

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

GENOVEVA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE
AMILOGLUCOSIDASE POR *Aspergillus awamori***

PONTA GROSSA

2006

GENOVEVA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE
AMILOGLUCOSIDASE POR *Aspergillus awamori***

Dissertação apresentada como um dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Dr^a. Ana Cláudia Barana

PONTA GROSSA
2006

*Ao meu pai, João, pelo apoio e incentivo que recebi.
À minha mãe, Inez, pela força e conforto emocional diante das
dificuldades.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Barana, pela orientação e colaboração, essenciais para o alcance dos objetivos do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Gilvan Wosiacki, pela ajuda na elaboração do projeto e dicas para melhoria do trabalho.

À Valesca Kotovicz pela amizade e colaboração na parte experimental do projeto de Mestrado.

Aos professores, Dr^ª. Noemi Nagata, Dr^ª. Mareci Almeida, Prof^ª. Maria Etelvina Madalozzo Ramos, Dr. Ivo Demiatte, Dr. Alessandro Nogueira, pelo apoio, sugestões e esclarecimentos prestados durante todo o Mestrado.

Ao meu namorado Maurício Vilas Boas Alves pelo carinho, apoio e compreensão.

Às grandes amigas Taís Vargas, Luciana Matsuguma e Krischina Aplevicz pelo companheirismo e amizade, pelas sugestões e apoio durante o tempo que passamos juntas.

Aos colegas Luiz Gustavo Lacerda, Marli Silva Santos, Marcos Giovani Celli, Heloísa Fertonani, e Audi Nathaniel Moon pelo companheirismo.

Ao meu irmão Marcelo, pela amizade e carinho.

Às amigas e colaboradoras Denise Maria de Souza Mendes e Danianni Bugeste Zardo, pela amizade gerada e apoio técnico.

À Rita Staron Naboski pela ajuda e paciência.

À empresa Vapza , pela colaboração, préstimos e fornecimento de informações e à Fundação Araucária pela bolsa de Mestrado concedida.

RESUMO

Muitos resíduos gerados na agroindústria podem ser utilizados como substrato para produção de enzimas. A amiloglucosidase (AMG) é uma enzima utilizada pela indústria de alimentos para a fabricação de xaropes de glucose. A produção de AMG por processos fermentativos pode ser feita com o uso do *Aspergillus awamori*, pelo fato de ser considerado um microrganismo seguro para a indústria alimentícia. Na fermentação em estado sólido (FES), o microrganismo é inoculado em um substrato onde a atividade de água assegure o crescimento e metabolismo celular e não excede à capacidade máxima de ligação de água com a matriz sólida. Neste trabalho foi estudada a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais (gerados a partir do processamento de batata, cenoura e mistura desses resíduos) para a produção da enzima amiloglucosidase (AMG) pelo microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Foram realizados ensaios variando as seguintes condições: teor de umidade de 90, 92 e 98%, relacionados ao tempo de fermentação e à agitação; teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%; suplementação com fontes de nitrogênio (nível de 2,20g (NH₄)₂SO₄/Kg de meio, com e sem correção de pH) e fósforo (níveis de 3,8, 7,6 e 11,4g Na₂HPO₄/Kg de meio); determinação da atividade enzimática em diferentes soluções tampão, citrato-fosfato 0,1M e pH 4,2 e tampão acetato 0,02M e pH 4,2. Dentro das condições empregadas, o tempo de 72 horas foi o mais adequado para a fermentação e produção de AMG, obtendo-se até 725,00 U/mL quando se utilizou resíduo do processamento de batata. A agitação, dentro dos níveis empregados, não se mostrou eficiente no incremento da atividade enzimática. Não houve grandes diferenças nos resultados de atividade enzimática em relação aos teores de umidade de 90, 92 e 98% utilizados. Nos ensaios com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90% as maiores atividades enzimáticas constatadas foram de 65,98 U/mL com emprego de umidade de 50% para o resíduo do processamento de cenoura, 141,38 U/mL com umidade de 30% na utilização do resíduo do processamento de batata e 55,77 U/mL quando se fez mistura de 50% de cada resíduos com umidade de 70%. Nos ensaios com meios suplementados apenas com fontes de fósforo, os melhores resultados de atividade enzimática obtidos foram 318,33 U/mL, com adição de 0,19g de Na₂HPO₄/50g de meio para o resíduo do processamento de batata, 33,33 U/mL quando se utilizou resíduo do processamento de cenoura com adição de 0,19g de Na₂HPO₄/50g de meio, 125 U/mL foi obtido quando se fez a mistura de 50% de cada resíduo com adição de 0,19g de Na₂HPO₄/50g de meio. Quando se adicionou fontes de fósforo e nitrogênio, os melhores resultados obtidos foram de 875 U/mL com resíduo de batata, sem correção de pH, adicionando-se 0,38g de Na₂HPO₄/50g de meio e sem adição de fonte de nitrogênio, 141,66 U/mL com resíduo de cenoura adicionando-se 0,38g de Na₂HPO₄/50g de meio, sem adição de fonte de nitrogênio e sem correção de pH. Nos ensaios com diferentes soluções tampão obteve-se os melhores resultados de atividade enzimática, de 51,66, 401,66 e 176,66U/mL, com resíduos do processamento de cenoura, batata e mistura desses, respectivamente, utilizando-se o tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2. Pode-se concluir que a utilização desses resíduos como fonte para produção de AMG é tecnicamente viável, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a subprodutos da agroindústria e evitando o descarte destes na natureza.

Palavras-chave: amiloglucosidase, resíduo de batata, resíduo de cenoura, fermentação em estado sólido, *Aspergillus awamori*.

ABSTRACT

Many types of agroindustrial wastes may be employed as substrate for enzyme production. Glucoamylase is an enzyme used by the food industry to elaborate, for example, glucose syrup. The glucoamylase production by fermentation processes may be done by *Aspergillus awamori*, because this microorganism is considered safe to be used in food industries. In the solid state fermentation (SSF), the microorganism is inoculated in a substrate where the activity of water allows the growth and cellular metabolism; however that doesn't exceed the maximum water holding capacity of the solid substrate. In this work it was studied the possibility of employing agroindustrial wastes (potato, carrot processing residues and mixes of these residues), for glucoamylase production by the *Aspergillus awamori* NRRL 3112. The experiments were made varying the following conditions: moisture levels of 90, 92 and 98%, fermentation time and agitation; moisture levels of 30, 50, 70 and 90%; supplementation with sources of nitrogen (level of 2,20g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Kg of substrate, with and without pH correction) and phosphorous (levels of 3,8, 7,6 and 11,4g Na_2HPO_4 /Kg of substrate); determination of the enzymatic activity in different buffers: pH 4,2, 0,1M citrate-phosphate buffer pH 4,2, 0,02M acetate buffer. In the tested conditions, the time of 72 hours was the most appropriate for the fermentation and production of glucoamylase, being obtained up to 725,00 U/mL when potato processing wastes was used. The agitation, as tested, was not efficient in the increment of the enzymatic activity. There were not great differences in the results of enzymatic activity with the studied moisture levels (90, 92 and 98%). In the experiments with moisture levels of 30, 50, 70 and 90%, the highest enzymatic activities verified were of 65,98 with 50% moisture for the carrot processing waste, 141,38 U/mL with moisture of 30% and use of the potato processing waste and 55,77 U/mL when the substrate was prepared by mixing 50% of each wastes with moisture of 70%. In the experiments with substrate supplemented with sources of phosphorous, the best results of enzymatic activity obtained they were 318,33 U/mL, with addition of 0,19g of Na_2HPO_4 /Kg for the substrate with potato processing waste, 33,33 U/mL when the carrot processing waste was used with addition of 0,19g of Na_2HPO_4 /Kg for the substrate; and 125 U/mL was obtained when the substrate was a mix of 50% of each waste with addition of 0,19g of Na_2HPO_4 /Kg for the substrate. When phosphorous and nitrogen sources was added, the best results obtained were of 875 U/mL with potato waste, without pH correction, being added 0,38g of Na_2HPO_4 /Kg for the substrate and without addition of nitrogen, 141,66 U/mL with carrot waste, being added 0,38g of Na_2HPO_4 /Kg for the substrate, without addition of nitrogen and without pH correction. In the experiments with different buffer solutions, best results of enzymatic activity were of 51,66, 401,66 and 176,66U/mL, with carrot, potato wastes and their mix, respectively, being used the pH 4,2, 0,1 M citrate-phosphate buffer. It can be concluded that the use of those wastes as sources for production of glucoamylase is technically viable, contributing with the process of value aggregation to sub-products of the agroindustrial processing and avoiding the discard of these in the nature.

Key-words: glucoamylase, potato waste, carrot waste, solid fermentation, *Aspergillus awamori*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da amilose	22
Figura 2	Estrutura da amilopectina	22
Figura 3	Fluxograma do processamento de batata e cenoura	40
Figura 4	Ilustração dos meios preparados com resíduos do processamento de batata, à esquerda, e cenoura, à direita, a serem fermentados	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades da amilose e amilopectina	23
Tabela 2	Metabólitos de importância industrial produzidos por fungos filamentosos	28
Tabela 3	Datas de recebimento dos lotes e ensaios em que foram utilizados	44
Tabela 4	Esquema dos ensaios da influência dos teores de umidade relacionados com tempo de fermentação e agitação	45
Tabela 5	Esquema dos ensaios com resíduo do processamento de batata e do processamento de cenoura em diferentes níveis de umidade	46
Tabela 6	Esquema dos ensaios utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata, resíduo do processamento de cenoura e mistura com 50% (p/p) de cada resíduo suplementados com Na_2HPO_4	47
Tabela 7	Esquema dos ensaios realizados para avaliação da influência da suplementação com Na_2HPO_4 , com e sem correção do pH, utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata e resíduo do processamento de cenoura	48
Tabela 8	Esquema dos ensaios com determinação da atividade enzimática utilizando-se solução tampão acetato 0,02M, pH 4,2 e tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2	49
Tabela 9	Caracterização dos diferentes lotes de resíduos do processamento de batata e cenoura, expressos em base úmida, de acordo com as datas de recebimento (valores por 100g de amostra a partir da média das duplicatas)	52
Tabela 10	Resultados dos ensaios da influência dos teores de umidade relacionados com tempo de fermentação e agitação	55
Tabela 11	Efeitos dos fatores dos ensaios da Tabela 10	55
Tabela 12	Resultados dos ensaios com resíduo do processamento de batata e do processamento de cenoura em diferentes níveis de umidade	57
Tabela 13	Resultados dos ensaios utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata, resíduo do processamento de cenoura e mistura de 50% do resíduo do processamento de batata e 50 % do resíduo do processamento de cenoura, com suplementação com Na_2HPO_4	59
Tabela 14	Resultados dos ensaios realizados para avaliação da influência da suplementação com Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com e sem correção do pH utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata e resíduo do processamento de cenoura	61
Tabela 15	Efeitos dos fatores dos ensaios da Tabela 14	62

Tabela 16 Resultados dos ensaios com determinação da atividade enzimática 66
utilizando-se solução tampão acetato 0,02 M, pH 4,2 e tampão citrato-
fosfato 0,1 M, pH 4,2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	MICROORGANISMO	17
3.2	SUBSTRATO	19
3.2.1	O amido como substrato para produção de amilases	21
3.2.2	A utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para processos biotecnológicos	23
3.3	ENZIMAS	26
3.4	PROCESSO FERMENTATIVO SUBSTRATO SÓLIDO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MICROORGANISMO	39
4.2	RESÍDUOS UTILIZADOS COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO	40
4.2.1	Caracterização dos resíduos	41
4.2.1.1	Teor de amido	41
4.2.1.2	Teor de açúcares redutores (AR)	41
4.2.1.3	Teor de glicose	41
4.2.1.4	Teor de umidade e de cinzas	41
4.2.1.5	Teor de fósforo	42
4.2.1.6	Teor de fibras	42
4.2.1.7	Teor de lipídeos	42
4.2.1.8	Teor de nitrogênio e proteína	42
4.2.1.9	Teor de carbono	42

4.2.1.10	Razão C/P e C/N	43
4.3	PREPARAÇÃO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO	43
4.4	DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS	44
4.4.1	Ensaio com meios com teor de umidade de 90, 92 e 98%, relacionados ao tempo de fermentação e à agitação	44
4.4.2	Ensaio com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%	45
4.4.3	Ensaio com meios suplementados com fontes de nitrogênio e fósforo	46
4.4.4	Ensaio de determinação da atividade enzimática com diferentes soluções tampão	48
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	49
4.5.1	Preparo da solução tampão acetato 0,02 M, pH 4,2 com 4% (p/v) de amido	49
4.5.2	Determinação da atividade enzimática para os ensaios descritos nos itens 4.4.1, 4.4.3 e 4.4.4	49
4.5.3	Determinação da atividade enzimática para os ensaios descritos no item 4.4.2	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS	52
5.2	RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS COM TEOR DE UMIDADE DE 90, 92% E 98%, RELACIONADOS COM TEMPO DE FERMENTAÇÃO E AGITAÇÃO	54
5.3	RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS COM TEOR DE UMIDADE DE 30, 50, 70 E 90%	56
5.4	RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS SUPLEMENTADOS COM FONTES DE FÓSFORO E NITROGÊNIO	58
5.5	RESULTADOS DOS ENSAIOS COM DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÃO	65
5.6	CONSIDERAÇÕES GERAIS	67
6	CONCLUSÕES	68
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
8	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Durante o processamento de alimentos, muitos resíduos podem ser gerados. O tipo e quantidade de resíduo gerado dependem do tipo de matéria prima e processos utilizados. Parte desses resíduos é descartada e parte tem sido aproveitada na fabricação de ração animal, adubo orgânico e até mesmo outros alimentos.

Algumas propostas vêm sendo apresentadas pelos setores ambiental e agroindustrial visando minimizar o problema da alta produção de resíduos pelas indústrias processadoras de alimentos. Como exemplo temos a proposta ZERI: *Zero Emissions Research Initiative*, que tem como objetivo despertar iniciativas inovadoras à produção industrial, buscando a emissão zero de resíduos em seus processos.

Ao fazer uso destes resíduos como meio de cultivo, a fermentação submersa ou em estado sólido vem sendo apontada como tecnologia de grande potencialidade apresentando vantagens de ordem econômica quando utilizada para a produção de enzimas.

A enzima amiloglucosidase, utilizada pela indústria de alimentos para a fabricação de xaropes de glucose e frutose, produção de álcool, como melhorador em panificação e na indústria fabricante de cerveja, é uma das mais produzidas pelo *Aspergillus awamori*, que vem sendo também utilizado no setor industrial para obtenção de α -amilase e protease pelo fato de ser considerado um microrganismo seguro para a indústria alimentícia.

A amiloglucosidase (AMG) é uma enzima hidrolítica que catalisa a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora das moléculas de amilose ou amilopectina do grânulo de amido e oligossacarídeos relacionados liberando β -D- glucose. Em uma velocidade menor, a amiloglucosidase também atua hidrolisando as ligações α -1,6.

A fermentação em estado sólido (FES), também chamada por alguns autores de fermentação semi sólida (FSS), é utilizada industrialmente por apresentar várias vantagens

como menor geração de efluentes, diminuição do risco de contaminação do meio, baixo investimento e menor exigência de água, quando comparada à fermentação submersa.

Na FES, o microrganismo é inoculado em um substrato onde o conteúdo líquido ligado a ele está em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo celular, porém que não exceda à capacidade máxima de ligação de água com a matriz sólida.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a possibilidade de utilização de resíduos do processamento de batata e cenoura para a produção da enzima amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* por fermentação em estado sólido (FES).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o processo de agregação de valor econômico a sub-produtos da agroindústria para produção de AMG utilizando *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer os procedimentos para determinar a atividade da enzima AMG comercial utilizando amido de milho pré-gelatinizado como substrato e a determinação de glucose liberada por método enzimático específico;

Obter o extrato aquoso do meio de fermentação sólido a ser utilizado como fonte de enzima AMG;

Determinar a influência da concentração do substrato na atividade enzimática;

Promover o processo de crescimento do microrganismo e produção da enzima AMG por *Aspergillus awamori* NRRL 3112;

Determinar o efeito da adição de resíduo agroindustrial do processamento mínimo de batata no crescimento do microrganismo e na produção de AMG;

Determinar o efeito da adição de resíduo agroindustrial do processamento mínimo de cenoura no crescimento do microrganismo e na produção de AMG;

Determinar se há sinergia na utilização de resíduo agroindustrial do processamento mínimo de batata e cenoura no crescimento do microrganismo e produção da enzima AMG;

Analisar a influência do emprego de agitação externa nos reatores durante o crescimento do microrganismo;

Determinar o efeito de diferentes teores de umidade do substrato na produção de AMG;

Verificar o efeito da suplementação do meio fermentativo com fontes de nutrientes como fósforo e nitrogênio ao substrato para obtenção da AMG;

Avaliar o efeito da utilização de diferentes tampões na determinação de atividade da AMG;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICRORGANISMO

Espécies do gênero *Aspergillus* formam o grupo mais importante de microrganismos utilizados para a produção de enzimas empregadas na indústria alimentícia. Para maximizar a produtividade, o bioreator é preferivelmente operado para altas concentrações de biomassa e ocorre que, às vezes, o meio de cultura torna-se muito viscoso apresentando um comportamento não-Newtoniano, ocorrendo problemas na mistura do meio, transferência de calor e a provisão de oxigênio torna-se crítica (ZANGIROLAMI, 2000).

Os fungos do gênero *Aspergillus* crescem bem em concentrações elevadas de açúcar e sal, portanto em muitos alimentos com baixo teor de atividade de água. Os conídios desse gênero de fungo possuem uma coloração esverdeada e seus ascósporos se encontram dentro de ascas cujos peritécios têm cor que varia de amarelo a avermelhado (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 100 espécies. Seu micélio é septado e sua reprodução assexuada. Algumas espécies, como o *A. glaucus* e *A. repens*, são importantes agentes de deterioração de alimentos. Outras espécies, como o *A. orizae* e *A. soyae*, são utilizadas na produção de alimentos. O *A. niger* é utilizado para a produção comercial de ácidos cítrico, glucônico e gálico e das enzimas β -galactosidase, amiloglucosidase, lipases e pectinases. O *A. oryzae* é grande produtor de α -amilase e enzimas pectinolíticas (FRANCO e LANDGRAF, 1996; FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

Os vários fungos sintetizadores de amiloglucosidase, que são ativos em altas temperaturas, são *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Mucor rouxians*, *Mucor javanicus*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus delmar*, *Rhizopus oryzae* e *Arthrobotrys amenspora* (NOROUZIAN et al., 2006).

O *Aspergillus awamori* vem sendo usado industrialmente para a produção de enzimas como amiloglucosidase, alfa-amilase e protease. Pesquisas estão sendo realizadas para uma possível utilização dessa espécie para a produção de outras enzimas como protopectinase, xilanase e quimosina. O nível de produção de uma enzima em particular pode ser de dezenas de gramas por litro de meio de cultura. Por exemplo, o *A. awamori* pode secretar mais de 20gL^{-1} de amiloglucosidase. Outra vantagem importante é que esse microrganismo tem uma história de uso seguro para a fabricação de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, sendo considerado como não tóxico e não patogênico (CUI et al., 1998).

O conhecimento de parâmetros cinéticos do *A. awamori* é essencial para projetar, aperfeiçoar e modelar um processo industrial para produção de amiloglucosidase. Tais parâmetros podem divergir de acordo com as condições do meio de cultura, como pH, temperatura, fermentação, tipo de substrato, oxigênio e forças hidrodinâmicas (FUJITA et al., 1994; KOUTINAS et al., 2003; SILVA et al., 2002). A maioria destes estudos caracteriza os parâmetros cinéticos de *A. awamori* com provisão de oxigênio adequada. Sendo um aeróbio estrito, é esperado que o *A. awamori* seja afetado severamente sob condições limitadas de oxigênio.

A sequência de crescimento microbiano em meio de cultura, em condições ótimas, envolve a germinação nas primeiras horas, seguida de um aumento gradual de temperatura devido ao início das atividades metabólicas, uma taxa crescente das atividades metabólicas, a fase estacionária e de declínio. A duração de cada etapa vai depender das condições de fermentação, do microrganismo empregado e do produto que se deseja obter (SCHMIDELL et al., 2001).

3.2 SUBSTRATO

A escolha de uma adequada fonte de carbono é importante no sucesso da síntese do produto desejado. Os resíduos agroindustriais são os substratos mais pesquisados. Em geral são baratos, abundantes e apresentam composição rica em materiais orgânicos (SANTOS et al., 2005). Uma fonte de carbono facilmente degradável como forma de energia também é recomendada por Shumanti e Manju (2000).

Uma ampla variedade de suportes sólidos naturais vem sendo usada na FES. Os resíduos da colheita e da agroindústria são os mais estudados, sendo que estes suportes possuem a maioria dos nutrientes necessários ao crescimento microbiano. No campo da produção de enzimas, vários sólidos naturais têm sido utilizados com sucesso, como o farelo de trigo, de milho e de arroz, a cana de açúcar, a beterraba, o resíduo do processamento de banana, de batata e de chá, a casca de coco, o bagaço de maçã e de frutas cítricas, a farinha de trigo e de milho (BOTELLA et al., 2005).

O substrato ideal é aquele que provê todos os nutrientes necessários aos microrganismos para sua função ótima. O custo e disponibilidade são outras considerações importantes. Assim, a seleção de um substrato sólido apropriado possui um papel importante no desenvolvimento de processos fermentativos eficientes (PANDEY et al., 1994).

Os microrganismos possuem requerimentos nutricionais e o fósforo é um deles. Esse nutriente se incorpora em ácidos nucleicos e polímeros celulares. Assim, o fósforo deve ser adicionado ao meio na quantidade requerida para o processo fermentativo, pois caso seja adicionado acima do teor necessário, pode ser tóxico, inibindo a produção enzimática (YANTORNO et al., 1995).

Pandey et al. (1994) comentam que o aumento da concentração de nitrogênio no meio provavelmente resulta em uma relação de C/N mais adequada, que é importante em qualquer processo de fermentação e isso pode resultar em um aumento no rendimento enzimático.

Entre as fontes de nitrogênio de origem orgânica, pode-se utilizar extrato de levedura e extrato de malte, que é obtido a partir da cevada (YANTORNO et al., 1995).

Observou-se que em culturas suplementadas com fontes orgânicas de nitrogênio, como L-alanina, L-metionina, ácido casamínico e peptona, houve redução na produção de amiloglucosidase (NOROUZIAN et al., 2006).

A relação C/N é de extrema importância para o desenvolvimento do microrganismo e conseqüente produção enzimática. Em seu trabalho, Silva Jr. et al. (1999) concluíram que o meio de composição afeta a proporção de isoenzimas no sobrenadante da cultura, eles estudaram o efeito da relação C/N na produção de amiloglucosidase produzida por *Aspergillus awamori*, usando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e amido como fonte de carbono, obtendo atividade de amiloglucosidase de 10,0 U.mg⁻¹ com utilização de C/N=26 e atividade de amiloglucosidase de 4,0 U.mg⁻¹ com utilização de C/N=10.

Os microrganismos utilizam como fonte de carbono diversos açúcares, tais como glucose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos como o amido e celulose. Como fonte de nitrogênio, os sais são freqüentemente utilizados, como o (NH₄)₂SO₄, que costuma provocar reduções significativas do pH e, em alguns casos, fenômenos de inibição pelo sulfato, aminoácidos ou uréia, a qual permite reduzir os problemas de controle de pH. Alternativamente, para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com características nutricionais mal conhecidas, podem-se adicionar certos materiais complexos como extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona, etc (SCHMIDELL, 2001). Estudos anteriores indicaram que a produção específica de diferentes formas de amiloglucosidases é afetada pela fonte e concentração de nitrogênio no meio, pela relação C/N e fase de crescimento da cultura (AALBAEK et al., 2002).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor

desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção ótima e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam para os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (SANTOS et al., 2005).

3.2.1 O amido como substrato para produção de amilases

O amido é a principal substância de reserva das plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. A matéria-prima está disponível em quantidade suficiente e os processos industriais permitem que o amido seja extraído com elevada pureza. Trata-se de uma matéria-prima renovável, biodegradável e não tóxica. A produção total mundial está estimada entre 25 e 45 milhões de toneladas por ano. Depois dos açúcares mais simples (sacarose, glucose, frutose, maltose), é o principal carboidrato que os vegetais superiores sintetizam a partir da fotossíntese. Entre as matérias-primas para sua extração, destacam-se as raízes e os tubérculos, como a mandioca e a batata, e os cereais, como o milho, o trigo e o arroz (FRANCO et al., 2001). Também está presente em vários resíduos do processamento de alimentos (JIN et al., 1999).

Os diferentes amidos apresentam propriedades diferentes e são utilizados na indústria de alimentos com diferentes propósitos, tais como nutricional, tecnológico, funcional, sensorial e estético. O amido é a matéria-prima mais barata e abundante, principalmente para a alimentação humana, sendo constituído por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, em proporções que variam de acordo com a espécie vegetal fonte desse amido (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

A amilose é formada por uma cadeia linear de unidades de α -D-glicopiranoses unidas por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 1). Ela pode conter de 350 a 10000 unidades de glucose em sua estrutura. Apresenta estrutura helicoidal, α -hélice, formada por pontes de

hidrogênio entre os radicais hidroxilas das moléculas de glucose (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

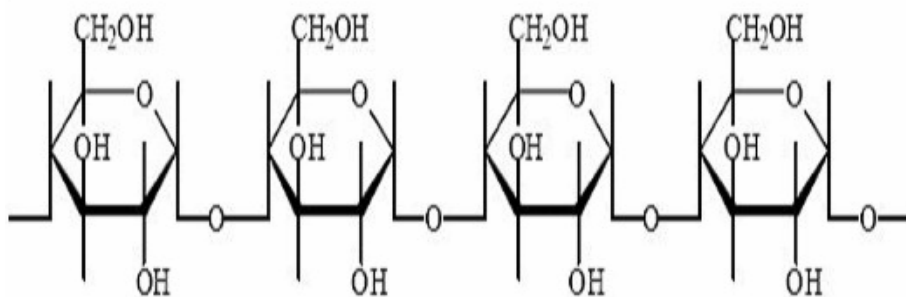


Figura 1: Estrutura da amilose

FONTE: Matuda (2004)

A amilopectina apresenta uma estrutura ramificada, constituída por cadeias lineares de 20 a 25 unidades de α -D-glucose unidas em α -1,4. Essas cadeias estão unidas entre si através de ligações α -1,6 (Figura 2). A amilopectina é constituída por 10 a 500 mil unidades de glucose e apresenta uma estrutura esférica (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

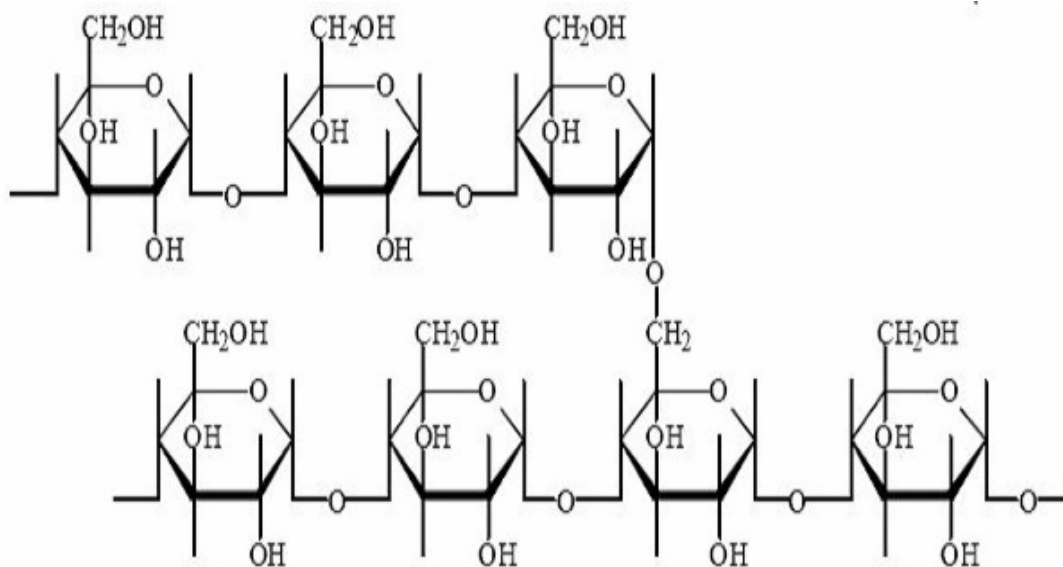


Figura 2: Estrutura da amilopectina

FONTE: Matuda (2004)

A Tabela 1 nos fornece dados referentes às propriedades da amilose e amilopectina.

Tabela 1 - Propriedades da amilose e amilopectina

Polissacarídeo	Amilose	Amilopectina
Peso molecular	50 000 a 200 000	100 000 a vários milhões
Ligações glicosídicas	α -1,4	α -1,4; α -1,6
Suscetibilidade à retrogradação	Alta	Baixa
Produtos da ação da β -amilase	Maltose	Maltose e β -dextrinas
Produtos da ação da amiloglicosidase	D-glucose	D-glucose
Estrutura molecular	Linear	Ramificada

Fonte: Fennema (2000)

A hidrólise do amido, tanto para fins analíticos quanto para industriais, pode ser feita por processo químico e enzimático. O amido não tem sabor, mas seus produtos de hidrólise apresentam gosto adocicado, como a maltose e glucose (FRANCO et al., 2001).

3.2.2 O emprego de resíduos agroindustriais como matéria-prima para processos biotecnológicos

Os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente difundidos em vários segmentos industriais. Isto se deve, principalmente, ao grande desenvolvimento desta área, impulsionado pela busca do aproveitamento de resíduos industriais. Tais processos 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). Além disso, a biotransformação gera resíduos e produtos biodegradáveis. As transformações microbianas têm o direcionamento do sistema de reação para a obtenção de um produto definido. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos disponibiliza substratos alternativos e ajuda a resolver problemas relacionados à disposição inadequada de resíduos sólidos (MARÓSTICA e PASTORE, 2005).

Jin et al. (1999) comentam que existe preocupação sobre os resíduos gerados e problemas de poluição que eles vêm causando. Embora a reciclagem desses recursos precise ser uma atividade economicamente viável para o desenvolvimento sustentável, tanto o

aumento da consciência ambiental quanto os motivos econômicos colaboram na necessidade, de países desenvolvidos e em desenvolvimento, de se fazer melhor uso de seus recursos.

O Brasil, pelas características climáticas e territoriais, possui biodiversidade sem igual no mundo e grande abundância de biomassa e resíduos agro-industriais, que constituem a matéria-prima para os processos biotecnológicos. Esses fatores mostram o desenvolvimento dos bioprocessos no país, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e na redução de custos de diversas substâncias (LEAL et al., 2000).

Segundo Souza e Santos (1998), a América Latina produz mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo que desses, o Brasil produz mais da metade, resíduos esses que poderiam ser mais bem aproveitados.

Nos processos de produção de enzimas para usos industriais, estes resíduos e subprodutos têm recebido interesse especial devido ao comércio anual de enzimas, estimado em US\$ 1,5 bilhões no mundo no ano de 1999 (RIZZATTO et al., 2000).

De acordo com Senhoras (2003), no campo da comercialização de enzimas, o Brasil é consumidor de produtos importados. Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos provenientes da indústria e comércio de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros elementos. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento.

Lana et al. (2001), avaliando diferentes variedades de cenoura para produção de mini cenouras, sugerem que o resíduo desse processo seja destinado à ração animal ou utilizado como adubo orgânico.

Dalsenter (2000) utilizou o bagaço de mandioca como meio de cultivo em processo fermentativo sólido para a produção da enzima amiloglucosidase, utilizando o fungo

Aspergillus awamori ATCC 22342. Também utilizou o bagaço da mandioca e o resíduo sólido do processo de fermentação para produção de inóculo do cogumelo *shiitake*. Pelos resultados obtidos quanto à atividade de amiloglucosidase e produção de inóculo de *shiitake*, foi concluído que o bagaço de mandioca é um resíduo com perspectivas de aplicações para indústrias de transformação.

Silva et al. (2002) estudaram o uso de produção de pectina-liase (Pl) e poligalacturonase (Pg) por cepa de *Penicillium viridicatum* Rfc3, em fermentação em estado sólido usando bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de manga e banana como fontes de carbono. Quando os resíduos foram utilizados isoladamente, o valor máximo de atividade de Pg (30 U g^{-1}) foi observado em meio de farelo de trigo, enquanto que o valor máximo para atividade de Pl (2000 U g^{-1}) foi obtido em meio de bagaço de laranja. Misturas de cascas de banana ou de manga com bagaço de cana-de-açúcar, 50% p/p, resultaram em aumento na produção tanto de Pl quanto de Pg, quando comparado com os experimentos nos quais esses materiais foram usados isoladamente. A mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo, 50% de cada, elevou a produção de Pg e Pl para 55 U.g^{-1} e 3540 U.g^{-1} , respectivamente.

De acordo com Souza et al. (1996), a amilose e amilopectina provenientes da batata mostram alto poder dextrinizante da enzima alfa-amilase sobre esses polissacarídeos, indicando então que provavelmente o resíduo da batata é um bom substrato para a produção da enzima amiloglucosidase.

Zaldivar-Aguero et al. (1997) afirmaram que o meio de cultura é um elemento fundamental em um processo de fermentação, isto se confirma também na produção de amiloglucosidase por *Aspergillus sp.* Esse fungo necessita de maltose para sintetizar grandes quantidades de amiloglucosidase, o que se pode obter em boa quantidade na batata e em seus resíduos.

A grande preocupação ambiental desencadeou uma procura intensa por processos alternativos, as chamadas "tecnologias limpas". As enzimas fazem parte dessas tecnologias e poderão, gradativamente, substituir muitos componentes químicos utilizados nos processos industriais atuais. Isso demonstra a capacidade de minimização de problemas ambientais oferecida pelas enzimas. As enzimas podem ser empregadas em baixas temperaturas e condições amenas, usadas para substituir condições e componentes químicos resultando em economia de energia e diminuição da poluição e utilizadas para o tratamento de resíduos biológicos. Além disso, as enzimas em si são biodegradáveis, ou seja, são facilmente absorvidas pela natureza. Como são altamente específicas, não produzem efeitos inesperados no processo de produção. As indústrias estão diante de um grande desafio. Elas precisam proteger o meio ambiente e, ao mesmo tempo, oferecer os produtos, os serviços e os empregos exigidos pela sociedade. Com a conservação dos recursos naturais e a proteção ao meio ambiente tornando-se cada vez mais importantes, o caminho para novas aplicações de enzimas está aberto nos mais variados tipos de indústrias (NOVOZYMES, 2004).

3.3 ENZIMAS

Provavelmente, a primeira utilização de uma enzima pelo homem foi pela adição de 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. Várias enzimas comerciais foram estudadas e desenvolvidas, como as proteolíticas, pectinolíticas e outras que passaram a ter aplicação nas indústrias de alimentos, além de usos medicinais e domésticos. 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).

As enzimas são catalizadores orgânicos, produzidos por células vivas, que governam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez elaborada por uma célula, uma enzima poderá atuar independentemente da célula se condições apropriadas forem mantidas. Todas as enzimas são compostas basicamente de proteína, embora muitas possuam um grupo prostético não protéico. Uma das principais características das enzimas é sua especificidade sobre o substrato. As enzimas agem sobre um número muito limitado de compostos e não tem qualquer efeito sobre outros (LIMA et al., 2001).

Em biotecnologia, as enzimas são de extrema importância e a maioria delas provêm de microrganismos. O mercado mundial de enzimas é grande, sendo que essas enzimas são produzidas por microrganismos 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).

Muitas enzimas utilizadas de diferentes maneiras são produzidas por fungos. Entre elas temos as amilases, beta - glucanases, celulasas, catalases, glucose – oxidase, lactases, lipases, pectinases, reninas e ligninases. Muitos laboratórios e instituições públicas e privadas vêm despendendo uma grande soma de recursos financeiros e humanos para obter enzimas mais eficientes, de melhor qualidade e menor preço, pelo emprego de tecnologias clássicas e modernas (SERAFINI et al., 2001). Na Tabela 2 estão apresentados alguns metabólitos de uso industrial produzidos por fungos filamentosos.

Tabela 2 - Metabólitos de importância industrial produzidos por fungos filamentosos

Microrganismo	Produto
<i>Aspergillus sp.</i>	Lipases, pentosanases, proteases
<i>A. niger</i>	B-glucanase, celulase, glucoamilase, glucose oxidase, lactase, pectinase
<i>A. oryzae</i>	A-amilase
<i>A. awamori</i>	Glucoamilase
<i>Trichoderma sp.</i>	Dextranase, celulase
<i>Penicillium sp.</i>	Dextranase
<i>Mucor sp.</i>	Renina

Fonte: Wainwright (1992)

A indústria da bioconversão é responsável pela demanda de quatro principais enzimas que são: a protease, a amiloglucosidase, a α -amilase e a glucose-isomerase. Estas 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 do alto grau de especificidade ao substrato em que atuam (ROITMAM et al., 1988).

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

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 à 55°C.

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 glucose e frutose, as amilases são usadas para hidrolisar as moléculas de amido. Nas indústrias de papel, utilizam-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 cerveja para produzir cerveja clara (NOROUZIAN et al., 2006; SPIER et al., 2005). Hansen et al. (1994) citam o uso da amiloglucosidase para a fabricação de sorbitol, um edulcorante utilizado por diabéticos. As amiloglucosidases são glicoproteínas secretadas usualmente com diferentes pesos moleculares num meio de cultura (HEIMO et al., 1997).

Na produção industrial de amiloglucosidase é freqüente o emprego de microrganismos do gênero *Aspergillus*. Verificou-se em cultivos descontínuos uma estabilidade no comportamento do microrganismo relativa à capacidade de crescimento e produção da enzima após três anos de armazenamento da cepa (KILIKIAN et al., 1992).

Labeille et al. (1997) afirmam em seu trabalho que 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 é a amiloglucosidase. A proposta desses autores foi a de desenvolver uma enzima degradante efetiva que reduzisse custos na produção de etanol a partir da farinha de trigo. A preparação enzimática foi desenvolvida por sacarificação de farinha de trigo que foi usada para preparação de etanol e o microrganismo utilizado foi o *Aspergillus niger*. Os autores obtiveram como resultado uma enzima equivalente a padrão (comercial) efetiva na sacarificação de farinha de trigo.

Birch et al. (1981) citam que a amiloglucosidase faz parte do complexo amilo-1,6-glucosidase/ 4- α -D-glucanotransferase, o qual, junto com fosforilase, promove degradação total do glicogênio em glucose-1-fosfato e glucose.

A produção de amiloglucosidases ocorre exclusivamente por meio de fungos, sendo que as características bioquímicas dessa enzima, quando produzida pelo microrganismo *Aspergillus awamori*, são pH ótimo de 4,5, temperatura ótima de ação de 60°C, pH de estabilidade entre 5,0 e 9,0, temperatura de estabilidade acima de 50°C e peso molecular de

83.700 a 88.000 daltons (Rose, 1980). Segundo Tanuja et al. (1997), essa enzima apresenta ponto isoelétrico de 3,4 e abaixo desse valor torna-se carregada positivamente. Esses dados são condizentes com as conclusões obtidas por Hata et al. (1997), que produziram amiloglucosidase utilizando o *Aspergillus oryzae* com as mesmas características da obtida por Rose (1980).

Apesar de outros microrganismos também produzirem amiloglucosidase, a produzida por fungos do gênero *Aspergillus* é preferida por sua maior termoestabilidade. O peso molecular da amiloglucosidase varia de acordo com a fonte fúngica, de 48.000 a 90.000 daltons (NOROUZIAN et al., 2006).

A amiloglicosidase (α -D-1,4 glicanglicohidrolase), também conhecida como glicoamilase, é uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras do amido e de outros polissacarídeos transformando-os em glucose. Sua vantagem reside no fato de alcançar altos rendimentos, próximos ao estequiométrico. A síntese de amiloglicosidase é regulada pelos mecanismos de indução e repressão catabólica. A indução é ocasionada pela presença de amido ou polissacarídeos derivados do amido, enquanto a repressão é resultante da presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como é o caso da glucose, sendo por esta razão conhecida como “efeito glucose” (ALLEN et al., 2002; ANTO et al., 2006; BAI et al., 2006; FACCIOOTTI et al., 1996; HEIMO et al., 1997; MINAMI et al., 1999; NATARAJAN e SIERKS, 1996; NOROUZIAN et al., 2006; PAMBOUKIAN, 1997; SILVA et al., 2005; THORSEN et al., 2006). Várias enzimas são inibidas na presença do produto final da reação. No caso da amiloglucosidase, a glucose exerce efeito inibitório (BESCHKOV et al., 1984; KUSUNOKI et al., 1982).

Uma das demandas da bioindústria tem sido o desenvolvimento do controle de estratégias a fim de manter os processos sob condições ótimas, as quais possam aumentar significativamente a produtividade (KOUTINAS et al., 2003).

As amiloglucosidases fúngicas são mais efetivas em valores ácidos, mas elas possuem um pH ótimo de ação diferente. Por exemplo, uma das três amiloglucosidases produzidas por fungos nematófagos *Arthrobotrys amenospora* foi mais ativa em pH 6,0 e as outras duas em pH 5,6 (NOROUZIAN et al., 2006).

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).

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO SUBSTRATO SÓLIDO

A definição de substrato sólido varia muito entre os pesquisadores que trabalham com processos fermentativos. De acordo com Del Bianchi et al. (2001), a fermentação em estado sólido possui outras denominações como “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio semi-sólido”, ou simplesmente “fermentação semi-sólida”. Como forma abreviada pode-se utilizar a sigla FSS, embora alguns pesquisadores prefiram usar as siglas FMS ou FES.

A fermentação em estado sólido pode ser definida como “processos que se referem à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células e, ao mesmo tempo, não exceda à máxima capacidade de ligação de água com a matriz sólida”,

ressalvando que o substrato não tem que ser necessariamente insolúvel em água e, desta forma, ser sólido (DEL BIANCHI et al., 2001).

Daniel et al. (1996) e Botella et al. (2005) definem a fermentação em substrato sólido como sendo um meio composto de materiais insolúveis em água para o crescimento microbiano. Todavia, o substrato deve conter umidade suficiente absorvida na matriz sólida, sendo seu teor dependente da natureza do material utilizado.

Segundo Rodrigues e Santana (2001), a diferença básica entre as fermentações em estado sólido e cultura submersa está no conteúdo de água do substrato. Enquanto na cultura em estado sólido, o conteúdo de água do substrato varia entre 40 e 80%, na cultura submersa típica, o conteúdo de água é superior a 95%.

A água necessária para o microrganismo se desenvolver neste tipo de processo existe sob forma absorvida ou complexada na matriz sólida, sendo assim, é melhor expressa em termos de atividade de água e não em umidade absoluta (MURTHY et al., 1993).

A fermentação em estado sólido envolve o crescimento de microrganismos em substrato sólido úmido. Os nutrientes do substrato, neste caso, estão heterogeneamente distribuídos, não estando igualmente disponíveis para utilização do microrganismo (LONSANE et al., 1985).

A fermentação em estado sólido é uma técnica bem conhecida e teve um crescimento importante. Para alguns processos específicos, particularmente produção de enzima, os custos dessa técnica são mais baixos quando comparada à fermentação submersa. No campo de produção enzimática foram empregados vários sólidos naturais como trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar, beterraba, restos de banana, batata, chás, coco, maçã e frutas cítricas (BOTELLA, 2005).

Para a produção microbiana de enzimas, podem ser utilizados diferentes processos, sendo mais usados os de fermentação semi-sólida e os de fermentação submersa. No primeiro,

o substrato sólido, arejado e umedecido com água, é misturado e inoculado e o microrganismo cresce durante vários dias e as enzimas são secretadas na superfície úmida do meio sólido, sendo extraídas com água ao final do processo. Na fermentação submersa, o organismo é inoculado no meio esterilizado contido no reator que é mantido com agitação, aeração, temperatura e pH controlados, por períodos que variam de 12 horas até uma semana, conforme o tipo de enzimas e condições empregadas. As enzimas produzidas por esses processos são extracelulares, podem ser facilmente recuperadas da cultura e seu processamento posterior é relativamente simples (ROITMAM et al., 1988). O processo de fermentação semi-sólida, além de prover os nutrientes necessários para a cultura, também serve como um suporte para o crescimento do microrganismo (SELVAKUMAR et al., 1998).

A fermentação em estado sólido (FES) tem sido muito empregada para processos de bioconversão. A FES possui um grande potencial para produção de enzimas. Apresenta, comparativamente à fermentação submersa, um custo de produção menor. A necessidade da redução destes custos requer métodos alternativos, sendo a FES uma dessas alternativas (PANDEY, 1992). Este tipo de fermentação é tradicional em alguns países e possuem alto potencial para a produção de enzimas amilolíticas (SPIER et al., 2005).

Segundo Del Bianchi et al. (2001) e Anto et al. (2006), o processo em estado semi-sólido apresenta algumas vantagens em relação ao processo submerso:

- a) Apresenta uma aceleração na taxa de reação devido ao direto contato entre o substrato e o microrganismo;
- b) Vários estudos apontam que o substrato utilizado é relativamente simples, necessitando, em muitos casos, somente de adição de água ou uma pequena correção do meio com a introdução de fontes de nitrogênio e de outros nutrientes minerais;

- c) Devido à menor quantidade de água empregada, o volume do reator deve ser sempre bem menor que a operação similar em processo submerso, o que irá reduzir os custos de capital investido assim como o espaço ocupado necessário ao processo;
- d) Essa baixa quantidade de água empregada também deve reduzir os custos de capital investido e de energia consumida na recuperação do produto;
- e) A utilização de agitação contínua raramente é necessária, podendo ser empregada, ocasionalmente, apenas uma leve mistura do substrato;
- f) Os baixos teores de umidade empregados, somados à alta concentração de inóculo incorporado ao meio, reduzem, ou muitas vezes até eliminam, o problema de contaminação por outros microrganismos indesejáveis;
- g) As condições de crescimento empregadas são, em geral, similares às condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos, o que possibilita, em muitos casos, maiores rendimentos na obtenção de produtos de utilização industrial;
- h) Em muitos casos, obtém-se um rendimento do processo maior que em comparação à fermentação submersa.

Quando o objetivo da fermentação é a obtenção de uma enzima, é necessário que se conheça em que fase do crescimento do microrganismo ela é formada. Há enzimas que perdem sua atividade logo após ser atingido um pico de produção (SALVA e MORAES, 1992).

Amiloglucosidases podem ser produzidas por fermentação em estado sólido ou submersa (NOROUZIAN et al., 2006).

O pH para produção de amiloglucosidases parece ser melhor se ácido, mas varia de acordo com a fonte fúngica. Por exemplo, para o *Aspergillus niger*, os melhores pHs estão entre 3,5 e 5,0 (NOROUZIAN et al., 2006).

O teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influenciam o sucesso de uma FES. O teor de umidade na FES pode variar entre 18 e 85%, sendo ele estipulado em função do poder de absorção do substrato. Como exemplo, pode citar-se o processo “koji” (cultura de fungos sobre arroz cozido), onde o substrato é moderadamente umedecido durante o cozimento pelo vapor (35 a 40% de água) e mantido úmido pela passagem de ar com 80 a 90% de umidade relativa para o desenvolvimento de determinados fungos em sua superfície (DEL BIANCHI et al., 2001).

Del Bianchi et al. (2001) citam que a produção de amiloglucosidase por *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, em meio à base de farinha de mandioca, farelo de trigo e farelo de arroz, com temperatura de cultivo entre 28 e 30°C, valores iniciais de umidade de 55% e pH 4,7, foi 32 vezes maior nos meios com menor teor de umidade que em meio líquido.

Mantovani e Almeida (2005) confirmaram em seu trabalho que *A. awamori* cresceu e produziu a enzima β -frutofuranosidase tanto por fermentação submersa quanto por semi-sólida, atingindo o máximo de produção enzimática em 120h de cultivo. Porém na fermentação semi-sólida o microrganismo sintetizou maior quantidade da enzima estudada.

Mitchell et al. (2005) concluíram que a fermentação em estado sólido é potencialmente superior à fermentação submersa para a produção de produtos microbianos selecionados em seu experimento, que teve por objetivo desenvolver modelos matemáticos de diferentes tipos de bioreatores usando fermentação em estado sólido.

Nos processos de FES, pode-se utilizar tanto microrganismos em seu estado natural, como nos casos de ensilagem ou compostagem, quanto na sua forma pura individual, em que se enquadram as pesquisas, ou, raramente, em forma de culturas mistas. Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento nessas condições. Como

exemplos de culturas utilizadas podem-se citar *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas (DEL BIANCHI et al., 2001).

A FES tem se mostrado apta a realizar vários tipos de transformações, seja ela por fungos, leveduras ou bactérias. O que irá determinar a escolha da linhagem mais apropriada, durante a fase de seleção de microrganismos, será o estudo detalhado do processo, visando obter o melhor meio de cultura e as melhores condições ambientais da fermentação, principalmente no que se refere à temperatura e umidade do sistema (DEL BIANCHI et al., 2001).

De forma geral, os materiais utilizados como substratos para a FES são provenientes de matérias-primas, produtos ou resíduos agroindustriais, sendo que, dependendo do produto que se deseja obter, estes dois últimos têm a preferência nas pesquisas, devido ao baixo ou nenhum valor comercial (DEL BIANCHI et al., 2001).

Pode-se também incorporar solução nutriente ao substrato sólido, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do microrganismo para a fermentação desejada. Em pesquisas para produção de α -galactosidase por *Aspergillus niger*, no meio composto por farelo de trigo, adicionou-se uréia como fonte de nitrogênio, água de maceração de milho (fonte de fatores de crescimento), farinha de soja ou farinha guar (indutores da enzima) e ácido cítrico (favorece a produção da enzima desejada) (DEL BIANCHI et al., 2001).

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento, a esporulação dos microrganismos e a formação do produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI et al., 2001).

O controle do pH durante a fermentação em estado sólido, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI et al., 2001).

Para um bom rendimento e uma rápida fermentação em substrato sólido é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar (DEL BIANCHI et al., 2001).

O emprego da agitação em um processo em estado sólido pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer tanto a transferência gasosa pela exposição de partículas do substrato à atmosfera do fermentado quanto a troca de calor dentro do meio. A agitação, porém, devido à fragmentação mecânica do micélio, pode interferir na formação dos esporos e no desenvolvimento natural do microrganismo. Pode causar também a compactação do meio e a danificação das hifas (DEL BIANCHI et al., 2001).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam para os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (SANTOS et al., 2005).

As fermentações por fungos constituem processos complexos, nos quais muitos parâmetros são desconhecidos. Num meio não-Newtoniano e viscoso, calor e exigências de transferência de massa, grande diversidade de fungos com morfologia e cinética

desconhecidas são alguns problemas em fermentações fúngicas. Esses problemas podem ser mais acentuados quando meios heterogêneos são utilizados como, por exemplo, farelo de trigo e alguns resíduos da agroindústria (KOUTINAS et al., 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

Foram utilizadas culturas puras do microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112, obtidas no laboratório de Bioengenharia da UNESP – São José do Rio Preto. A cepa foi mantida em meio PDA acidificado (Potato Dextrose Agar) sob refrigeração e repicagem feita, no mínimo, a cada 15 dias.

A suspensão de esporos foi feita acrescentando-se 10 mL de água destilada estéril em cada tubo de ensaio contendo a cultura de *A. awamori* seguida de agitação a fim de desprender os esporos do meio. Essa suspensão foi transferida para um frasco estéril para posterior contagem de esporos e inoculação nos substratos.

Determinou-se que a concentração de esporos a ser utilizada seria da ordem de 10^5 esp/g de meio de cultivo, a mesma utilizada por Pamboukian (1997). Assim, após contagem dos esporos em câmara de Neubauer, procedeu-se, quando necessária, à correção da concentração na ordem de 10^7 esp/mL de suspensão, já que a quantidade de meio de cultivo utilizada foi fixada em 50g.

A concentração de esporos nos frascos de fermentação foi calculada com a utilização da Equação I.

$$C_{\text{esp}} = (C_{\text{susp}} \times V_{\text{susp}}) \times M_{\text{m}}^{-1} \quad \text{Equação I}$$

Onde:

C_{esp} – concentração de esporos nos frascos de fermentação (esp/g)

C_{susp} – concentração de esporos na suspensão de inoculação (esp/mL)

V_{susp} – volume da suspensão de esporos utilizado para inoculação dos frascos (mL)

M_{m} – massa de meio de cultivo (g)

4.2 RESÍDUOS UTILIZADOS COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO

Os substratos foram preparados com resíduos doados pela Vapza, empresa situada no Município de Castro, no Estado do Paraná. A Vapza produz vegetais que, depois de embalados e esterilizados, não precisam de refrigeração antes do consumo. Os resíduos da Vapza provêm do descarte gerado na etapa de descascamento mecânico de cenouras e batatas cozidas a vapor (Figura 3). Estes resíduos hoje vêm sendo depositados em silos e destinados à alimentação animal.

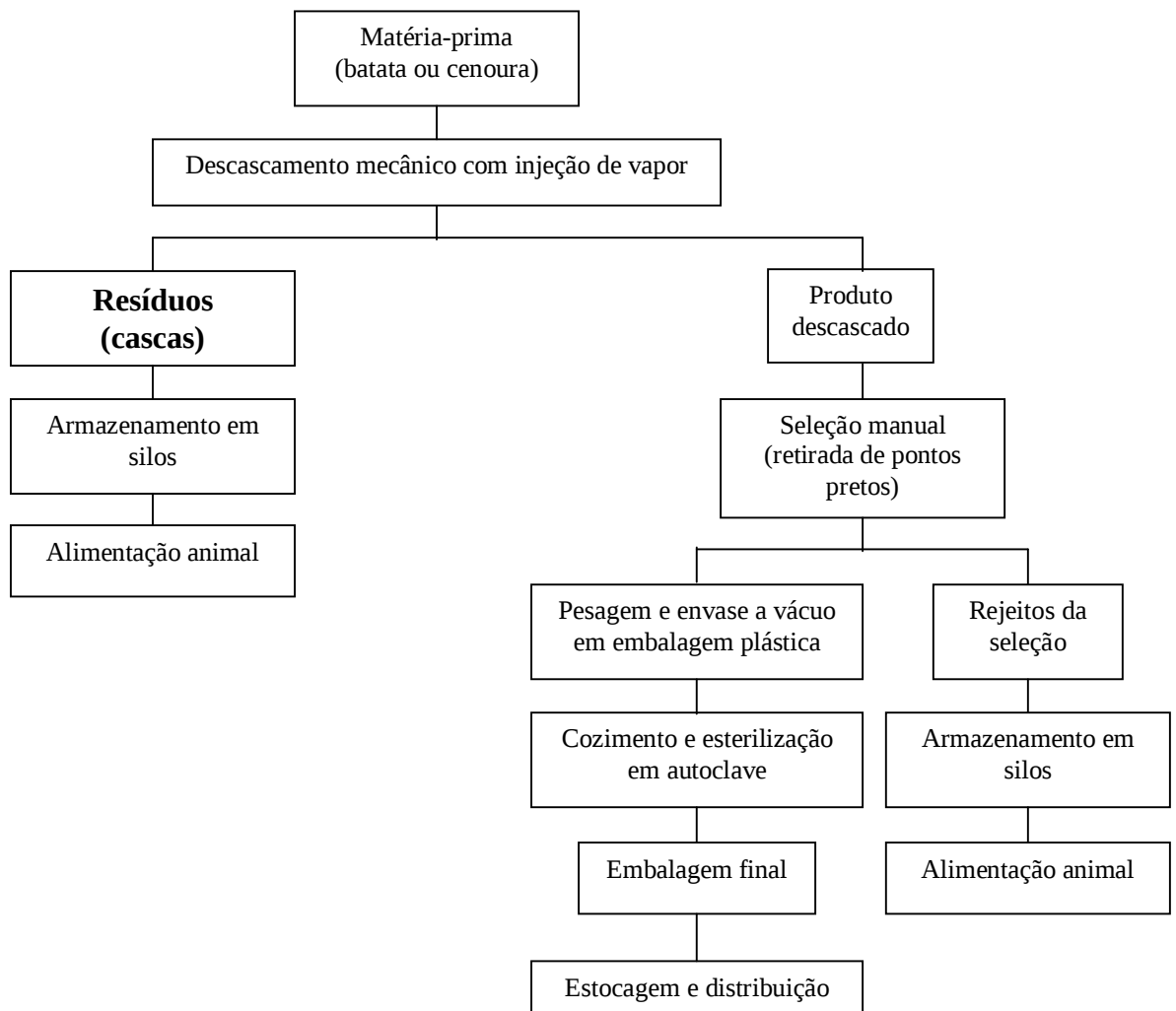


Figura 3 – Fluxograma do processamento de batata e cenoura

4.2.1 Caracterização dos resíduos

A cada lote de resíduo recebido era feita sua caracterização físico-química, na qual constavam as seguintes determinações: teor de amido, açúcares redutores (AR), teor de glicose, umidade, cinzas, teor de fósforo, fibras, lipídeos, proteínas, teor de carbono e teor de nitrogênio.

4.2.1.1 Teor de amido

O teor de amido foi calculado em porcentagem pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína, lipídeos, fibras, glicose, ART e cinzas.

4.2.1.2 Teor de açúcares redutores (AR)

Essa análise foi realizada através da técnica de Somogyi–Nelson, segundo metodologia descrita em Somogyi (1952).

4.2.1.3 Teor de glicose

Determinou-se o teor de glicose pelo método GOD (glicose–oxidase) da marca Gold Analisa, método enzimático com glucose oxidase com utilização de curva padrão, de acordo com a metodologia descrita Pamboukiam (1997) e feita por Zaldivar –Aguero et al (1997).

Quando as amostras apresentavam a cor muito acentuada durante a diluição, era feita uma filtração das amostras com adição de carvão ativado a fim de facilitar a leitura da absorbância sem comprometimento no resultado.

4.2.1.4 Teor de umidade e de cinzas

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico de secagem em estufa, segundo descrito em Instituto Adolfo Lutz (1985), e o teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla de acordo com a AOAC (1997).

4.2.1.5 Teor de fósforo

O teor de fósforo foi medido pela metodologia de digestão ácida com posterior leitura em espectrofotômetro a 520 nm, segundo descrito em Silva (1981).

4.2.1.6 Teor de fibras

O teor de fibras foi medido segundo metodologia descrita em Ascar (1985).

4.2.1.7 Teor de lipídeos

O teor de lipídios totais foi determinado pelo método de extração Soxhlet, segundo metodologia descrita em Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.2.1.8 Teor de nitrogênio e proteína

Os valores para proteína foram calculados a partir dos teores de nitrogênio total, usando os fatores de conversão recomendado por Jones (1941). O nitrogênio total foi determinado pelo método Kjeldahl, segundo descrito por Barbano et al (1984).

4.2.1.9 Teor de carbono

A determinação do teor de C na amostra foi estimada utilizando-se a Equação II, proposta por ADAMS et al. (1951) onde se considera que para a maioria dos materiais biológicos, o conteúdo de carbono está entre 45 a 60 por cento da fração de sólidos volátil. Assumindo 55 por cento temos:

$$\% \text{ Carbono} = (\% \text{ Sólidos Voláteis}) / 1.8$$

Equação II

Onde:

$$\% \text{ Sólidos Voláteis} = 100 - \% \text{ Cinzas}$$

4.2.1.10 Razão C/P e C/N

As razões C/P e C/N foram definidas como sendo o teor de carbono presente no resíduo dividido pelo teor de fósforo e nitrogênio, respectivamente, encontrado nas amostras.

4.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO

Em todos os ensaios foram pesados 50g de resíduo do processamento de batata e/ou cenoura num erlenmeyer de 250 mL que, após fechado com tampão de algodão, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos (Figura 4).



Figura 4 – Ilustração dos meios preparados com resíduos do processamento de batata, à esquerda, e cenoura, à direita, a serem fermentados

Na Tabela 3 estão apresentadas as datas de recebimento dos resíduos e os ensaios em que foram utilizados.

Tabela 3 – Datas de recebimento dos lotes e ensaios em que foram utilizados

Ensaio	Data de recebimento dos resíduos utilizados
Ensaio com meios com teor de umidade de 90, 92 e 98%, relacionados ao tempo de fermentação e à agitação	05/11/04
Ensaio com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%	11/06/05
Ensaio com meios suplementados com fontes de nitrogênio e fósforo	02/03/05
Ensaio com meios adicionados de solução tampão citrato-fosfato ou tampão acetato	27/05/05

4.4 DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS

Foram realizados vários ensaios com o objetivo de se avaliar a possibilidade de se produzir amiloglicosidase utilizando-se como substrato os resíduos do processamento de batata e/ou cenoura com diferentes teores de umidade, com e sem agitação, variação no tempo de fermentação, suplementados ou não com fontes de fósforo e nitrogênio, com e sem correção de pH e com diferentes soluções tampão.

A seguir será explicada a metodologia utilizada em cada ensaio.

4.4.1 Ensaio com meios com teor de umidade de 90, 92 e 98%, relacionados ao tempo de fermentação e à agitação

Para a realização dos ensaios foram utilizados resíduos do processamento de batata e cenoura testados separadamente. O resíduo do processamento de batata, que apresentava o teor de umidade natural de 89,90%, teve seu teor de umidade corrigido para 90 e 98% antes de ser pesado. O resíduo do processamento de cenoura, que apresentava teor de umidade natural de 92%, foi utilizado da maneira em que foi coletado e com o teor de umidade corrigido para 98% antes de ser pesado.

Após a esterilização do substrato, inoculou-se 1 mL de suspensão preparada com *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Os meios foram então colocados para fermentar, conforme

condições expostas na Tabela 4. Tanto os ensaios realizados sob agitação de 180 bpm, quanto os ensaios sem agitação, foram realizados à temperatura ambiente, média de 20°C. Em ambos os ensaios com e sem agitação, foram testados dois diferentes tempos de fermentação de 24 e 72 horas. Para avaliar a significância dos fatores variados nesse experimento, fez-se o cálculo da média e dos efeitos para comparação dos dados.

Tabela 4- Esquema dos ensaios da influência dos teores de umidade relacionados com tempo de fermentação e agitação

Ensaio	Umidade (%)	Tempo (h)	Agitação (180 bpm)	Substrato (resíduo)
1	90	24	S	Batata
2	98	24	S	Batata
3	90	72	S	Batata
4	98	72	S	Batata
5	90	24	C	Batata
6	98	24	C	Batata
7	90	72	C	Batata
8	98	72	C	Batata
9	92	24	S	Cenoura
10	98	24	S	Cenoura
11	92	72	S	Cenoura
12	98	72	S	Cenoura
13	92	24	C	Cenoura
14	98	24	C	Cenoura
15	92	72	C	Cenoura
16	98	72	C	Cenoura

4.4.2 Ensaio com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%

Para a realização dos ensaios foram utilizados resíduos do processamento de batata e cenoura testados separadamente e numa combinação de 50% de cada resíduo. Para se chegar aos teores de umidade desejados, os resíduos foram secos em estufa a 48°C, triturados e passados em peneira com 60 mesh de abertura. Os resíduos tiveram o teor de umidade ajustado para os valores desejados com adição de água deionizada para, então, serem pesados 50g de resíduo com a umidade corrigida, nos erlenmeyers que serviram como fermentadores.

Após esterilização dos meios, procedeu-se à inoculação dos mesmos com 1mL de suspensão de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. A descrição dos ensaios está apresentada na Tabela 5. O processo de fermentação, em todos os ensaios, foi realizado em estufa à temperatura de 30°C pelo período de 72 horas.

Tabela 5 - Esquema dos ensaios com resíduo do processamento de batata e do processamento de cenoura em diferentes níveis de umidade

Ensaio	Umidade (%)	Resíduo utilizado
1	30	Batata
2	50	Batata
3	70	Batata
4	90	Batata
5	30	Cenoura
6	50	Cenoura
7	70	Cenoura
8	90	Cenoura
9	30	Batata e cenoura
10	50	Batata e cenoura
11	70	Batata e cenoura
12	90	Batata e cenoura

4.4.3 Ensaio com meios suplementados com fontes de nitrogênio e fósforo

Para a realização dos ensaios os resíduos do processamento de batata e cenoura foram utilizados nos teores de umidade em que foram coletados na empresa. O meio de batata apresentou umidade de 89,40%, o de cenoura de 92,78% e a mistura de 50% de cada um apresentou umidade de 91,09%.

Estes ensaios foram realizados com adição de fontes de nitrogênio e fósforo, juntas ou isoladas, aos resíduos de batata e/ou cenoura, conforme descrito nas Tabelas 6 e 7.

Nos ensaios realizados somente com adição de fonte de fósforo, utilizou-se fosfato de sódio dibásico nas quantidades de 3,8, 7,6 e 11,4g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{kg}$ de meio, mesmas concentrações utilizadas por Zaldivar-Aguero et al (1997), que trabalharam com meios à base de farinha de mandioca como fonte de carbono (Tabela 6).

Nos ensaios realizados com adição de fontes de fósforo e nitrogênio, utilizou-se fosfato de sódio dibásico na concentração de 7,6g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{kg}$ de meio e sulfato de amônia, como fonte de nitrogênio, na concentração de 1,1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{kg}$ de meio, quantidade utilizada por Chiquetto (1991). A descrição dos ensaios está apresentada na Tabela 7.

Estes ensaios foram realizados com e sem correção de pH do meio antes da fermentação, para que ficasse igual a 5,0. A correção de pH foi feita utilizando-se NaOH 1,5M e HCl 2M, para se elevar ou abaixar o pH, respectivamente, de acordo com a necessidade. O processo de fermentação ocorreu sem agitação e à temperatura ambiente.

Em cada erlenmeyer, após adição do substrato, das fontes de fósforo e/ou nitrogênio, da correção do pH e da esterilização, foi adicionado 1 mL de suspensão de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Os meios foram, então, colocados em estufa a 30°C por 72 horas. Para avaliar a significância dos fatores variados nesse experimento, fez-se o cálculo da média e dos efeitos para comparação dos dados.

Tabela 6 – Esquema dos ensaios utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata, resíduo do processamento de cenoura e mistura com 50% (p/p) de cada resíduo suplementados com Na_2HPO_4

Ensaio	Razão C/P	Suplementação com Fósforo ($\text{gNa}_2\text{HPO}_4/50\text{g}$ de meio)	Resíduo utilizado como meio para fermentação (50 g)	Umidade (%)	pH inicial
1	3448	0	Batata	89,40	5,10
2	666,28	0,19	Batata	89,40	5,30
3	332,34	0,38	Batata	89,40	5,45
4	222,45	0,57	Batata	89,40	5,60
5	2747	0	Cenoura	92,78	4,90
6	663,57	0,19	Cenoura	92,78	5,10
7	330,99	0,38	Cenoura	92,78	5,30
8	221,55	0,57	Cenoura	92,78	5,50
9	3058	0	50% batata e 50% cenoura	91,09	5,00
10	664,93	0,19	50% batata e 50% cenoura	91,09	5,20
11	331,66	0,38	50% batata e 50% cenoura	91,09	5,30
12	222	0,57	50% batata e 50% cenoura	91,09	5,50

Tabela 7 – Esquema dos ensaios realizados para avaliação da influência da suplementação com Na_2HPO_4 , com e sem correção do pH, utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata e resíduo do processamento de cenoura

Ensaio	Razão C/P	Razão C/N	Suplementação com Fósforo (g Na_2HPO_4 /50g de meio)	Suplementação com Nitrogênio (g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /50g de meio)	Resíduos utilizados (50g)	Correção de pH para 5,0	Umidade (g%)
1	2747	499,49	0	0	Cenoura	Não	92,78
2	330,99	499,49	0,38	0	Cenoura	Não	92,78
3	2747	352,21	0	0,11	Cenoura	Não	92,78
4	330,99	352,21	0,38	0,11	Cenoura	Não	92,78
5	3448	220,67	0	0	Batata	Não	89,40
6	332,34	220,67	0,38	0	Batata	Não	89,40
7	3448	186,38	0	0,11	Batata	Não	89,40
8	332,34	186,38	0,38	0,11	Batata	Não	89,40
9	2747	499,49	0	0	Cenoura	Sim	92,78
10	330,99	499,49	0,38	0	Cenoura	Sim	92,78
11	2747	352,21	0	0,11	Cenoura	Sim	92,78
12	330,99	352,21	0,38	0,11	Cenoura	Sim	92,78
13	3448	220,67	0	0	Batata	Sim	89,40
14	332,34	220,67	0,38	0	Batata	Sim	89,40
15	3448	186,38	0	0,11	Batata	Sim	89,40
16	332,34	186,38	0,38	0,11	Batata	Sim	89,40

4.4.4 Ensaio de determinação da atividade enzimática com diferentes soluções tampão

Para a realização dos ensaios foram utilizados os resíduos do processamento de batata e cenoura separadamente e combinados na proporção de 1:1. O resíduo de batata apresentava teor de umidade de 89,04%, o de cenoura de 92,80% e a combinação dos dois 90,92%.

Para determinação de atividade enzimática da enzima amiloglucosidase, foram testadas duas soluções tampão que usualmente são utilizadas, tampão citrato-fosfato com 0,1 M, pH 4,2 e tampão acetato 0,02 M, pH 4,2. Os ensaios foram realizados segundo esquema apresentado na Tabela 8.

Depois de esterilizados, os substratos foram inoculados com 1 mL de suspensão de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Os meios foram colocados em estufa a 30°C para fermentar por 72 horas.

Cada solução tampão foi adicionada ao extrato enzimático, após filtração do mesmo, na proporção de 1:1, no momento da determinação da ação enzimática. O esquema de utilização de tampão citrato-fosfato ou acetato está descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Esquema dos ensaios com determinação da atividade enzimática utilizando-se solução tampão acetato 0,02M, pH 4,2 e tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2

Ensaio	Tampão	Resíduo
1	Citrato - fosfato pH 4,2	Cenoura
2	Citrato - fosfato pH 4,2	Batata
3	Citrato - fosfato pH 4,2	50% batata e 50% cenoura
4	Acetato pH 4,2	Cenoura
5	Acetato pH 4,2	Batata
6	Acetato pH 4,2	50% batata e 50% cenoura

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1 Preparo da solução tampão acetato 0,02 M, pH 4,2 com 4% (p/v) de amido

Para o preparo dessa solução, utilizou-se 4 g de amido solúvel que foi dissolvido em 100 mL de tampão acetato 0,02 M, pH 4,2. Para melhor dissolução do amido no tampão, a solução foi aquecida até completa homogeneização da amostra.

4.5.2 Determinação da atividade enzimática para os ensaios descritos nos itens 4.4.1, 4.4.3 e 4.4.4

Para a verificação da ação enzimática, o meio fermentado foi centrifugado. Foram retirados 10 mL do sobrenadante (extrato enzimático) obtido na centrifugação. Em seguida foram pipetados 3 mL do extrato enzimático, que foi levado à fervura em tubos de ensaio pelo tempo de 15 minutos para inativação da enzima. Ao extrato inativado foi adicionado 3 mL de solução tampão acetato, pH 4,2, com 4% (p/v) de amido. A reação enzimática foi realizada a 60°C por 1 hora, com quantidade equivalente de extrato enzimático e tampão acetato 0,02 M, pH 4,2, com 4%(p/v) de amido. Determinou-se o teor de glicose da solução inativada e da solução que sofreu a ação enzimática a fim de se verificar se houve diferença nos teores

de glicose sem a ação e depois da ação da enzima. A atividade enzimática (U), foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de glicose em 1 mL de extrato enzimático por minuto nas condições padronizadas (amido em excesso, temperatura de 60° C e pH 4,2). A quantidade de glicose gerada foi determinada pelo método GOD (Gold Analisa Glicose PP) especificada no item 4.2.1.3. O resultado da atividade enzimática foi definido com a Equação III.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \text{GDAE} - \text{GAAE} \quad \text{Equação III}$$

Onde:

GAAE – Teor de glicose sem a ação enzimática (µg)

GDAE – Teor de glicose depois da ação enzimática (µg)

4.5.3 Determinação da atividade enzimática para os ensaios descritos no item 4.4.2

Devido ao baixo teor de umidade e dificuldade em se obter o sobrenadante durante a fase de centrifugação para os ensaios descritos no item 4.4.2, a metodologia para obtenção do extrato enzimático aplicada nesses casos foi realizada de outra maneira. Aos meios fermentados foram acrescentados 100 mL de água destilada. Foi feita a homogeneização dos meios com posterior agitação a 180 bpm (batidas por minuto) em mesa agitadora pelo período de meia hora para maceração. Na sequência, o meio macerado foi filtrado em papel de filtro a fim de se obter extrato enzimático. Em seguida foram pipetados 3 mL do extrato enzimático, que foi levado à fervura em tubos de ensaio pelo tempo de 15 minutos para inativação da enzima. Ao extrato inativado foi adicionado 3 mL de solução tampão acetato 0,02 M, pH 4,2, com 4% (p/v) de amido. A reação enzimática foi realizada a 60°C para por 1 hora, com quantidade equivalente de extrato enzimático e tampão acetato, pH 4,2, com 4% (p/v) de amido. Determinou-se o teor de glicose da solução inativada e da solução em que ocorreu ação enzimática a fim de se verificar se houve diferença nos teores de glicose sem e depois da

ação da enzima. A atividade enzimática, U, foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de glicose em 1 mL de extrato enzimático por minuto nas condições padronizadas (amido em excesso, temperatura de 60° C e pH 4,2). A quantidade de glicose gerada foi determinada pelo método GOD (Gold Analisa Glicose PP) especificada no item 4.2.1.3. O resultado da atividade enzimática foi definido com a Equação III.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das determinações realizadas para caracterização dos resíduos de acordo com os lotes recebidos.

Tabela 9 – Caracterização dos diferentes lotes de resíduos do processamento de batata e cenoura, expressos em base úmida, de acordo com as datas de recebimento (valores por 100g de amostra a partir da média das duplicatas)

Análises	Resíduo de batata				Resíduo de cenoura			
	05/11/04	02/03/05	27/05/05	11/06/05	05/11/04	02/03/05	27/05/05	11/06/05
Cinzas (g)	0,57	0,70	0,61	0,86	1,00	1,10	0,91	0,96
Lipídeos (g)	0,38	0,21	0,54	0,03	0,26	0,10	0,22	0,16
Proteínas (g)	0,73	1,54	1,20	1,67	0,62	0,68	0,65	0,44
Fibras (g)	0,54	0,44	0,56	0,89	1,57	0,98	1,45	1,25
Glicose (g)	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,13	0,28	0,20	0,17
AR (g)	1,44	0,09	0,14	0,21	0,12	0,44	0,10	0,07
Umidade (g)	89,90	89,40	89,08	84,50	92,00	92,78	92,80	93,50
Amido (g)	6,42	7,63	7,87	11,84	4,30	3,72	3,67	3,45
Fósforo (g)	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02
Nitrogênio (g)	0,12	0,25	0,19	0,27	0,10	0,11	0,10	0,07
Razão C/P	5523,89	2758,33	920,28	5507,78	1833,33	2747,22	1835,00	2751,11
Razão C/N	460,32	220,67	290,61	203,99	550,00	499,49	550,50	786,03

n.d. – não detectado

Arévalo-Pinedo e Murr (2005) determinaram a composição química de cenoura fresca (*Daucus carota*) e obtiveram valores de 90,45%, 0,55% e 2,29% para teor de umidade, proteína e açúcares, respectivamente.

A Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos, presente no site da ANVISA (2005), (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), apresenta a composição centesimal da batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), cozida por 20 minutos, com os seguintes teores: 85,40% de umidade, 1,50% de proteína, 0,10% de lipídios totais, 12,60% de carboidratos, 1,60% de fibras e 0,40% de cinzas. A composição centesimal de cenoura (*Daucus carota* L.),

Beta 3, cozida por 10 minutos, apresentada na Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos do site da ANVISA (2005) é de 95,55% de umidade, 0,44% de proteínas, 0,19% de lipídios totais, 3,51% de carboidratos, 0,31% de cinzas e 2,03 de fibra alimentar total.

Comparando-se os dados obtidos em literatura com os apresentados na Tabela 3, observa-se que o teor de umidade do resíduo de cenoura ficou entre 92,00 e 93,50%, abaixo do apresentado no site da ANVISA, 95,55%. O teor de proteínas se manteve acima do apresentado no site da ANVISA, entre 0,62 e 0,68%, com exceção do resíduo coletado no dia 11/06/2005, que apresentou 0,44% de proteína. O resíduo analisado também apresentou maior teor de carboidratos e cinzas que o indicado no site da ANVISA. Já o teor de fibras das amostras de resíduo de cenoura apresentou valores mais baixos, entre 0,98 e 1,57%, que o apresentado no site da ANVISA, de 2,03%.

Comparando-se os dados de composição do resíduo de batata com a composição de batata disponível no site da ANVISA, observa-se que o teor de umidade do resíduo de batata, entre 84,5 e 89,9%, apresentou valores próximos ao da batata cozida, de 85,4%. O teor de proteína, entre 0,73 e 1,67%, apresentou valores abaixo e acima do apresentado no site da ANVISA, de 1,50%. O teor de fibras, que ficou entre 0,44 e 0,89%, também ficou abaixo do apresentado pela ANVISA, de 1,6%. Já o teor de cinzas, entre 0,57 e 0,86%, apresentou valores sempre superiores que o apresentado pela ANVISA.

Essas diferenças entre os dados apresentados se deve ao fato das variedades analisadas não serem as mesmas e das amostras também serem provenientes de partes diferentes. Enquanto as amostras analisadas pela ANVISA são da batata e cenoura inteiras e cozidas, as amostras analisadas neste trabalho são das cascas junto com pequena parte da polpa de batata e cenoura cozidas.

5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS COM TEOR DE UMIDADE DE 90, 92% E 98%, RELACIONADOS COM TEMPO DE FERMENTAÇÃO E AGITAÇÃO

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de atividade enzimática obtidos com resíduo de batata e cenoura, variando-se as condições de umidade, tempo de fermentação e agitação, de acordo com as combinações apresentadas na Tabela 4.

Nota-se que os melhores resultados foram obtidos com tempo de fermentação de 72h. O melhor resultado de atividade enzimática, 725,00 U/mL, foi conseguido com substrato à base de batata, umidade de 98% e sob agitação (ensaio 8).

Utilizando-se resíduo de cenoura como substrato, o melhor resultado obtido foi referente à condição onde o teor de umidade do meio foi de 98%, tempo de fermentação de 72 h e sem agitação (ensaio 12), onde a atividade enzimática foi de 483,33 U/mL.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 10 e comparando-os com os resultados de análises dos efeitos apresentados na Tabela 11, observa-se que o fator que se mostrou mais significativo neste ensaio foi o tempo de fermentação, sendo o tempo de 72 h o que apresentou melhores resultados de atividade enzimática.

É possível que o emprego de uma agitação mais intensa tivesse proporcionado melhores resultados em relação à atividade da amiloglucosidase, e o fator agitação se apresentasse mais significativo, pois o meio encontrava-se com viscosidade alta, o que dificultou uma agitação mais efetiva. O fator agitação foi significativo quando se utilizou resíduo do processamento de batata como substrato, porém quando se utilizou resíduo do processamento de cenoura, esse fator não se mostrou significativo.

Tabela 10 - Resultados dos ensaios da influência dos teores de umidade relacionados com tempo de fermentação e agitação

Ensaios	Umidade (%)	Tempo (h)	Agitação (180 bpm)	Substrato (resíduo)	Atividade enzimática (U/mL)
1	90	24	S	Batata	3,33
2	98	24	S	Batata	35,00
3	90	72	S	Batata	545,00
4	98	72	S	Batata	580,00
5	90	24	C	Batata	3,33
6	98	24	C	Batata	3,33
7	90	72	C	Batata	635,00
8	98	72	C	Batata	725,00
9	92	24	S	Cenoura	51,66
10	98	24	S	Cenoura	40,00
11	92	72	S	Cenoura	441,66
12	98	72	S	Cenoura	483,33
13	92	24	C	Cenoura	80,00
14	98	24	C	Cenoura	48,33
15	92	72	C	Cenoura	453,33
16	98	72	C	Cenoura	393,33

Tabela 11 – Efeitos dos fatores dos ensaios da Tabela 10

	Batata	Cenoura
Fator	Efeito	Efeito
Umidade	39,17	-15,42
Tempo	428,75	289,58
Agitação	50,83	-10,42
Umidade + Tempo	23,33	6,25
Umidade + Agitação	5,83	-30,42
Tempo + Agitação	66,67	-28,75
Umidade + Tempo + Agitação	21,67	-20,42
Média	316,25	248,96

Segundo Ozbal e Kutsal (1991) e Yamane et al. (1995), que trabalharam com o cultivo de *A. gosypii* e *Arthrobacter* sp. em FES, os melhores resultados para a produção de riboflavina foram obtidos sob agitação de 300 e 600 rpm, respectivamente, para cada microrganismo, mostrando que, para a FES, uma agitação mais vigorosa pode ser favorável ao crescimento do microrganismo e produção enzimática.

Soares et al. (1999) estudaram a metodologia de determinação de atividade de biocatalizador (amiloglucosidase) imobilizado em quitina, utilizando diferentes reatores e

concluíram que, com agitação entre 1200 e 1900 rpm, houve um ligeiro aumento do valor da atividade de amiloglucosidase com o aumento da agitação. No entanto, esse acréscimo estava situado na faixa de erro experimental, podendo-se concluir que a agitação empregada nesses ensaios foi insuficiente e não significativa para o aumento da produção da enzima.

5.3 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS COM TEOR DE UMIDADE DE 30, 50, 70 E 90%

Para a verificação da influência dos teores de umidade em níveis eqüidistantes na atividade de amiloglucosidase, foram testados quatro teores de umidade, 30, 50, 70 e 90%, utilizando-se resíduos previamente secos e com teor de umidade corrigido para os níveis desejados, conforme descrito no item 4.4.2.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 12, observa-se que nos ensaios realizados com o resíduo do processamento de batata, o melhor resultado ocorreu no ensaio 1, obtendo-se atividade enzimática de 141,38 U/mL, em umidade de 30 %.

Quando o resíduo utilizado foi o de processamento de cenoura, nota-se que o melhor resultado de atividade enzimática obtido foi 65,98 U/mL, no ensaio 6, com umidade de 50%.

A umidade mais baixa favoreceu a produção e atividade da amiloglucosidase, quando utilizado resíduo do processamento de batata como meio fermentativo, porém foi desfavorável quando o resíduo utilizado foi o de cenoura.

Com a mistura dos resíduos do processamento de batata e cenoura na proporção de 1:1, obteve-se como melhor resultado de atividade enzimática 55,77 U/mL, obtido com meio com 70% de umidade.

Tabela 12 - Resultados dos ensaios com resíduo do processamento de batata e do processamento de cenoura em diferentes níveis de umidade

Ensaio	Umidade (%)	Resíduo utilizado	Atividade enzimática (U/mL)
1	30	Batata	141,38
2	50	Batata	134,53
3	70	Batata	138,78
4	90	Batata	99,68
5	30	Cenoura	4,57
6	50	Cenoura	65,98
7	70	Cenoura	21,48
8	90	Cenoura	52,57
9	30	Batata e cenoura	0,50
10	50	Batata e cenoura	1,15
11	70	Batata e cenoura	55,77
12	90	Batata e cenoura	40,22

Mantovani e Almeida (2005) constataram em seu trabalho que, para a produção da enzima β -frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) por *Aspergillus awamori*, o emprego de fermentação semi-sólida conduziu a melhores resultados em relação à atividade enzimática quando comparada ao cultivo submerso, obtendo-se até 48 U.mL⁻¹ e 32 U.mL⁻¹, respectivamente. A literatura cita parâmetros cinéticos para fermentações submersas e fermentação em estado sólido de vários *Aspergillus* e também em meios sintéticos ou heterogêneos, os quais divergem bastante (BRAND et al., 2001; CUI et al., 1998; HELLENDORF et al., 1997).

Anto et al. (2005) obtiveram atividade máxima de AMG de 110 U/gds (g de substrato seco), utilizando farelo de trigo como substrato e *Aspergillus sp.* como agente fermentador em fermentação sólida. Afirmaram que o bom resultado pode ser atribuído à eficiente circulação de ar entre os grânulos do substrato proporcionado pelo teor de umidade mais baixo a partir da fermentação em estado sólido.

Mesmo com os teores de umidade de 70 e 90%, os substratos utilizados não tinham características de fermentação submersa, pois a farinha dos resíduos utilizados possui alto poder de absorção de água.

Singh e Soni (2001) testaram a influência de diferentes níveis de mistura de água destilada e farelo de trigo para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus oryzae*, utilizando os seguintes níveis 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 e 1:5, obtendo como melhor resultado de atividade enzimática de 3335 U/g utilizando o nível de mistura farelo de trigo e água destilada de 1:1,5, sendo que uma unidade de AMG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glucose por grama de substrato por minuto à 50°C, em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 com amido solúvel a 1% (p/v). Os autores comentam que uma umidade mais alta no meio promove viscosidade, reduz o volume de gás e há uma diminuição na transferência do oxigênio, aumentando a formação do micélio aéreo.

5.4 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM MEIOS SUPLEMENTADOS COM FONTES DE FÓSFORO E NITROGÊNIO

Na Tabela 13 estão dispostos os resultados da influência da adição de fósforo, utilizando-se como fonte fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), aos meios com resíduos do processamento de batata, resíduos do processamento de cenoura e mistura com 50% (p/p) de cada resíduo, de acordo com os experimentos mostrados na Tabela 6.

Observa-se na Tabela 13 que o melhor resultado obtido foi com resíduo de batata e com adição de 0,19 g de Na_2HPO_4 /50 g de meio, com atividade da amiloglucosidase de 318,33 U/mL, ensaio 2.

Nos ensaios feitos com resíduo do processamento de cenoura, Tabela 13, ensaios de 5 a 8, observa-se que as respostas apresentaram padrão similar às dos ensaios onde se utilizou resíduo do processamento de batata. O maior nível de atividade enzimática, 33,33 U/mL, ensaio 6, também foi obtido com o emprego de 0,19 g de Na_2HPO_4 /50 g de meio.

Já nos ensaios onde o substrato era composto pela mistura de 50% de resíduo do processamento de batata e 50% de resíduo do processamento de cenoura, o melhor resultado

de ação enzimática ocorreu na amostra controle, onde não houve adição de fósforo, obtendo-se atividade enzimática de 158,33 U/mL, ensaio 9. Neste caso, percebe-se que, para a atividade da amiloglucosidase, na mistura dos resíduos do processamento de batata e cenoura, não há o mesmo padrão quando analisada a atividade da amiloglucosidase para os resíduos de batata e cenoura isolados.

Verificou-se que com menor teor de fosfato utilizado para suplementação dos meios, equivalente a 0,041g de fósforo/ 50 g de meio, obteve-se melhores resultados de atividade enzimática. Zaldivar-Aguero et al. (1997) obtiveram atividade enzimática máxima de 418,3 U/mL de amiloglucosidase com suplementação de 11,4 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 10,5 g/L de KH_3PO_4 por litro de meio a base de farinha de mandioca, o equivalente a 0,168 g de fósforo/ 50 mL de meio a base de farinha de mandioca, utilizando-se *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando temperatura de 35°, tempo de 63 horas e com controle de pH em 5, acima desse valor de adição de fósforo, a performance fúngica era menos satisfatória. A unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1g de glicose, durante uma hora de reação, sob as seguintes condições (60° C, amido 4% p/v, dissolvido em tampão acetato pH 4,2 como substrato).

Tabela 13 – Resultados dos ensaios utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata, resíduo do processamento de cenoura e mistura de 50% do resíduo do processamento de batata e 50 % do resíduo do processamento de cenoura, com suplementação com Na_2HPO_4

Ensaio	Suplementação com Fósforo (g Na_2HPO_4 /50gde meio)	Resíduo utilizado como meio para fermentação (50 g)	Atividade enzimática (U/mL)
1	0	Batata	180,00
2	0,19	Batata	318,33
3	0,38	Batata	216,66
4	0,57	Batata	138,33
5	0	Cenoura	31,66
6	0,19	Cenoura	33,33
7	0,38	Cenoura	8,33
8	0,57	Cenoura	3,33
9	0	50% batata e 50% cenoura	158,33
10	0,19	50% batata e 50% cenoura	125,00
11	0,38	50% batata e 50% cenoura	63,33
12	0,57	50% batata e 50% cenoura	118,33

Na Tabela 14 estão dispostos os resultados dos ensaios de suplementação com fósforo e nitrogênio aplicados aos meios com resíduo de processamento de batata e cenoura, com e sem correção de pH, de acordo com as condições especificadas na Tabela 7.

Pode se observar que o melhor resultado obtido foi no ensaio 6, onde a atividade enzimática foi de 875,00 U/mL, com adição de 0,38 g de Na_2HPO_4 /50 g de meio, sem correção de pH, utilizando-se resíduo do processamento de batata, sem adição de sulfato amônia como fonte de nitrogênio.

Quando o resíduo do processamento de cenoura foi utilizado, a maior atividade enzimática obtida foi de 141,66 U/mL, ensaio 2, onde foi adicionado 0,38 g de Na_2HPO_4 /50 g de meio, sem correção de pH, sem adição de sulfato de amônia.

Capalbo e Moraes (1999) ressaltam que o pH só apresenta boa reprodutibilidade se o meio se apresentar homogêneo. No caso deste estudo, a heterogeneidade do meio em relação ao tamanho das partículas do substrato não permitiu perfeita agitação e homogeneidade do substrato.

Tabela 14 – Resultados dos ensaios realizados para avaliação da influência da suplementação com Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com e sem correção do pH utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata e resíduo do processamento de cenoura

Ensaio	Fósforo ($\text{gNa}_2\text{HPO}_4/50\text{g}$ de meio)	Nitrogênio ($\text{g}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/50\text{g}$ de meio)	Correção de pH para 5,0	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)
1	0	0	Não	Cenoura	125,00
2	0,38	0	Não	Cenoura	141,66
3	0	0,11	Não	Cenoura	120,00
4	0,38	0,11	Não	Cenoura	23,33
5	0	0	Não	Batata	801,66
6	0,38	0	Não	Batata	875,00
7	0	0,11	Não	Batata	708,33
8	0,38	0,11	Não	Batata	561,66
9	0	0	Sim	Cenoura	30,00
10	0,38	0	Sim	Cenoura	30,00
11	0	0,11	Sim	Cenoura	33,33
12	0,38	0,11	Sim	Cenoura	40,00
13	0	0	Sim	Batata	105,00
14	0,38	0	Sim	Batata	53,33
15	0	0,11	Sim	Batata	193,33
16	0,38	0,11	Sim	Batata	145,00

O resíduo de batata gerou os melhores resultados, com e sem correção de pH, apenas quando se utiliza 0,38 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/50$ g de meio. Com correção de pH há um decréscimo bruto no teor de glucose produzidos. No caso do resíduo do processamento de cenoura, os melhores resultados apresentados ocorreram também quando não se fez correção de pH. Os resultados obtidos sem a correção de pH dos meios para 5,0 foram melhores que os obtidos com correção de pH. A Tabela 15 nos mostra que o fator correção de pH apresentou efeito negativo e foi significativo tanto para o resíduo do processamento de batata quanto para o resíduo do processamento de cenoura.

Tabela 15 – Efeitos dos fatores dos ensaios da Tabela 14

	Batata	Cenoura
Fator	Efeito	Efeito
Suplementação com Na_2HPO_4	-43,33	-37,5
Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-92,92	-69,17
Correção de pH	-612,50	-26,665
Suplementação com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-54,17	21,67
Suplementação com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Correção de pH}$	-6,67	34,165
Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{Correção de pH}$	146,67	30
Suplementação com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{Correção de pH}$	55,84	67,92
Média	430,41	-18,34

De acordo com Ward (1989), o pH do meio se controla com frequência de forma indireta mediante um balanço entre as fontes de carbono e nitrogênio. O carbono contribui com a redução do pH devido à formação de ácidos orgânicos e os sais de amônio produzem condições ácidas devido a liberação de ácido livre durante a assimilação de íon amônio. A assimilação de nitrogênio pode dar lugar à alcalinidade. Ao manipular o pH, deve-se dar atenção aos possíveis efeitos repressivos dos constituintes utilizados na formação do produto, portanto deve-se levar em conta também uma possível influência da relação entre os fatores pH e nitrogênio nos meios fermentativos.

Thorsen et al. (2006), avaliando a produção de amiloglicosidase por *Thermomyces lanuginosus* em fermentação submersa, utilizando tampão citrato-fosfato e valores de pH entre 3 e 5, obtiveram atividade enzimática máxima de 1,9 U/mL com pH de 5,0.

Daniel et al. (1996) compararam o uso de uréia e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio para *Aspergillus niger* M21 em meio de casca de limão como fonte de carbono em fermentação sólida. Obtiveram 2,31 U/mL como melhor resultado de atividade enzimática de poligalacturanase, utilizando uréia como fonte de nitrogênio, sendo que uma unidade pectinolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a viscosidade inicial de uma solução de pectina a 1% (p/v), em 10 minutos de reação, a 35° C e pH 4,5.

Pessoa et al. (2003) pesquisaram a influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio e fósforo para produção de riboflavina, utilizando como meio de cultura subproduto do refino de óleos vegetais e o microrganismo *Candida guilliermondii* DM 644. Como fonte de nitrogênio, foi utilizada a uréia ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na proporção C/N igual a 4. Utilizou-se também KH_2PO_4 como fonte de fósforo na concentração de 0,2g/L e extrato de levedura na quantidade de 0,01g/L de meio. Constatou-se que a melhor produtividade média de riboflavina foi de 18,22 $\mu\text{g/mL.dia}^{-1}$, obtida quando o teor de nitrogênio e carbono estão em seus níveis superiores. Eles observaram também que houve uma importante interação entre a matéria graxa e fonte de nitrogênio. Quando se utilizou sal de amônio como fonte de nitrogênio, a produtividade média de riboflavina aumentou de 0,4 para 3,2 $\mu\text{g/mL. dia}^{-1}$ e, na presença de uréia, aumentou de 5,9 para 17 $\mu\text{g/mL dia}^{-1}$. Observou-se também que a fonte de nitrogênio orgânica, extrato de levedura, estimula a produção de riboflavina dez vezes mais que o sal de amônio quando a concentração de "borra" é 5g/L de meio. Com relação ao fósforo, ficou evidenciado que ele não estimulou a produção de riboflavina.

Silva Filho e Vidor (2001) pesquisaram a capacidade e o potencial de solubilização de 21 isolados de microrganismos solubilizadores de fosfatos (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*) que foram avaliados em cultivos em meio de cultura Glicose-Extrato de Levedura contendo diferentes fosfatos (Ca, Al ou Fe), na presença de fontes de nitrogênio (peptona, amônio e nitrato) e teores de Fe, Ca e K. Concluíram que a fonte de nitrogênio afeta a capacidade e o potencial de solubilização, verificando-se um efeito positivo com fonte nitrogênio proveniente de amônio e negativo com nitrogênio proveniente de nitrato.

Schmidell (2001) cita que como fonte de nitrogênio os sais são freqüentemente utilizados, como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que costuma provocar reduções significativas do pH e, em

alguns casos, fenômenos de inibição pelo sulfato. Aminoácidos também podem ser utilizados, ou a uréia, que permite reduzir os problemas de controle de pH.

Maldonado et al. (1986) trabalharam com cascas de limão previamente tratadas como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio na produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus* sp. Os resultados demonstraram haver um decréscimo acentuado no pH após 12 horas de processo, seguido por uma queda mais lenta do pH até 60 horas de fermentação. Este fato sugere que o uso de uma fonte inorgânica de nitrogênio, como sulfato de amônio, não seria indicada abrindo a possibilidade do emprego de fontes orgânicas de nitrogênio, tal qual uréia, com vistas a melhorias no rendimento e na produtividade do processo em questão.

Laríos et al. (1989) obtiveram maior atividade pectinolítica quando utilizaram sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e baixas concentrações de fosfato de potássio como fonte de fósforo. Os resultados obtidos por Daniel et al. (1996) estão de acordo com tal observação, uma vez que, em tempos muito elevados de fermentação, a concentração de sais (como o fosfato) presentes no meio tende a ser pequena e a melhor atividade pectinolítica, 2,3 U/mL, foi obtida quando se utilizou tempo de fermentação de 40 horas e uréia como fonte de nitrogênio.

Bertolin et al. (2003) concluíram que a produção de amiloglucosidase é fortemente influenciada pelas fontes de nitrogênio e carbono. Eles observaram um aumento de 100% na produção de amiloglucosidase quando substituíram o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por uréia como fonte de nitrogênio e utilizaram maltose como fonte de carbono, utilizando relação C/N = 4,8. A variação na relação C/P de 5,1 a 28,7 não estimulou a produção de amiloglucosidase nas condições estudadas.

As relações C/N utilizadas neste trabalho variaram entre 186,38 e 499,49 (Tabela 7) e também não estimularam aumento na produção de amiloglucosidase nas condições empregadas.

Maccari Jr. et al. (1996) citam em seu trabalho que o tratamento com sulfato de amônio inibiu o desenvolvimento da levedura utilizada para produção de amiloglucosidase (*Schwanniomyces castellii* LPB 21) em meio de resíduo de batata, o que pôde ser observado pela redução no crescimento celular e consumo percentual de amido. Com adição de sulfato de amônio houve consumo de 75% de amido, com adição de uréia de 80% e da testemunha que foi de 78%. Outros resultados citados por Maccari Jr. et al (1996) também apontam uma inibição no processo de fermentação quando da adição de sulfato de amônio junto ao meio de cultura, os autores também afirmaram que é desnecessária a suplementação do mosto com uma fonte de nitrogênio. Isso contribui de maneira significativa para redução de custos do substrato de fermentação, tratando-se de uma matéria-prima de baixo valor (tubérculos descartados, no caso, refugos de batata) e sem padrão comercial.

Anto et al. (2006) utilizando extrato de levedura, ao invés de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, na quantidade de 0,02g/g de substrato seco, em meio à base de flocos de arroz, obteve atividade enzimática de amiloglucosidase de 454 U/g de substrato seco. Este valor foi 180% mais alto que o obtido com a utilização de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

5.5 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÃO

Para a análise da atividade enzimática da enzima amiloglucosidase, utiliza-se usualmente tanto o tampão acetato 0,02 M, pH 4,2 (BAI et al, 2006; DANIEL et al., 1996;

PAMBOUKIAN, 1997), quanto o tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2 (PANDEY et al., 1994; SINGH e SONI, 2001; THORSEN et al., 2006).

Comparando-se os resultados da Tabela 16, nota-se que os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos com a extração da enzima por solução tampão citrato-fosfato pH 4,2. Destes, o melhor resultado foi obtido com o meio de resíduo de batata, 401,66 U/mL, seguido por 176,66 e 51,66 U/mL, da mistura dos resíduos e do resíduo do processamento de cenoura, respectivamente.

Tabela 16 – Resultados dos ensaios com determinação da atividade enzimática utilizando-se solução tampão acetato 0,02 M, pH 4,2 e tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2

Ensaio	Tampão	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)
1	Citrato - fosfato pH 4,2	Cenoura	51,66
2	Citrato - fosfato pH 4,2	Batata	401,66
3	Citrato - fosfato pH 4,2	50% batata e 50% cenoura	176,66
4	Acetato pH 4,2	Cenoura	28,33
5	Acetato pH 4,2	Batata	353,33
6	Acetato pH 4,2	50% batata e 50% cenoura	158,33

Singh e Soni (2001) testaram a influência de diferentes umidificantes adicionados ao meio de fermentação (tampão citrato-fosfato pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0; tampão fosfato pH 6,0; 7,0 e 8,0; tampão tris-HCl pH 7,0 e 8,0; água de torneira pH 6,0 e água destilada pH 6,2) na produção da enzima amiloglucosidase produzida por *Aspergillus oryzae*, utilizando farelo de trigo em fermentação sólida como substrato, obtendo o melhor resultado de atividade enzimática de 2833 e 2803 U/g utilizando água destilada pH 6,0 e tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0, respectivamente, sendo que uma unidade de AMG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glucose por grama de substrato por minuto à 50°C, em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 com amido solúvel a 1% (p/v). Observa-se que o tampão citrato-fosfato influencia positivamente na produção e atividade da AMG, tanto se usado como umidificante do meio ou na determinação da atividade enzimática.

5.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em todos os ensaios realizados, nas condições de processo empregadas, nota-se que o resíduo de batata apresentou-se como o melhor substrato para produção da enzima amiloglucosidase. O alto teor de amido desse substrato é um dos motivos para tal resultado.

Em seu trabalho, Macedo et al. (1999) comentam que, pelo fato da amiloglucosidase ser uma enzima de indução, era de se esperar que altas concentrações de polissacarídeos conduzissem a altas taxas de produção desta enzima. Por outro lado, como a velocidade de hidrólise dos polissacarídeos em glucose é mais alta que o consumo de glucose pelas células, no começo do cultivo, acontece um acúmulo de glucose no meio, causando inibição do crescimento e repressão na síntese da enzima. Esse pode ser um dos motivos pelo qual o resíduo do processamento de cenoura não se mostrou boa fonte para produção da enzima amiloglucosidase, pois em comparação com o resíduo do processamento de batata, ele possui o teor de glucose mais elevado.

Os dados da pesquisa realizada por Maccari Jr. et al. (1996) indicam melhores resultados quando usados os tubérculos *in natura* (refugos de batata) do que quando empregada farinha de refugos de batata. Esses resultados são importantes, pois indicam ser possível o uso dos refugos de batata em processos fermentativos logo após o seu descarte, diminuindo gastos com energia e tempo.

6 CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos, observou-se que o microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se desenvolveu em todos os meios utilizados e seu micélio apresentou aparência filamentosa.

Ao se analisar a atividade enzimática nos diferentes ensaios realizados pode-se concluir que o resíduo do processamento de batata foi o que proporcionou, em todos os ensaios, maior atividade enzimática. Já o resíduo do processamento de cenoura, quando utilizado isoladamente, foi o que proporcionou os menores valores.

Analisando-se os resultados dos ensaios isoladamente, para os ensaios com meios com teor de umidade de 90, 92 e 98% relacionados ao tempo de fermentação e agitação tem-se que:

- os níveis de agitação utilizados não se mostraram vantajosos para o processo quando se utilizou resíduo do processamento de cenoura;
- o tempo de fermentação de 72 horas, utilizando-se como substrato resíduo do processamento de batata com 98% de umidade, foi o mais adequado para produção de AMG, apresentando resultados de atividade enzimática até 240 vezes maiores, 725,00 U/mL, do que quando empregadas as mesmas condições de fermentação, mas diminuindo-se o tempo para 24 horas.

Analisando-se os resultados dos ensaios com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%, pode-se concluir que:

- a maior atividade enzimática obtida, 141,38 U/mL, foi resultante das seguintes condições de fermentação: meio a base de batata com 30% de umidade, sem agitação e 72 horas de incubação à 30°C;
- o resíduo do processamento de cenoura, apesar de não ter apresentado resultados atividade enzimática tão altos quanto os obtidos com resíduo de batata, também foi favorável à

produção de AMG. O melhor resultado, de 65,98 U/mL, foi obtido com meio com 50% de umidade, sem agitação e 72 horas de incubação à 30°C;

- com a mistura dos resíduos do processamento de batata e cenoura na proporção de 1:1, obteve-se como melhor resultado de atividade enzimática 55,77 U/mL, obtido com meio com 70% de umidade, sem agitação e 72 horas de incubação à 30°C.

Analisando-se os resultados dos ensaios com meios suplementados com fontes de nitrogênio e fósforo, conclui-se que:

- nos ensaios com meios suplementados somente com fonte de fósforo os melhores resultados encontrados de atividade enzimática foram 318,33 U/mL, com adição de 0,19g de Na_2HPO_4 /50g de meio para o resíduo do processamento de batata, 33,33 U/mL quando se utilizou resíduo do processamento de cenoura com adição de 0,19g de Na_2HPO_4 /50g de meio, 125 U/mL foi obtido quando se fez a mistura de 50% de cada resíduo com adição de 0,19g de Na_2HPO_4 /50g de meio;

- quando se adicionou fontes de fósforo e nitrogênio relacionadas, utilizando-se resíduo do processamento de batata, o melhor resultado de atividade enzimática, 875,00 U/mL, foi obtido com adição de 0,38g de Na_2HPO_4 /50g de meio, com fermentação de 72 horas, sem agitação, temperatura de 30°C e sem correção de pH;

- utilizando-se resíduo do processamento de cenoura, o melhor resultado obtido referente à atividade enzimática, 141,66 U/mL, foi obtido com adição de 0,38g de Na_2HPO_4 /50g de meio, fermentação de 72 horas, sem agitação, temperatura de 30°C e sem correção de pH;

- a correção de pH dos meios para 5,0, quando realizada, não se mostrou necessária, uma vez que os resultados de atividade enzimática não se mostraram melhores do que quando a correção não foi realizada;

- a suplementação com fonte de nitrogênio nos níveis estudados, não melhorou os resultados de atividade enzimática.

Analisando-se os resultados dos ensaios com determinação da atividade enzimática em diferentes soluções tampão observa-se que:

- com a utilização dos resíduos do processamento de cenoura, batata e mistura de 50% desses resíduos, o tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,2 foi o que gerou melhores resultados referentes à atividade enzimática que foi de 51,66, 401,66 e 176,66 U/mL para os resíduos do processamento de cenoura, batata e mistura desses, respectivamente.

De uma forma geral pode-se concluir que, nas condições empregadas, a utilização de resíduo do processamento de batata e cenoura podem ser considerados boas fontes para a produção de AMG, sendo que o resíduo do processamento de batata produz maiores teores de AMG. A utilização desses resíduos como fonte para produção de AMG é viável, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a sub-produtos da agroindústria para produção de AMG utilizando *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados obtidos e análise, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser indicadas:

- Utilizar uma quantidade menor de substrato em erlenmeyer de 250 mL a fim de aumentar a superfície de contato do substrato com o oxigênio;
- Fazer uma relação entre a atividade enzimática com uma amostra “branco”;
- Utilizar tampão citrato-fosfato pH 4,2 para determinação da atividade enzimática e não tampão acetato pH 4,2;
- Traçar a cinética das reações enzimáticas;
- Utilizar uréia como fonte de nitrogênio para suplementação dos meios;
- Utilizar níveis inferiores a 0,19g de Na_2HPO_4 /50g de meio, como fonte de fósforo como suplemento;
- Testar a utilização de extrato de levedura e cevada (resíduos da produção de cerveja), como fontes de nitrogênio para suplementação dos meios;
- Empregar agitação mais vigorosa nos meios durante a fermentação;

8 REFERÊNCIAS

AALBAEK, T.; REESLEV, M.; JENSEN, B.; ERIKSEN, S. H. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 410 – 415, 2002.

ADAMS, R. C.; MACLEAN, F. S.; DIXON, J. K.; BENNETT, F. M.; MARTIN, G. I.; LOUGH, R. C. The utilization of organic wastes in N.Z.: Second interim report of the inter-departmental committee. **New Zealand Engineering**. v. 15, p. 396-424, 1951.

ALLEN, J. M.; FUCHS, E. B.; FORD, C. F. Asp238→Asn Creates a Novel Consensus *N*-Glycosylation Site in *Aspergillus awamori* Glucoamylase. **Starch/Stärke**. v. 54, p. 385–392, 2002.

ANTO, H.; TRIVEDI, U.B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**. v. 97, n. 10, p. 1161-1166, 2006.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://<www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 de nov / 2005.

ARÉVALO-PINEDO, A.; MURR, F. E. X. Influência da pressão, temperatura e pré-tratamento na secagem a vácuo da cenoura e abóbora. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.25, n. 4, p. 636-643, 2005.

ASCAR, J. M. **Alimentos: Aspectos bromatológicos e legais** – Análise percentual. São Leopoldo:[s.n.], 1985, v. 1, p. 327.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC Internacional**. 16 ed. [S/I], 1997.

BAI, Y. X. ; LI, Y. F.; WANG, M. T. Study on syntheses of a hydrophilic brad carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.4, p. 540-547, 2006.

BARBANO, D. M.; CLARK, J.L.; DUNHAM, C.E. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk . **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. v. 73, p. 849-859, 1984.

BERTOLIN, T. E.; CASARA, J.; COSTA, J. A. V. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal Of Biosciences**, Z-Naturforsch, v. 58c, p. 708-712, 2003.

BESCHKOV, V.; MARC, A.; ENGASSER, J.M. A kinetic model for the hydrolysis and synthesis of maltose, isomaltose and maltotriose by glucoamylase. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26, n.1, p.22-26, 1984.

BIRCH, G.G.; BLAKEBROUGH, I.; PARKER, K.J. **Enzymes and Food Processing** : applied science. London: Publishers, 1981, p. 30-33.

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

BRAND, D.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; ROUSSOS, S.; BRAND, I.; SOCCOL, C.R. Packed bed column fermenter and kinetic modelling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**. v.17, p. 1065–1070, 2001.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. de O. Perspectivas de uso de meios sólidos na produção de *Bacillus thuringiensis*. In: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E BIOTECNOLOGIA, 1999, Maringá, **Anais**.

Disponível em:<www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

CHIQUELTO, M. L. **Estudo comparativo entre diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na síntese de amiloglucosidade por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa**. 1991. 203 fs. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, n. 23, p. 157–167, 1998.

DALSENTER, F. D. H., **Contribuição ao estudo da aplicação da proposta Zeri para um resíduo agroindustrial utilizando processo biotecnológico**. 2000, Dissertação (Mestrado) Universidade Regional de Blumenau. 2000. Disponível em : < <http://www.furb.br> >. Acesso em: 26/05/04.

DANIEL, M. R.; TRINDADE, V.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A. Influência do pH na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. Disponível em: <www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. de O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 542 p.

FACCIOTTI, M. C. R.; HIRAYAMA, R. T.; PAMBOUKIAN, C. R. D.; ABUD, A K S.; TONSO, A.; SCHMIDELL, W. Estudo da influência do pré-tratamento do amido na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* em processo descontínuo. IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. Disponível em: <www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

FENNEMA, O. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2000. 550 p.

FRANCO, B. D. E. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, v.2, p.3-5.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M. **Propriedades gerais do amido** Coordenadora Marne Pascoli Cereda. Campinas: Fundação Cargill, 2001, v. 1, 224 p.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**: Microrganismos importantes em microbiologia de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1993, p. 31-34.

FUJITA, M.; IWAHORI, K.; TATASUTA, S.; YAMAKAWA, K. Analysis of pellet formation of *Aspergillus niger* based on shear stress. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.78, p. 368–373, 1994.

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, 1994.

HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUJINAMI, K.; IMAYASU, S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 84, n. 6, p. 532-537, 1997.

HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINERU, 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.

HELLENDORF, L.; MULDER, H.; VAN DEN HEUVEL, J.C., OTTENGRAF, S.P.P. Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.58, p. 478–485, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: O instituto, 1985.

JIN, B.; VAN LEEUWEN, H. J.; PATEL, B.; DOELLE, H. W.; YU, Q. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**. New York, v.34, p. 59-65, 1999.

JONES, D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. U.S. **Department of Agriculture & LUXODU- slightly revision**, 1941. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Classics/index.html>> Acesso em: 13 nov/ 2005.

KILIKIAN, B. V.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Analysis of the kinetic pattern of glucoamylase production regarding the *Aspergillus awamori* preservation time. **Revista microbiologia**. São Paulo, v. 23, n.2, p. 123 - 127, 1992.

KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; KOOKOS, I.K.; WEBB, C. Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions. **Biochemical Engineering Journal**. v.16, p. 23–34, 2003.

KUSUNOKI, K.; KAWAKAMI, K.; SHIRAISHI, F.; KATO, K.; KAI, M. A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 24, p.347-54, 1982.

LABELLE, P.; BARET, J.L.; BEAUX, Y.; DUCHIRON, F. Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two amiloglucosidase preparations. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 6, p. 291-295, 1997.

LANA, M. M.; VIEIRA, J. V.; SILVA, J. B. C.; LIMA, D. B. Cenourite e catetinho: mini cenouras brasileiras. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, 2001. p. 376-379.

LARÍOS, G.; GARCÍA, J. M.; E HUITRÓN, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v.11, n.10, p.729-734, 1989.

LEAL, M. C. M. R. ; CAMMAROTA, M. C. ; FREIRE, D. M. G. ; SANT'ANNA JR, G. L. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 13, 2000, **Anais...** Águas de São Pedro, 2000.

LEMO, C. M. Y.; FUCHS, E.; GOMES, E. SILVA, R. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, n. 31, p. 86 a 94, jul./dez., 2003.

LIMA, U. A. de; AQUARONI, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, v.1, 2001, p. 285.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, J. Enzyme and Microbial Technol. **Enzyme and microbial technology**. v.7, n. 6, p.258-265, 1985.

MACCARI JR., A.; SOCCOL, C. R.; RONCATO, L. D. B.; MEDEIROS, E.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. **Uso de leveduras amilolíticas para hidrólise do amido de refugos de batata**. IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, V, 1996, Maringá. Disponível em:<www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

MACEDO, G. R.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. **Aspectos da inibição do crescimento e repressão pela glicose no cultivo de *Aspergillus awamori* para a produção de glicoamilase**. IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, V, 1999, Maringá. Disponível em:<www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A. E; CALLÍERI, D. A. S. Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as the carbon source. **Biotechnology Letters**, v.8, n.7, p.501-504, 1986.

MANTOVANI, C.; ALMEIDA, M. M. **Produção e caracterização parcial de β – frutofuranosidase de *Aspergillus awamori***. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife. 1 CD ROM

MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. **Biotransformação de resíduos agroindustriais em compostos funcionais e de aroma**. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife. 1 CD ROM

MATUDA, T. G. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento:** Otimização de uso de aditivos. 2004, 142 fs. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MEINHARDT, S.; MEDEIROS, F.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. **Purificação de amiloglicosidase em sistema aquoso bifásico.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife. 1 CD ROM

MINAMI, N.M.; LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V. Characterization of clarified medium from submerge and semisolid cultivation of OF *Aspergillus awamori* NRRL 3112 by size-exclusion chromatography. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** São Paulo, v.16, n.2, Jun./ 1999.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; LUZ JR, L.F.L.; KRIEGER, N.; SANT'ANNA JR., G. L.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L.R.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. **A pilot-scale solid-state fermentation bioreactor with intermittent agitation and forced aeration: a brazilian national resource.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife. 1 CD ROM

MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A .; PEDRINHO, S. R. F. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia.** São Paulo, v.30, n.2 abr./jun. 1999.

MURTHY, M. V. R., KARANT, N. G.; RAO, K. S. M. S. **Advances in Applied Microbiology.** California: Academic Press, v. 38, 1993, p. 99.

NATARAJAN, S. K.; SIERKS, M. R. Identification of enzyme-substrate and enzyme-product complexes in the catalytic mechanism of glucoamylase from *Aspergillus awamori*. **Biochemistry.** v. 35, p. 15269-15279, 1996.

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

NOVOZYMES, **Enzimas e o Meio Ambiente** . Disponível em: http://<www_novozymes_com - images.htm> Acesso em: 22 de jul. de 2004.

OZBAL, T.; KUTSAL, T. Effects of agitation and aeration rates on riboflavin fermentations by *Ashbya gossypii*. **Biotechnology and Applied Biochemistry.** v. 37, p. 97-105, 1991.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Influência das condições de preparo do inoculo na morfologia do microrganismo e na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori***. 189 fs. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo: 1997.

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

PANDEY, A.; ASHAKUMARY, L. ; SELVAKUMAR, P. Copra waste - a novel substrate for solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. v. 51, p. 217-220, 1994.

PESSOA, M. de L. A.; ANDRADE, S. A. C.; SALGUEIRO, A. A.; STAMFORD, T. L. M. Utilization industrial waste from vegetal oils riboflavine production by *Candida guilliermondii* DM 644. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23, n.3 Set./Dez. 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004, 184 p.

RIZZATTO, M. L.; GOMES, E.; MONTE ALEGRE, R. **Pectinases production on solid-state fermentation of orange bagasse by *Penicillium italicum* and *Aspergillus niger***. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 13, 2000, **Anais...** Águas de São Pedro, 2000.

RODRIGUES, A. M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do Cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p. 57 - 62, jan. / abr. 2001.

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

ROSE, A.H. **Microbial enzymes and bioconversions**: Economic microbiology. Bath – England: Academic Press, v. 5, 1980, p. 116-123.

SALVA, T.J.G.; MORAES, I.O. Perfil da síntese de alfa-amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 12, p. 140-144. jul./ dez., 1992.

SANTOS, S.F.M.; NÓBREGA, J.E.; PINTO, G.A.S.; MACEDO, G.R.; SILVA, F.L.H. **Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida.** IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife, 1 CD ROM

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.de A.; AQUARONI, E. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo - SP: Edgard Blücher, v.2, 2001, 541 p.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology.** New York, n. 65, p.83-85, 1998.

SENHORAS, E. M. **Estratégias de uma agenda para a cadeia agroindustrial do côco:** Transformando a ameaça dos resíduos em oportunidades Eco-eficientes. 38 f., Monografia – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Economia, Campinas, 2003.

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

SHUMATHI, S.; MANJU, B. S. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. **Enzyme Microbiology Technology.** v. 27, p. 347 – 355, 2000.

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

SILVA, D. J. **Análise de alimentos** – Métodos químicos e biológicos. Viçosa: Imp. Univ. 1981.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa e Agropecuária Brasileira.** Brasília: v.36, n. 12, Dec./ 2001.

SILVA JR., J.G.; NASCIMENTO, H. J.; SOARES, V. F. **Glucoamylase Isoenzymes Tailoring Through Medium Composition.** IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, V, 1999, Maringá. Disponível em: <http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20Sheb/Oral/Oral_25.pdf.1999> Acesso em: 02 de out. de 2005.

SILVA, R. N.; ASQUIERI, E. R.; FERNANDES, K. F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1155–1159, 2005.

SINGH, H.; SONI, S. K. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 453–459, 2001.

SOARES, V. F.; BARUQUE FILHO, E.; SANT'ANNA JR., E. L. **Determinação experimental de atividade de biocatalizador imobilizado – Estudo comparativo**. IN: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, V, 1999, Maringá. Disponível em: www.uem.br/biblioteca/deq.htm Acesso em: 28/12/2005.

SOMOGYI, N. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, n. 1, p. 19 – 23, 1952.

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

SOUZA, E. L. de; HOFFMANN, E. H. E.; CASTILHO, V. M. Produção e caracterização de alfa-amilase produzida por *Rhizopus sp.* **Revista Arquivo de Biologia e Tecnologia**. São Paulo, v.39, p. 831-839, dez. 1996.

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. dos. **Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários**. Aracajú, 1998. Disponível em : <A:\RuralSoft_com.htm>. Acesso em : 22 de jul. de 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, 15, 2005, Recife. 1 CD ROM

TANUJA, S.; SRINIVAS, N. D.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; GOWTHAMAN, M. K. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase . **Process Biochemistry**. New York, v. 32, n. 8, p. 635-641, 1997.

THORSEN, T. S.; JOHNSEN, A. H.; JOSEFEN, K.; JENSEN, B. Identification and characteriazation of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 4, p. 671-676, 2006.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1992, 228 p.

WARD, O. P. **Biotecnología de la fermentación**. Acribia: Zaragoza. 1989, 274 p.

YAMANE, Y.; NAKAMURA, Y.; OKAMOTO, H.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Overproduction of riboflavin by an *Arthrobacter* sp. Mutant resistant to 5 — fluorouracil — Effects of pH and dissolved oxygen concentration on production of riboflavin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 50, p. 317-322, 1995.

YANTORNO, O.; ERTOLA, R.; MIGNORE, C. **Microbiología Industrial**. Monografía redatada para o Programa Regional de Desarrollo Científico de la OEA. Buenos Aires: OEA, 1995, 103 p. Disponível em: <<http://www.biologia.edu.ar/microind/pr%C3%B3logo.htm>> Acesso em: 25 de set. de 2005.

ZALDIVAR-AGUERO, J.M.; BALDINO, A. C. Jr., VILAÇA, P.R; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Influence of phosphate concentrations on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged culture. **Brazilian Journal Chemistry Engineering Magazine**. São Paulo, v. 14, n. 4, dez./1997.

ZANGIROLAMI, T. C. The influence of oxygen on growth and enzyme production in continuous cultures of *A. oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, n. 3, p. 278-281, 2000.