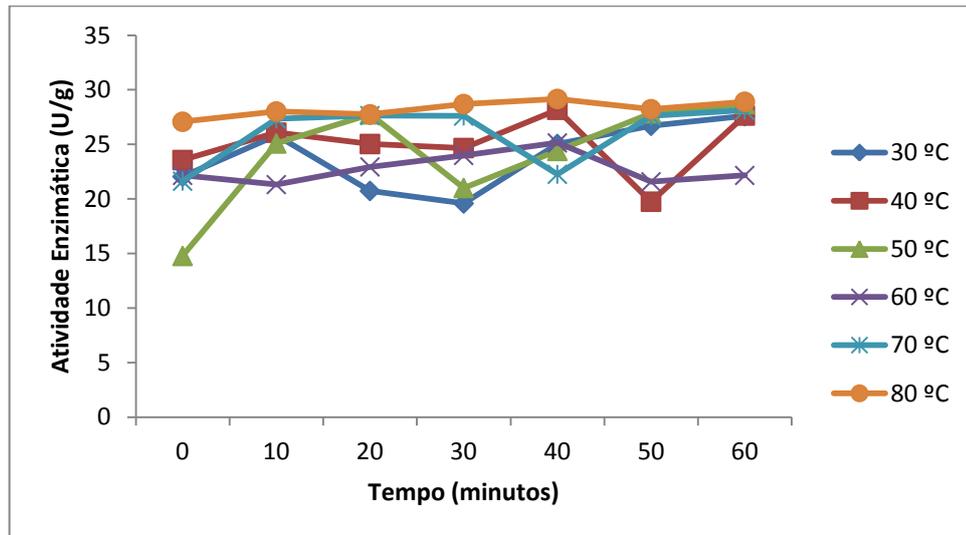


Figura 30: Estabilidade térmica da amilase na palma forrageira

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram a potencialidade dos meios de cultura alternativos, como substratos abundante e de baixo custo na síntese de enzimas amilolíticas por fermentação em estado sólido, utilizando os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* O fungo *A. niger* foi capaz de alcançar cerca de 2657,143 UA de atividade amilásica no resíduo do farelo de cacau, em 24 horas de fermentação com 65% de umidade. Nesse tempo foi possível verificar as maiores concentrações enzimáticas, durante as fermentações.

Ao se analisar a atividade enzimática nos diferentes ensaios realizados, pode-se concluir que, mesmo havendo produção de amilase em todos eles, os resultados com o fungo *Aspergillus niger* proporcionaram a maior atividade enzimática quando comparado com o *Rhizopus sp.*, o que aponta o uso do *A. niger* como micro-organismo mais utilizado na produção de enzimas. A utilização de fungos filamentosos é bastante promissora no que se diz respeito à produção enzimática.

Nos ensaios das reações enzimáticas foi possível identificar faixas de pH e temperatura ótimos além de definir a estabilidade térmica das enzimas, onde amilases termoestáveis são consideradas ideais para produção de biomoléculas de interesse industrial.

Analisando os resultados vários fatores foram importantes para quantificar a quantidade de enzimas presentes nos substratos. Dentre eles, a água e o tempo de fermentação afetam diretamente a produção da enzima.

De uma forma geral conclui-se que, nas condições empregadas, a utilização do farelo de cacau, da casca de mandioca e da palma forrageira, podem ser considerada boas fontes para a produção de amilase, sendo que o resíduo de casca de cacau produziu maiores teores. A utilização dessas fontes na produção de enzimas amilolíticas é viável, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a subprodutos da agroindústria e a palma forrageira para produção de amilases com o auxílio dos fungos filamentosos e da fermentação em estado sólido.

7. REFERÊNCIAS

AGUERO, J. M. Z. **Estudo da Inativação da Glicoamilase e da Influência de Fosfatos na Produção da Enzima em Cultivos de *Aspergillus awamori***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ALTIPARMAK-MEHMET-RIZA; APAYDIN-SUHEYLA; TRABLUS-SINAN; SERDENGECTI-KAMIL; ATAMAN-REZZAN; OZTURK-RECEP; EREK-EKREM TURAN GUNES BULVARI, DENIZATI KENT SITESI, Systemic fungal infections after renal transplantation. **Turkey-Scandinavian Journal-of-Infectious-Diseases**; v. 34, n. 4, p.284-288, 2002.

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**, v. 6, n.5, p. 576-581, 2007.

AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetinga, Bahia, 2011.

ANDRADE, A. T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglucosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento do arroz**. Dissertação de mestrado – Centro de Estudos Ambientais, Programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 1999.

IBGE, ANURÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: 1999, sessão 3, p.46, 1999.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2004.

ARAÚJO, L. F. et al. Bioconversão da palma forrageira alternativa alimentar para pequenos ruminantes. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 59-61, 2007.

ARAÚJO, L. F. et al. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 401-407, 2008.

ARAÚJO, L. F. et al. Bioconversão do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru*) em alimento alternativo para Ruminantes. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 1, p. 53-57, 2009.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc Graw- Hill Intl Editions, 2 ed., p.928, 1986.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acríbia, p. 813 1988

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

BIANCHI, V. L. D., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell, Wi., Lima, V.A., Aquarone, E., Borzani, W. **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA. V.3: p. 247-276, 2001.

BLAMONT, E. et al. O semi-árido da Bahia: problemas, desafios e possibilidades. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 45-49, 2002.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed., 1.Reimpr.Sao Paulo: Livraria Varela. p.223p, 1992a.

BON, E. P. S. **Enzimas Industriais: política e gestão**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Brasília, DF, 2002.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord). **Biotechnologia industrial: fundamentos**. 1º Ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 254, 2001.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANGS, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S.Y.; YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n.12: p. 537-542, 1998.

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

CALDAS, S. F. N, ZEOULA, L. M, BRANCO, A. F. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: pH, concentração de amônia e eficiência microbiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa, MG. Anais... Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.457, 2000.

CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J. DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n.5-6, p. 391-396, 2004.

CARVALHO, R.V., CÔRREA, T.L.R., SILVA, J.C.M, MANSUR, L.R.C.O, MARTINS, M.L.L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* v.39: p.102-107, 2008.

CEPA/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, 2004. Disponível em: <http://www.icepa.com.br> acesso em 01/06/11.

CEPEDA, E.; HERMOSA, M.; BALLESTEROS, A. Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.76, p.70-76, 2001.

CEPLAC. Participação na produção de cacau em amêndoa, por Estado, no país em 1995. Disponível em : < <http://babelfish.altavista.com/cgi-bin> >. Acesso em 15 nov. 2011.

CEREDA, M. P. Caracterização dos Resíduos da Industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed.) **Industrialização da Mandioca no Brasil**. Paulicélia, São Paulo, SP, p. 11-50, 1994.

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUISTA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido bahiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 39-49, 2006.

CONCEIÇÃO, A. J. da. **A Mandioca**. São Paulo: Nobel, 1981.

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

CONNEY, C. L. **Growth of microorganism**. In: *Biotechnology*, 1, Microbial Fundamentals, H. J. Rehm e G. Red (Ed.), Florida, v.2, p.73-112, 1981.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese-Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2004.

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

CRUZ, R.; CIACCO, C. F. **Fabricação de amido e sua utilização**. Série: Tecnologia Agroindustrial – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia – FTPT, p.152, 1980.

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. *Unopar Científica. Ciências Biológicas e Saúde*. v.13 (4), p.245-249, 2011.

DALSENTER, F. D. H. Contribuição ao Estado da Aplicação da Proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico. **Dissertação de Mestrado**, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.,; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.A. Mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. *Process Biochem*, v.40: p.801-7, 2005.

DANTAS, B. F. *Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao alagamento*. Tese (Doutorado em Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2002.

DECLERCK, N.; MACHIUS, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GAILLARDIN, C. **Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase**. *J. Mol. Biol.* v. 31, p. 1041-1057, 2000.

- DESCHAMPS, F.; GIULIANO, C.; ASTHER, M. Cellulose production by *Trichodema harzinaum* in atatic and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. **Biotechnology and Bioen:** v.85, p. 13-24, 1985.
- DOELLE, H. W; MITCHELL, D. A; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation.** Elsevier Science Publishers LTD, 1992.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial:** Engenharia Bioquímica. 1. Ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blucher. Cap. 13. p. 247-276, 2001
- EDC – Enzyme Development Company. **Enzymes Applications in Animal Feed.** Disponível em: <http://www.enzymedevelopment.com> Acesso em 6 nov. 2011. New York, 2004.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Suínos e Aves, 2004. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2003/artigo-2003_n019.html; ano=2003 acesso em 10/06/11.
- FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas.** Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.
- FREIRE, E. S.; ROMEU, A. P.; PASSOS, F. V. Aproveitamento de resíduos e subprodutos da pós-colheita do cacau. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, p.24, 1990.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amyloses as the substrate. *Journal Biochem* v.4: p.583-603, 1954.
- GODOY, M. G. **Produção de lipase microbiana e dextoxificação simlutânea de rejeitos agroindustriais.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ. 2009.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.
- GHORAI, S. et al. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, Toronto, v. 42, n. 5-6, p. 577-587, 2009.
- GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective.** Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 08 Dez. 2010.
- GUTIERREZ, R. M.; FAVELA-TORRES, E.; CORDOVA-LOPES, J. GARCIARIVERO,N. M. **Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.33, n.2, p.103-103, 1998.
- HANSEN, B. W.; WILLUMSEN, B.; WINTHER, S. K.; DRABOF, H. Multistep determination of enzyme activity by flow injection and sequential injection analysis. Assay of amiloglucosidase. **Talanta - Pergamon. Elsevier Science.** New York, v.41, n.11, p.1881-1893, 2004.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica.** In: Bioquímica das Fermentações, p.56, 1982.

- HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINERO, I. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. **Protein Expression and purification – Academic Press**. v.10, p.70-79, 1997.
- JAN, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.19., p.263-268, 2003.
- LEMONS, C. M. Y., FUCHS, E., GOMES, E., SILVA, R. da. Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed.31 jul./dez. 2003.
- LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.272-277, 2005.
- KOLICHESKI, M. B. Produção de Ácido Cítrico por Fermentação em Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca. (**Dissertação de Mestrado**) Curitiba, UFPR, 1995.
- KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J Biosci Bioeng*; 100(2):168-71, 2005.
- LACAZ, C. S. **Micologia Médica**. 7Ed. São Paulo-SP. Sarvier, p.557-568, 1992.
- LEADLAY, P. F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.82, 1993.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed.. São Paulo: Sarvier, p.839, 2002.
- LEMONS, C. M. Y.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, n.31, p. 86-94, 2003.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**. v.7, p.258-265, 1985.
- LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDAM G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS. S.; VINIEGRA-GONZALES G.; GHILDYAN, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems: a review. **Process Biotechnology**: v.26, p.1-15, 1991b.
- MACKENZIE, D. A.; JEENES, D. J.; GOU, X.; ARCHER, D. B. Molecular basis of glucoamylase over production by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.193-200, 2000.
- MAHEVA, E.; DJELVED, G.; LARROCHE, C.; CROS, J. B. Sporulation of *Penicillium roqueforti* in Solid State Fermentation. **Biotechnol. Letters**. v.6, p.97-102, 1984.
- MARTINS, A.S.; ALCALDE, C.R.; ZEOULA, L.M.; MARQUES, J.A. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica. *Revista Brasileira de Zootecnia*. V.29(1), p.278-87, 2000.

- MEINHARDT, S.; MEDEIROS, F.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. **Purificação de amiloglicosidase em sistema aquoso bifásico.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2005.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Washington, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MINAFRA, C.S. Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade. Tese de Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. **Definition, characterization and economic evaluation.** In *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London, 1992.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena.** In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006a.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Solid-State Fermentation Bioreactors.** In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.19, Heidelberg, 2006b.
- MITIDIARI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, Brasília, DF, 2002.
- MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. **Revista de Microbiologia.** São Paulo, v.30, n.2 , 1999.
- MUDGETT, R. E. Solid State Fermentation In: DEMAIN A.L., SOLOMON N.A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington: American Society for Microbiology, p.66-84, 1986.
- NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. **Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*,** Journal Fermentation Technology, v. 60, n. 4, p. 311-319, 1982.
- NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. Food Res Int v.42(4): p. 443-8, 2009.
- NETO, A. R.; VELOSO, C. M.; SILVA, F. F.; MENEZES, D. R.; OLIVEIRA, H. C.; AZEVEDO, S. T.; PINHEIRO, A. A.; JUNIOR, H. A. S.; ALMEIDA, P. J. P.; PEREIRA, M. M.; DIAS, D. L. S. **Farelo de cacau na dieta de novilhas leiteiras: viabilidade econômica.** ABZ (Associação Brasileira de Zootecnistas). João Pessoa, PB – UFPB/ABZ. 2008.
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances.** v.24, p. 80-85, 2006.
- OLIVEIRA, M. M. D, CAMPOS, A. R. N., DANTAS, J. P., GOMES, J. P., SILVA, F. L. H. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananás comosus* L. Mer). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** Campina Grande, v.9, n.4, p.565-569, 2005.
- OMENU, A. M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M. O.; TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. Afr Journal Biotechnol; v.4(1): p.19-25, 2005.

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

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Braz. J. Microbiol.* vol.36 no.1 São Paulo Jan/Mar. 2005.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochemistry.** v.27, p.109-117, 1992.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; Nigam, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999a.

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

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., RODRIGUES-LEON, J. A., NIGAM, P. **Solid state fermentation in biotechnology.** Nova Deli, Asiatech, p.221, 2001.

PANDEY, A. **Solid state fermentation.** *Biochemical. Engineering Journal*, v.3636, p.1-4, 2002.

PANDEY, A. **Solid state fermentation.** *Biochemical. Engineering Journal*, v.13, n. 2/3, p.81-84, 2003.

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

PERAZZO, A. N. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus - indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger*.** Tese (Doutorado). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 1999.

PERES, A. S. F A cadeia produtiva do cacau. In: *Agronegócio Brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade.* 2.Ed. Brasília: CNPq, 1998.

PETERS, D. Improving Agro-Enterprises in Doung Lieu Commune, Vietnan. **Urban Agriculture Magazine.** n. 10, p. 38-39, 2003.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger*.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PIRES, A. J. V.; VIEIRA, V. F.; SILVA, F. F.; VELOSO, C. M.; SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, T. N.; SANTOS, C. L.; CARVALHO, G. G. P.; **Níveis de Farelo de Cacau (*Theobroma***

cacao) na alimentação de bovinos. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504. Vol. VI, nº 2, Febrero 2005.

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

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos.** 2 ed., v.1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, p.605, 2004.

RABELO, S. C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7887-7895, 2011.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. **Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives.** Biotechnol. Adv., 2005.

RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** Eletronic Journal of Biotechnology, v.1, n. 3, 1998.

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

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

RODRIGUES, A. B. C.; ALMEIDA, C. A. V.; ROCHA, C. P.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*, 2009.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. Tratado de microbiologia. São Paulo: Manole, p.154-159, 1988.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária.** UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática & Seropédia, 2002.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi.** Centraalbureau voor schimmelcultures barn delft, fourth edition. p.322, 1995.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv.** 27 (2): 185-94,2009.

SANT'ANA JR.; G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biociologia Industrial:** processos fermentativos e enzimáticos. 1. Ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blucher, Cap.14. p.351-362, 2001.

SANTOS, S. F. M.; NÓBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. **Caracterização do resíduo seco do pendúculo de cajú para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2005.

SAS Institute Inc. Getting Started with the SAS 9,1 **ADX Interface for Desing of Experiments**, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. p.60-79, 1999.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basics of a solid substrate. **Bioresourc Technology**, v. 65, p. 83-85, 1997.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; BON, E. P. S.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.84, p.267-276, 2000.

SENA, J. V. C. **Informe Rural Etene**. Banco do Nordeste. Ano V – Fevereiro de 2011 n°02. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_ano5_n2.>. Acessado em Março de 2011.

SENHORAS, E. M. Oportunidades da Cadeia Agroindustrial do Coco Verde Do coco verde nada se perde, tudo se desfruta. **Urutágua**. Maringá, n.5, Quadrimestral, dez-mar, 2005 http://www.uem.br/~urutagua/005/22eco_senhoras.htm acesso em 02/08/11.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, p.463, 2001.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. *Pak J Bot*; 41(2):897-905, 2009.

SHAKTIMAY, K.; TAPAN, K.D.; RAMESH, C.R. Optimization of thermostable α - amylase production n by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue. *Braz Arch Biol Technol*, 53(2):301-9, 2010.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

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

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. **Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2005a.

SINGH, R. S.; SINGH, V. Growth and development influenced by size, age and planting methods of cladodes in Cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). 2003. Disponível em <http://www.Jpacd.org.br>. Consultado em 18 de maio de 2010.

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

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. p.221-230, 2005.

SONI, S. K.; KAUR, A.; GUPTA, J. K. Solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolyses of wheat starch. **Process biochemistry**, v.39, p. 185-192, 2003.

SOUSA, D. M. M. et al. Comportamento das sementes de palma (*Opuntia ficus-indica* L.) submetidas à fermentação e secagem. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.3, p.29-34, 2009.

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

SPIER, M. R.; SUGAI, M.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. **Optimization of α -amylase and amyloglucosidase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using cassava starch and sugar cane bagasse**. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2005.

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

TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amyloclastic Enzyme to the fermentation Industry. **J. Ind. Eng. Chem**, v.6, p. 824-828, 1994.

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

VARALAKSHMI, K. N.; KUMUDINI, B. S.; NANDINI, B. N.; SOOMON, R.; SUHAS, R.; MAHESH, B.; KAVITHA, A. P. Productions and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. Polish Journal Microbiology v.58;(1): p.29-36, 2009.

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

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

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Segunda Edição. Dekker, 1994.

YAMAGUCHI, J., ITOH, S., SAITOH, T., IKEDA, A., TASHIRO, T., NAGATO, Y. Characterization of beta-amylase and its deficiency in various rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* v.98, n.1, p.32-38, 1999.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZIEGLER, P. Cereal beta-amylases. *J. Cereal Sci.* v.29, p.195-2004, 1999.