

CARLA RUBIANE PEREIRA

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus niger*:
POTENCIAL DE APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO
AMIDO GRANULAR DA BATATA-DOCE**

**MESTRADO EM
BIOENERGIA**

GUARAPUAVA -PR

2015

CARLA RUBIANE PEREIRA

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus niger*: POTENCIAL DE APLICAÇÃO
NA HIDRÓLISE DO AMIDO GRANULAR DA BATATA-DOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende

Co-orientador Prof. Dr. Edson Perez Guerra

GUARAPUAVA-PR

2015

Dedicatória

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus por ter me dado coragem, força para não desistir e proteção para me amparar.
À minha mãe que esteve sempre ao meu lado me apoiando nas horas mais difíceis que passei, por ter me dado o carinho que eu precisava e me ajudado a vencer os obstáculos que surgiram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof. Dra. Adriana Knob por todo o apoio e dedicação, por me corrigir, por acreditar em mim, pelo ensinamento e por aceitar me ajudar no desenvolvimento de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Perez Guerra pelo ensinamento e dedicação e também pelo apoio pessoal nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende por ter aceitado me orientar e dar todo o apoio necessário.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pelo ensinamento e dedicação, por ter contribuído muito na realização deste trabalho.

A minha mãe Rosângela pelo apoio, carinho, encorajamento e paciência.

A minha irmã Talita pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório, Michael, Maíra, Márcio, Simone e Thaianne pela ajuda e amizade.

A todos os professores do programa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

A Capes pelo apoio financeiro.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE SIGLAS	iii
LISTA DE EQUAÇÕES	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
Objetivo geral:	9
Objetivos específicos:	9
3.1. O álcool	10
3.2. Matérias-primas amiláceas	15
3.3. Enzimas amilolíticas	18
3.4. Processo de hidrólise do amido	19
3.4.1. Processo de hidrólise do amido granular	21
3.5. Produção de enzimas microbianas	25
3.5.1. Produção de amilases microbianas	27
3.6. O gênero <i>Aspergillus</i> e a espécie <i>A. niger</i>	29
3.7. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Preparo da casca da batata-doce	36
4.2. Linhagem e condições de cultivo	36
4.3. Determinação da atividade amilásica	37
4.4. Otimização da produção de amilases por <i>A. niger</i> utilizando o DCCR e a MSR	37
4.5. Caracterização bioquímica das amilases produzidas por <i>A. niger</i>	38
4.5.1 Efeito da temperatura e do pH	38
4.5.2. Estabilidade frente a temperatura e ao pH	38
4.6. Hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de <i>A. niger</i>	38
4.6.1. Preparo do material amiláceo	38
4.6.2. Otimização do processo de hidrólise empregando-se o DCCR e a MSR	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Otimização da produção de amilases por <i>A. niger</i>	41
5.1.1. Validação do modelo	47
5.2. Caracterização bioquímica das amilases produzidas por <i>A. niger</i>	47
5.2.1 Efeito do pH e da temperatura	47
5.2.2. Estabilidade térmica e em diferentes valores de pH	49
5.3. Hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de <i>A. niger</i>	50
5.3.1. Otimização do processo de hidrólise empregando-se o DCCR e a MSR	50
5.3.2. Validação do modelo	58
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geração total de eletricidade – cenário revolução energética para 2050	06
Figura 2 – Produção total de álcool no Brasil, nos anos de 1995 a 2012	07
Figura 3 – Produção de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos 50 anos	08
Figura 4 – Estrutura da amilose e da amilopectina.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 5 – Conidióforo de <i>Aspergillus</i> bisseriado (<i>Aspergillus ocraceus</i>) e terminologia das estruturas utilizadas em sua identificação e classificação.	Error! Bookmark not defined.
Figura 6 – Micro e macromorfologia de <i>A. niger</i> bisseriado ...	Error! Bookmark not defined.
Figura 7 – Visualização gráfica de um planejamento composto central para (A) q = 2 fatores; (B) q=3 fatores.....	35
Figura 8 – Diagrama de Pareto demonstrando as variáveis significativas na produção de amilases por <i>A. niger</i>	38
Figura 9 – Superfície de resposta para a produção de amilases por <i>A. niger</i> cultivado em casca de batata-doce.	39
Figura 10 – Influências da temperatura e do pH sobre a atividade das amilases produzidas por <i>A. niger</i>	42
Figura 11 – Diagrama de Pareto demonstrando as variáveis significativas no processo de hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de <i>A. niger</i>	46
Figura 12 – Superfície de resposta para a hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de <i>A. niger</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química percentual da batata-doce....	Error! Bookmark not defined.
Tabela 2 – Processos de hidrólise do amido granular por amilases microbianas	Error! Bookmark not defined.
Tabela 3 – Produção de amilases por <i>Aspergillus</i> spp.	24
Tabela 4 – Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para a produção de amilases por <i>A. niger</i>	36
Tabela 5 – Análise da variância (ANOVA), coeficientes de regressão para amilases produzidas por <i>A. niger</i> cultivado em casca de batata-doce e os valores de R^2 e F -valor.	37
Tabela 6 – Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para a hidrólise enzimática do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de <i>A. niger</i> , com a liberação de glicose	44
Tabela 7 – Análise da variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir do amido granular da batata-doce hidrolisada pelo extrato bruto de <i>A. niger</i> e os valores de R^2 e F -valor.....	45

LISTA DE SIGLAS

BNDES: Banco Nacional de Desenvolvimento Social

BRIX: Teor de sólidos solúveis

DDC: Delineamento Central Composto

FES: Fermentação em estado sólido

F_{Sm}: Fermentação submersa

°C: graus Celsius

g: grama

g L⁻¹: grama por litro

GRAS: generally recognized as safe

h: hora

kJ: quilojoule

L: litro

M: molar

mg: miligrama

mg mL⁻¹: miligramas por mililitros

min: minutos

mL: mililitros

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

T_½ - meia vida

t ha⁻¹: toneladas por hectare

U: Unidade enzimática

U mL⁻¹: Unidades por mililitros

U g⁻¹: Unidades por gramas

U mg⁻¹: Unidades por miligramas

v m⁻¹: volume por massa

μL: microlitro

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Modelo de primeira ordem	34
Equação 2 - Modelo de segunda ordem.....	35
Equação 3 – Equação polinomial de segunda ordem	43
Equação 4 – Equação polinomial de segunda ordem	44
Equação 5 – Equação de regressão	45
Equação 6 – Modelo matemático representando a atividade amilásica por regressão linear múltipla.....	48
Equação 7 – Modelo matemático da conversão de glicose por regressão linear múltipla	57

RESUMO

A matriz energética mundial ainda é baseada principalmente nos combustíveis fósseis, os quais apresentam grandes problemas como a emissão de gases poluentes, além de serem uma fonte esgotável de energia. Diante desta problemática, surge a necessidade de estudos que envolvam a produção de biocombustíveis, a partir de matérias-primas renováveis e limpas. No entanto, os processos convencionais de hidrólise de materiais amiláceos para a produção de bioetanol apresentam elevados custos de produção, associados às enzimas empregadas e à grande demanda energética para a gelatinização do amido a altas temperaturas. Como alternativa, o processo de hidrólise do amido granular torna desnecessária a gelatinização do amido e reduz o gasto energético, apresentando vantagens econômicas. O objetivo do presente estudo foi estabelecer as condições ótimas para a produção de amilases pelo fungo *Aspergillus niger*, utilizando como substrato a casca da batata-doce. Adicionalmente objetivou-se caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas e verificar seu potencial de aplicação no processo de hidrólise do amido granular da batata-doce. Para isso foram utilizadas como ferramentas estatísticas o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). As melhores condições estabelecidas para a produção de amilases por *A. niger* foram concentração do substrato 2%, pH de cultivo 6,0 e tempo de cultivo de 6,5 dias, obtendo-se uma produção correspondente a 214,28 U mL⁻¹. As amilases produzidas em casca de batata-doce foram mais ativas a 60 °C, em pH 4,5, mostrando-se estáveis em uma ampla faixa de pH, bem como em sua temperatura ótima. As melhores condições estabelecidas para a hidrólise do amido da batata-doce foram 37 horas de incubação, temperatura de 50 °C, pH 4,0 e concentração enzimática equivalente a 31,25 U g⁻¹ de substrato. Sob as condições otimizadas, um elevado grau de conversão do amido da batata-doce em glicose foi obtido, correspondendo a 78,33%. Por meio dos resultados apresentados, evidencia-se o potencial de *A. niger* de produzir amilases em presença da casca de batata-doce, um resíduo biotecnologicamente ainda pouco explorado. Ainda, os elevados rendimentos de glicose oferecem novas perspectivas, a fim de tornar o processo de produção de etanol a partir da batata-doce economicamente competitivo.

Palavras-chave: Bioetanol, materiais amiláceos, enzimas amilolíticas, otimização, hidrólise

ABSTRACT

The world's energy matrix is still mainly based on the use of fossil fuels, which present major problems such as emission of pollutant gases, as well the fact of that fossil fuels are limited source of energy. Faced with this problem, there is the need for studies related to the production of biofuels from renewable and clean raw materials. However, conventional processes of enzymatic starch hydrolysis for ethanol production present high production costs associated with the use of enzymes and have large energy demand, for starch gelatinization at high temperatures. Alternatively, the granular starch hydrolysis process makes the gelatinization of the starch unnecessary and reduces the energy required, showing economic advantages. The aim of this study was establish the optimal conditions for amylase production by *Aspergillus niger*, using sweet potato peel as substrate. Additionally aimed characterize biochemically the enzymes produced and verify its application potential in the granular starch hydrolysis process of sweet potato. For that were used as tools the statistics Central Composite Design Rotational (CCRD) applicable to Response Surface Methodology (RSM). The culture conditions that resulted in the highest amylase levels by *A. niger* were a substrate concentration of 2%, pH of medium 6.0 and cultivation time of 6,5 days, corresponding to 214.28 U mL⁻¹. The amylase produced with sweet potato was more active at 60 °C, in pH 4.5. In addition, it was stable over a wide pH range and at its optimal temperature. The hydrolysis conditions that resulted in the highest glucose levels were 37 hours of reaction, 50 °C, pH 4.0 and enzyme dosage of 31.25 U g⁻¹ of substrate. Under these conditions, a high yield of glucose from sweet potato starch hydrolysis was obtained, corresponded to 78.33%. This study therefore demonstrate the potential of *A. niger* to produce amylases in the presence of sweet potato, a little explored residue. In addition, the high glucose levels observed opens up new possibilities for making the production of ethanol from sweet potato economically viable.

Key words: Bioethanol, starch materials, amylolytic enzymes, optimization, hydrolysis

1. INTRODUÇÃO

A principal matriz energética é baseada nos combustíveis fósseis não renováveis, os quais resultam na emissão de gases poluentes, além do fato de suas reservas serem esgotáveis, o que requer a busca de fontes alternativas de energia (IOELOVICH, 2015).

A bioenergia é vista como uma das opções fundamentais para mitigar as emissões de gases de efeito estufa e substituir os combustíveis fósseis. Este fato tem sido bastante evidenciado em nível mundial nos últimos anos. Em 2007, a produção total de biocombustíveis alcançou uma produção em torno de 62 bilhões de litros (AJANOVIC, 2010). Estima-se que a produção mundial de bioetanol alcance 180×10^9 L em 2021, quase duas vezes superior à produção obtida em 2009-2011 (MURILLO et al., 2013).

O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de bioetanol do mundo, empregando-se a cana-de-açúcar e o milho como matérias-primas, respectivamente (DIAS et al., 2012). Entretanto, a cana-de-açúcar tem sido vista como uma das responsáveis por um sistema de estrutura agrária baseado na monocultura e latifúndio, além do alto custo de produção (CASTRO, 2009; MURILLO et al., 2013). Além disso, dentre os impactos negativos resultantes da produção em larga escala da cana-de-açúcar, podem ser citados a destruição de regiões de alta biodiversidade, o desmatamento, a degradação de solos por meio do uso de produtos químicos, a contaminação de recursos hídricos e o agravamento das condições de trabalho no campo (GOLDENBERG et al., 2008).

Assim, todos esses fatores reforçam a necessidade de estudar e promover uma diversificação da matriz bioenergética brasileira. Dentro desse contexto, surge a necessidade de novas matérias-primas que possam ocupar faixas de solos menos valorizadas, tendo em vista a ampla dimensão do Brasil que possui diferentes condições edafoclimáticas. Segundo Silveira (2012), a diversificação de culturas na produção do álcool também pode ser uma oportunidade de geração de emprego e renda para o país.

Nesse sentido, a batata-doce pode ser uma alternativa viável, visto que é uma cultura que privilegia os pequenos agricultores, não exige grandes áreas de plantio e pode ser produzida em solos menos férteis. Outra grande vantagem é o fato de exigir um investimento relativamente pequeno e de seus resíduos poderem ser usados na alimentação animal (CASTRO, 2009). Também apresenta alta produção de biomassa para obtenção de álcool

combustível e um baixo custo de produção. Adicionalmente, a batata-doce é considerada como uma das espécies mais eficientes no processo da conversão de energia solar em energia química, armazenada nos vegetais sob a forma de amido (TESTER et al., 2004; ZEEMAN et al., 2010).

Atualmente, os processos de produção de etanol a partir de fontes amiláceas como o milho e a batata-doce requerem a hidrólise destes materiais, a fim de converter o amido em açúcares fermentescíveis, geralmente por meio de um processo enzimático conduzido a elevadas temperaturas. Neste processo, as enzimas amilolíticas mais empregadas são a α -amilase e a glucoamilase, as quais desempenham um papel fundamental no aproveitamento de diversas biomassas contendo amido para a produção de biocombustíveis e de outros produtos (UTHUMPORN et al., 2010).

Entretanto, os elevados custos associados à obtenção destas enzimas e a elevada demanda energética devido às altas temperaturas geralmente adotadas para a gelatinização e hidrólise do amido inviabilizam economicamente o processo (SHARIFFA et al., 2009). Nesse sentido, é importante buscar meios de tornar esse processo viável tanto do ponto de vista econômico, quanto do ponto de vista ambiental, assim o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) podem ser ferramentas úteis para encontrar as melhores condições tanto na produção de enzimas como sua aplicação na hidrólise do amido granular da batata-doce.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estabelecer as melhores condições de cultivo para a produção de amilases de uma linhagem de *A. niger*, empregando-se a casca de batata-doce como substrato. Adicionalmente, objetivou-se caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas, bem como verificar seu potencial de aplicação no processo de hidrólise do amido granular da batata-doce.

Objetivos específicos:

1. Estabelecer as condições físico-químicas ótimas para a produção de amilases pelo fungo *A. niger*, empregando-se a casca de batata-doce como substrato;
2. Determinar o pH e a temperatura ótimos das amilases produzidas por *A. niger*, bem como verificar a estabilidade destas enzimas frente à temperatura e ao pH;
3. Estabelecer as melhores condições de hidrólise enzimática do amido granular da batata-doce.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O álcool

A sociedade mundial enfrenta um grave problema de esgotamento dos recursos energéticos baseados em fontes não renováveis. Em contrapartida, o consumo de energia cresce progressivamente. O uso de combustíveis fósseis leva ao aumento de gases poluentes na atmosfera, conduzindo a mudanças no clima global (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Além disso, os custos cada vez mais elevados pelas constantes crises políticas e sociais dos países do Oriente Médio, detentores da maioria das reservas, o aumento da dificuldade de extração e o crescente uso destes recursos como matéria-prima para a produção de bens de consumo são os principais fatores que impulsionam a completa substituição dos combustíveis fósseis (OLIVEIRA, 2009).

Em nível mundial, a matriz energética brasileira é uma das mais limpas, assumindo uma posição de destaque quanto à participação de fontes renováveis, incluindo hidroeletricidade, biomassa, entre outras. Estima-se que cerca de 44,4% de toda a energia do Brasil seja proveniente de fontes renováveis, enquanto que a participação dessas fontes na matriz energética mundial seja aproximadamente em torno de 13% (CHAVES e GOMES, 2014). Para 2050, a projeção é que a matriz elétrica nacional se torne 93% renovável (Figura 1), em um cenário otimista, a geração hidrelétrica corresponderá a 45,65% da matriz brasileira, seguida pela energia eólica, com participação de 20,38%, biomassa, com 16,6%, e energia solar, com 9,26%. A parcela correspondente ao gás natural, único combustível fóssil considerado num estado de transição, será de apenas 7,33%. (GREENPEACE, 2010).

Visando reduzir os efeitos negativos causados pela utilização dos combustíveis fósseis, a busca por fontes renováveis de energia como os biocombustíveis tem sido cada vez mais crescente, destacando-se a produção de etanol a partir de fontes amiláceas ou celulósicas (CAMACHO, 2009). Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2012), biocombustível é a denominação genérica conferida aos combustíveis derivados de biomassas renováveis como cana-de-açúcar, oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica, os quais podem substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis derivados do petróleo ou gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Desta forma, sua utilização contribui para a redução das emissões

de gases de efeito estufa, causando um menor impacto no ambiente (LEE e LAVOIE, 2013).

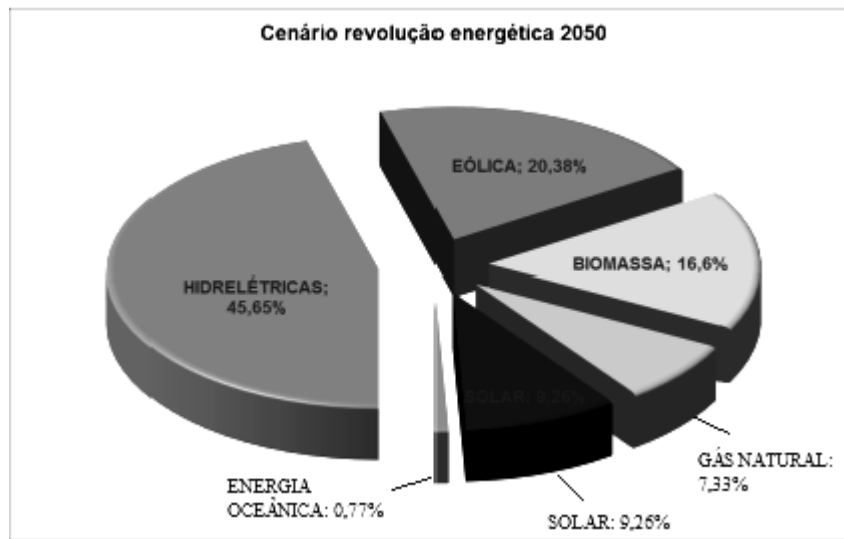


Figura 1. Geração total de eletricidade – cenário revolução energética para 2050.

Fonte: GREENPEACE, 2010.

O Brasil vem por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura 22% a 25% na gasolina, colocando o país internacionalmente em uma posição extremamente favorável, em termos de emissão de CO₂ (MAPA, 2013). Em 2015 o Brasil foi considerado o maior produtor de cana-de-açúcar e de álcool, conquistando cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA, 2015).

De acordo com o Sistema de Acompanhamento de Produção Canavieira (SAPCANA) ligado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção brasileira de etanol em 2012 correspondeu a 23 milhões de litros, sendo 51% deste total (11,6 milhões de litros) produzidos pelo Estado de São Paulo (MAPA, 2013) (Figura 2).

Brasil 1995-2012

Produção total de álcool

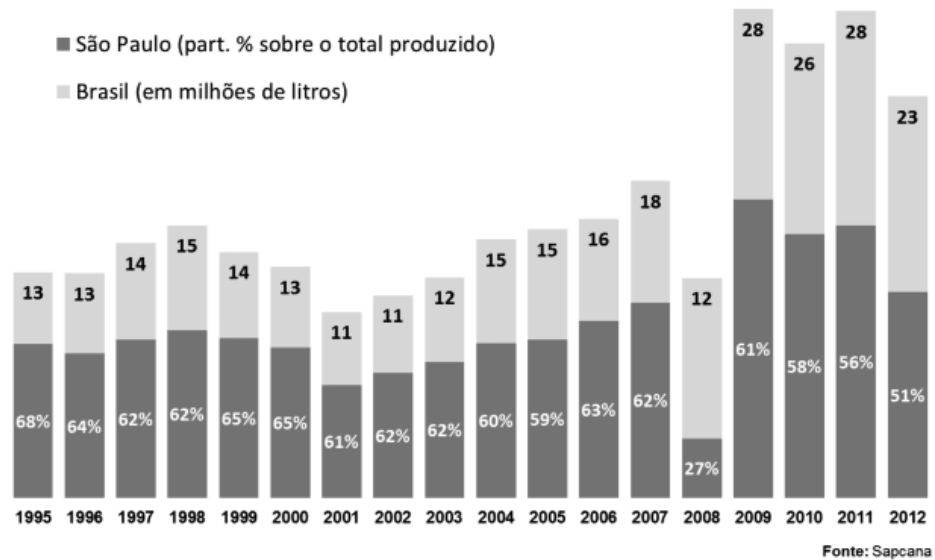


Figura 2. Produção total de álcool no Brasil, nos anos de 1995 a 2012.

Fonte: SANCANA, 2012.

De 1993 até 2001, a produção de açúcar foi mais que triplicada. Em 2010, cerca de 722 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram colhidas no país (IBGE, 2010) (Figura 3), sendo este valor elevado para 768 milhões de toneladas em 2013. De acordo com cálculos do Banco Nacional de Desenvolvimento Social (BNDES), dependendo do sucesso da exportação do etanol, estima-se para 2017 uma colheita de 1 bilhão de toneladas de cana-de-açúcar (KOHLHEPP, 2010). Ainda, estimativas prevêem um aumento na produção de açúcar correspondente a 3,25% até 2018-2019, quando cerca de 47,34 milhões de toneladas do produto deverão ser produzidas (MAPA, 2015).

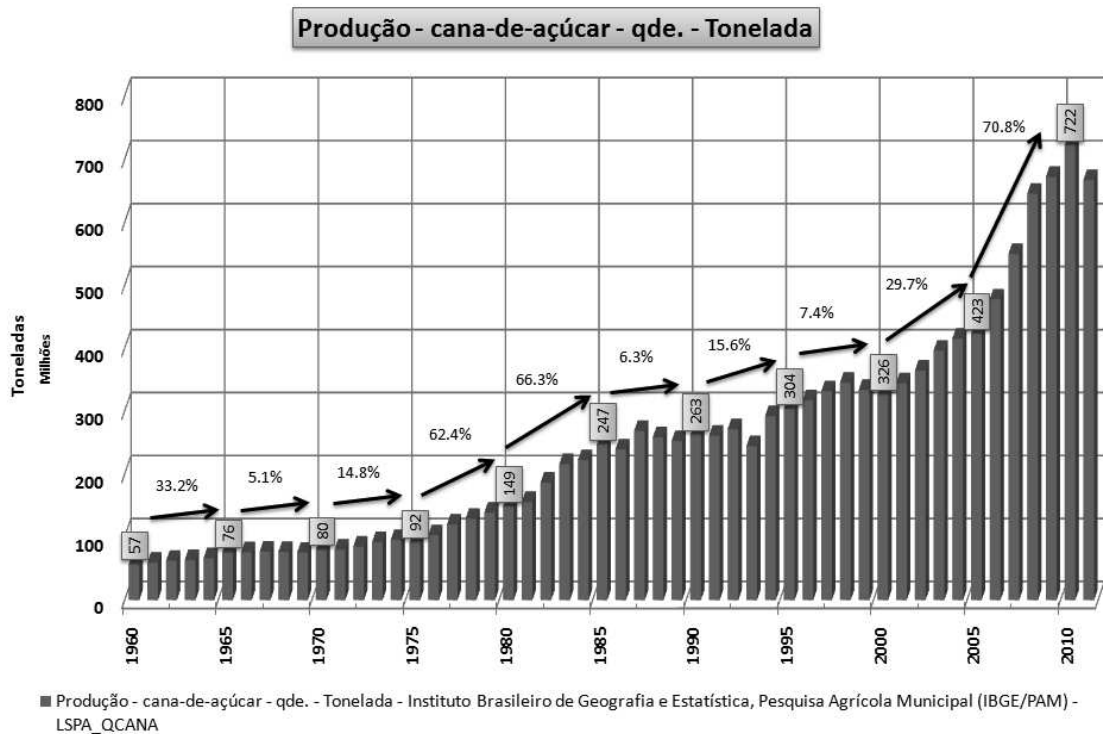


Figura 3. Produção de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos 50 anos.

Fonte: IBGE, 2010.

Com exceção da cana-de-açúcar, as tecnologias comercialmente disponíveis na atualidade para a produção de álcool de primeira geração a partir de biomassas sacaríneas e amiláceas envolvem ganhos energéticos e ambientais bastante discretos. Além disso, essas matérias-primas apresentam uma limitada vantagem econômica e encontram, em geral, mercados alternativos mais remuneradores, como alimentos ou insumos para outros fins. Apesar das vantagens de utilização já destacadas, a cana-de-açúcar não é uma opção viável para todas as regiões do planeta. Além disso, muitos impactos negativos resultam de sua produção em larga escala, incluindo a destruição de regiões de alta biodiversidade, o desmatamento, a degradação de solos por meio do uso de produtos químicos, a contaminação de recursos hídricos e o agravamento das condições de trabalho no campo (GOLDENBERG et al., 2008).

Desta forma, analisando-se a atual conjuntura do mercado nacional de álcool combustível, fica notória a necessidade de processos alternativos que busquem diminuir a dependência da produção nacional de etanol em relação à cana-de-açúcar, para evitar que se

tenha toda uma matriz energética concentrada em apenas um cultivo. De acordo com o BNDES (2008), novas rotas tecnológicas devem ser descobertas, a fim de permitir a produção de um biocombustível eficiente, tanto do ponto de vista econômico, quanto do ponto de vista ambiental. De acordo com Pervez et al. (2014), uma vez que a demanda e o custo dos materiais amiláceos comumente empregados na produção de etanol aumentam a cada dia, a utilização de matérias-primas alternativas para este fim torna-se indispensável.

O etanol pode ser obtido basicamente de três formas: via destilatória, sintética e fermentativa. A via destilatória não tem importância econômica no Brasil, exceto para algumas regiões vinícolas. No caso da via sintética, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha. Porém, a forma de produção do álcool etílico mais importante no Brasil é a via fermentativa e um dos fatores que contribuem para isso é o fato de haver um grande número de matérias-primas naturais em todo o país (LIMA, 2001).

As matérias-primas usadas na produção de etanol por fermentação são de origem agrícola e devem conter açúcares simples, amido ou ainda celulose. São classificadas em açucaradas, incluindo a cana-de-açúcar, melão, beterraba, malte; em matérias-primas amiláceas e feculentas, que são compostas por amido, encontrado em grãos de cereais, raízes e tubérculos (alguns exemplos de matérias-primas amiláceas são o milho, arroz, trigo e cevada e exemplos de matérias-primas feculentas são a mandioca, cará, batata-doce e batata-inglesa) bem como em matérias-primas celulósicas que apresentam como constituintes a celulose e a hemicelulose (são exemplos as matérias-primas celulósicas, resíduos de serraria, madeiras e seus derivados, como palha bambu, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar). No caso das matérias-primas amiláceas e feculentas e das matérias-primas celulósicas, para que fermentação etanólica ocorra, a hidrólise prévia denominada sacarificação é necessária, a fim de serem obtidos os açúcares fermentescíveis (VASCONCELLOS, 2010).

Nos últimos anos, várias fontes renováveis em termos de biomassa agriculturável têm sido investigadas para a produção de bioetanol e este desenvolvimento tem conferido benefícios para as indústrias biotecnológicas. Entre os vários materiais amiláceos disponíveis pelo mundo, o milho, o trigo, a batata, a palha de milho e o amido puro têm sido utilizados com sucesso para a produção comercial de etanol (SHARIFFA et al., 2009, LI et al., 2014). Porém, as limitações dos processos atuais de produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas, em particular as grandes quantidades de energia requeridas para os processos de

liquefação e a demanda de quantidades substanciais de enzimas para sua subsequente hidrólise, significativamente influenciam a viabilidade econômica de se usar o amido como matéria-prima nesse processo (SHARIFFA et al., 2009; SUN et al., 2010).

3.2. Matérias-primas amiláceas

Como mencionado anteriormente, a produção de bioetanol a partir de vários materiais amiláceos como o milho, o trigo, a mandioca e o amido tem recebido muita atenção nos últimos anos (LI et al., 2014). O amido é o maior polissacarídeo de reserva presente nas plantas e também é o segundo mais abundante depois da celulose. É uma das principais matérias-primas enzimaticamente ou quimicamente convertida em produtos para subsequente uso em vários setores industriais, incluindo as indústrias alimentícia e de detergentes (HII et al., 2012).

Este complexo polissacarídeo não apresenta sabor, sendo insípido ao paladar. Pode ser transformado em açúcares e depois submetido à fermentação alcoólica. Neste processo, o amido pode ser hidrolisado por via química (ácido, calor e pressão) ou por via enzimática. Aqueles que são hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. Parte dos hidrolisados são dextrinas, ainda insípidas e pouco fermentescíveis, e parte são açúcares derivados de amido, como a maltose e a glicose (COSTA, 2010).

O amido é composto principalmente de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. Amidos de origens distintas apresentam diferentes proporções entre seus conteúdos de amilose e amilopectina, diferindo significativamente em muitas propriedades físicas. Em adição, a proporção entre amilose e amilopectina está condicionada às espécies vegetais consideradas, ao grau de maturação das plantas e às condições de cultivo empregadas (HII et al., 2012).

A amilose e a amilopectina apresentam diferentes estruturas e propriedades (Figura 4). A amilose é um polímero linear helicoidal da glicose, solúvel em água, consistindo de mais de 6000 unidades de D-glicose unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (TESTER et al., 2004). Ao contrário da amilose, a amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada, constituída por cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4, contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação α -1,6, possuindo 15 a 45 unidades de glicose (PÉREZ e BERTOFT, 2010; SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

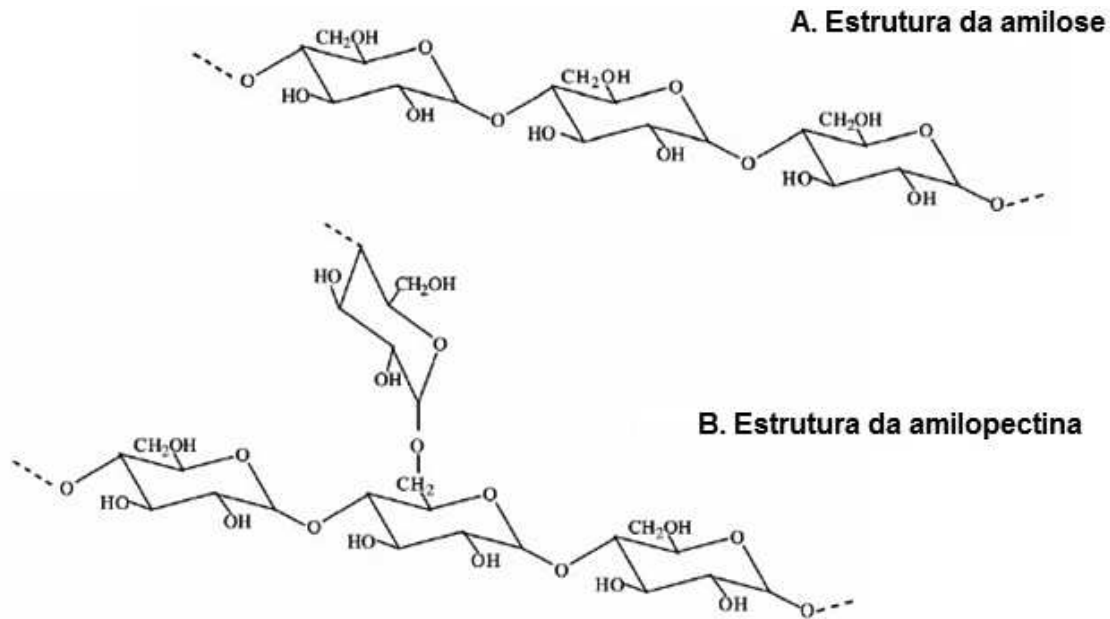


Figura 4. Estrutura da amilose e da amilopectina. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose (A) é um polímero linear constituída por 6000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e amilopectina (B), constituída por cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4, contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação α -1,6, possuindo 15 a 45 unidades de glicose.

Fonte: SOUZA e MAGALHÃES, 2010.

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] é uma espécie dicotiledônea pertencente à família botânica Convolvulaceae, que agrupa aproximadamente 50 gêneros e mais de 1000 espécies, sendo que, dentre elas, somente o cultivo da batata-doce apresenta expressão econômica. Tanto a casca quanto a polpa da batata-doce podem apresentar coloração variável de roxo, salmão, amarelo, creme ou branco. Possui dois tipos de raiz: a de reserva ou tuberosa, que constitui a principal parte de interesse comercial, e a raiz absorvente, responsável pela absorção de água e de nutrientes. Sua origem é na América Central e do Sul, sendo uma planta considerada de ampla adaptação e fácil cultivo (SILVA et al., 2008).

O baixo custo de produção, a rusticidade do cultivo, o alto potencial produtivo e o valor alimentício da batata-doce são fatores relevantes para sua utilização, principalmente na agricultura familiar. Além de ser uma cultura de ciclo perene e resistente à pragas e doenças, também constitui uma proteção para o solo (EMBRAPA, 2007; SENANAYAKE et al., 2013).

De acordo com Duvernay et al. (2013), diversas características agronômicas determinam sua adaptação aos solos menos férteis, tais como alta taxa de multiplicação, resistência à seca, baixa degeneração do material de propagação, ciclos de crescimento curtos e rápida cobertura do solo, protegendo-o de chuvas erosivas, além de auxiliar no controle de plantas daninhas.

Esta amilácea também é de grande importância na alimentação animal e na produção industrial de farinha, amido e álcool. Quando comparada com outras culturas tais como arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce é mais eficiente em quantidade de energia líquida produzida por unidade de área e por unidade de tempo, visto que produz grande volume de raízes em um ciclo relativamente curto, a um custo baixo, durante o ano inteiro (EMBRAPA, 2007). Assim, a elevada produção de biomassa associada à rusticidade do plantio fazem da batata-doce uma excelente alternativa como matéria-prima para a obtenção de álcool combustível (CAO et al. 2011; DUVERNAY et al. 2013).

O Brasil ainda apresenta uma produtividade baixa de batata-doce, cerca de 12 t ha⁻¹ (IBGE, 2010). Basicamente, toda a produção está voltada para alimentação humana e animal, entretanto existe um grande potencial da cultura na produção de biocombustível, a seleção de clones pode permitir o aumento no rendimento da matéria-prima. Pesquisas desenvolvidas na Embrapa Clima Temperado, envolvendo a seleção de clones, tem possibilitado a obtenção de maiores níveis de produção, as quais experimentalmente chegam a atingir até 60 t ha⁻¹ (CASTRO, 2009). Estudos mais recentes demonstram uma produtividade máxima superior, Gonçalves Neto et. al. (2012) ao estimar parâmetros populacionais e as correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre caracteres de interesse para as principais utilizações da batata-doce obtiveram uma produtividade superior a 90 t ha⁻¹.

A batata-doce é composta por uma grande quantidade de água e amido e uma pequena quantidade de outros componentes como proteína, açúcar, fibra e vitaminas (Tabela 1). Estudos mais recentes demonstram que a disponibilidade de amido na batata-doce é bastante variável. Ao avaliar a composição centesimal de 10 variedades de batata-doce, Nabubuya et al. (2012) verificaram que estas divergiram significativamente em seus teores totais de amido, os quais variaram de 68,4% a 73,6% (p<0,05). Similarmente, Senanayake et al. (2013) encontraram diferenças significativas entre os atributos nutricionais de cinco variedades de batata-doce, onde os teores de amido totais variaram de 33% a 64%.

Resultados preliminares têm demonstrado que um hectare de raiz de batata-doce rende de 30 a 40 toneladas de biomassa. Enquanto uma tonelada de cana-de-açúcar gera 67 litros de álcool, a mesma quantidade de batata-doce pode chegar até 130 litros do combustível (CASTRO, 2009). Ainda, tem sido documentado que a partir de alguns cultivares industriais de batata-doce é possível se obter um rendimento de 4500-6500 litros de etanol por hectare, comparado a 2800-3800 litros obtidos a partir do milho (DUVERNAY et al. 2013; ZISKA et al., 2009).

Tabela 1. Composição química percentual da batata-doce.

Batata-doce	
Componentes	Quantidade
Umidade (%)	71,1
Energia (kJ 100g ⁻¹)	438
Proteína (%)	1,43
Amido (%)	20,1
Açúcar (%)	2,38
Fibra (%)	1,64
Vitamina A (mg 100g ⁻¹)	0,011
Vitamina C (mg 100g ⁻¹)	24

Fonte: BRADBURY, 1990.

3.3. Enzimas amilolíticas

As enzimas são macromoléculas que pertencem à classe das proteínas globulares e, como todas as proteínas, são heteropolímeros de distintos aminoácidos, sendo que algumas incluem em sua estrutura um componente não-proteico, designado grupo prostético. Elas são catalisadores efetivos, sendo responsáveis por reações químicas coordenadas existentes nos processos biológicos (PRASAD, 2011).

As enzimas estão presentes em todos os tipos de célula, seja animal, vegetal ou microbiana. As células microbianas são importantes produtoras de enzimas e apresentam muitas vantagens, tais como o fato de que a produção pode ser aumentada facilmente, são relativamente fáceis de serem cultivadas em ambiente controlado e são altamente sensíveis às alterações genéticas, permitindo a obtenção de linhagens melhoradas quanto à produtividade e tipo de enzima produzida (SANTOS, 2007).

De acordo com Gupta et al. (2003), as amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as β -amilases e as glucoamilases. As α -amilases (EC 3.2.1.1) (endoamilases) hidrolisam randomicamente as ligações internas do tipo α -1,4 da amilose e da amilopectina, resultando na produção de cadeias curtas (dextrinas, que apresentam 10 a 20 unidades de glicose de comprimento), bem como unidades de glicose e de maltose livres. As β -amilases (EC 3.2.1.2) (exoamilases) hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades não redutoras dos polissacarídeos, liberando maltose. Já as glucoamilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as ligações terminais 1,4 nas unidades glucopiranosil sucessivamente a partir das extremidades não redutoras das cadeias de amido para liberar glicose. Enquanto que as α -amilases contribuem no processo de liquefação do amido, as glucoamilases são predominantemente responsáveis pela sacarificação deste polímero (SUNDARRAM et al., 2014). De acordo com ROCHA (2010), dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α -amilase, pois desempenha um papel fundamental na transformação do amido em produtos com baixo peso molecular, os quais podem ser posteriormente utilizados por outras enzimas do mesmo grupo.

3.4. Processo de hidrólise do amido

Como mencionado anteriormente, ao se considerar matérias-primas amiláceas, como é o caso da batata-doce, antes de realizar o processo de fermentação para a produção de etanol é necessário que o processo de hidrólise deste material seja conduzido, para posterior obtenção de glicose (CEREDA, 2001). A hidrólise ou sacarificação do amido pode ocorrer por meio de dois processos, ácido ou enzimático. Atualmente, ambos os processos têm sido amplamente utilizados para converter a biomassa em açúcares fermentescíveis. Dentre as vantagens da utilização da hidrólise ácida pode ser citado o tempo de conversão mais curto (WANG e COPELAND, 2015). Além disso, este processo permite a obtenção de quantidades consideráveis de açúcares, a partir de matérias-primas mais complexas. Porém, apresenta como principais desvantagens a necessidade de neutralização ao final do processo, a fim de assegurar a fermentação conduzida posteriormente, o emprego de altas temperaturas, a corrosão de equipamentos, bem como a geração de açúcares não fermentescíveis, os quais podem tornar o processo economicamente inviável (LIN e TANAKA, 2006; EL-ZAWAWY et al., 2011).

Por outro lado, a hidrólise enzimática oferece potencial de redução de custos em longo prazo, sendo possível atingir rendimentos próximos dos estequiométricos em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química. Ainda, é um processo menos poluente (LEATHERS, 2003; PRASAD, 2011). A desvantagem desse processo é o elevado custo das enzimas e as elevadas temperaturas de reações empregadas (YANG et al., 2011), o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo (RABELO, 2007).

A conversão enzimática do amido inclui os processos de gelatinização, a liquefação e a sacarificação. A gelatinização consiste na dissolução dos grânulos de amido, a fim de tornar o amido mais acessível às enzimas amilolíticas, culminando na formação de uma suspensão viscosa. A liquefação envolve a hidrólise parcial do amido e a perda em sua viscosidade, enquanto que a sacarificação resulta na liberação de glicose e maltose devido a uma etapa de hidrólise adicional (SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Durante a liquefação, a enzima α -amilase promove a clivagem das ligações glicosídicas α -1,4, promovendo a liberação de cadeias curtas de dextrinas. Na segunda etapa, a enzima glucoamilase ataca as ligações terminais α -1,4 dos oligômeros, a fim de liberar glicose. Entretanto, a degradação do amido nunca é completa, de forma que o produto final é tipicamente uma mistura de glicose, maltose e açúcares maiores. Os valores de pH, temperatura e outras condições ótimas de operação diferem consideravelmente entre essas etapas (BETIKU et al., 2013).

Para a hidrólise do amido de batata-doce, Magalhães (2007) adaptou a metodologia de Pereira Jr et al. (2004) e Cereda (2005), realizando a moagem da batata-doce, que foi então diluída em água destilada e então aquecida gradualmente até 90 °C e a temperatura mantida por 25 minutos para a gelatinização do meio. Em seguida foi adicionada a enzima liquidificante Termamyl 120L (α -amilase), mantendo-se a mesma temperatura, sob agitação constante. Após isso, foi feito o resfriamento e o pH ajustado para 4,5. A sacarificação foi conduzida adicionando-se a enzima sacarificante glucoamilase AMG 300L, a 60 °C, durante 30 min, sob agitação constante. Uma vez finalizada a hidrólise do amido, o meio foi resfriado a 30 °C e a levedura fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* foi inoculada. Posteriormente, o meio fermentado foi transferido para o sistema piloto de destilação, a fim de promover a separação do etanol e do vinhoto.

As etapas descritas por Silveira et al. (2008) para produção de etanol de batata-doce consistem inicialmente em lavar as raízes, que então são moídas para formar uma massa ralada, a qual é posteriormente transferida para a dorna de cozimento com agitação, sendo

adicionado água na proporção 2:1 (m/v). Assim que a temperatura do meio atinge 60 °C, a enzima liquidificante Termamyl 120L é adicionada. O aquecimento é gradual até 90 °C. O meio hidrolisado é então resfriado e o pH ajustado entre 4,0 e 4,5. Quando a temperatura do meio atinge 60 °C, a enzima glucoamilase AMG 300L é adicionada, a fim de iniciar o processo de sacarificação. Esta temperatura é mantida por 1 h, sob agitação. Em seguida, o meio hidrolisado é então resfriado a 30 °C. Nesta fase, é quantificada a concentração de açúcares e o meio é resfriado a 13 °C. Posteriormente, a levedura *S. cerevisiae* é inoculada em uma concentração de 10 g L⁻¹ de meio hidrolisado. Finalmente, o álcool é separado da água por meio da destilação.

Como mencionado anteriormente, os processos hoje existentes para produção de etanol a partir de fontes amiláceas requerem a hidrólise prévia da matéria-prima, a fim de converter o amido em açúcares fermentescíveis, em geral por meio de um processo enzimático conduzido a elevadas temperaturas (UTHUMPORN et al., 2010). Conseqüentemente, esses processos apresentam elevados custos, associados à obtenção das enzimas e elevada demanda energética, devido às altas temperaturas geralmente adotadas para a gelatinização e hidrólise do amido (SHARIFFA et al., 2009; VIKTOR et al., 2013). No entanto, a fim de se tornar viável, o processo de hidrólise da biomassa amilácea deve ocorrer da forma mais econômica possível.

3.4.1. Processo de hidrólise do amido granular

Com relação aos custos decorrentes da elevada demanda energética, os mesmos podem ser reduzidos se a etapa de hidrólise for realizada em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, ou seja, sobre o amido granular, um processo conhecido como “cold hydrolysis” (CASTRO et al., 2010). Assim, este processo torna-se economicamente mais viável. Diferentemente dos processos convencionais, neste processo é necessária a ação conjunta de um “complexo” enzimático sobre o amido na forma granular, as quais eliminam as etapas de gelatinização, liquefação e cozimento, resultando na redução no consumo de energia (GALVEZ, 2005; LI et al., 2012).

As temperaturas de gelatinização variam entre os amidos de diferentes fontes. SINGH et al. (2003) reportaram valores na faixa de 61 a 72 °C para a batata, 68 a 74 °C para o milho, 65 a 79 °C para o arroz e 56 a 62 °C para o trigo. Diferentemente, os amidos de farinha de

mandioca e de batata-doce apresentaram temperaturas de gelatinização correspondentes a 70,4 °C e 74,2 °C, respectivamente (SHARIFFA et al., 2009). De acordo com Black et al. (2001), a proporção existente entre amilose e amilopectina da batata-doce influencia diretamente suas propriedades físico-químicas, incluindo a gelatinização, a absorção de água e a viscosidade. Segundo Singh et al. (2003), as diferenças de temperaturas de gelatinização entre os amidos provenientes de fontes distintas podem ser atribuídas às diferenças em seu grau de cristalinidade. Temperaturas elevadas de gelatinização têm sido relatadas como resultado de um elevado grau de cristalinidade, o qual por sua vez confere uma maior estabilidade estrutural aos grânulos, tornando-os mais resistentes a esse processo.

Para Li et al. (2012), os avanços recentes nos processos de hidrólise do amido granular por meio da utilização de enzimas amilolíticas em temperaturas de sub-gelatinização pode conduzir a uma inovação no processo de produção do etanol. Dentre outras vantagens do processo de hidrólise do amido granular em relação aos processos convencionais, podem ser mencionadas a redução da viscosidade do meio líquido, o menor investimento de capital, os menores custos de manutenção e de insumos associados a estas operações e rendimentos potencialmente maiores (GALVEZ, 2005; WANG et al., 2005; SHARIFFA et al., 2009). Entretanto, a heterogeneidade estrutural e a natureza cristalina das moléculas de amido podem dificultar a hidrólise completa desse polissacarídeo, sendo os principais desafios a serem superados para que esta tecnologia seja adotada (LI et al., 2012).

Conforme já descrito anteriormente, o conjunto de todas as amilases apresenta um papel fundamental na hidrólise do amido granular. Entretanto, as matérias-primas vegetais apresentam uma diversidade de componentes em sua composição, como proteínas, celulose, hemicelulose e lignina. A fim de que uma hidrólise completa do amido granular em glicose seja alcançada, além de amilases, é desejável que outros grupos de enzimas também estejam presentes, tais como proteases, celulasas e hemicelulasas. De acordo com Wang et al. (2009), a presença dessas outras hidrolases pode contribuir favoravelmente para uma melhor exposição dos grânulos de amido às amilases, por meio da hidrólise de proteínas e de outros polissacarídeos, bem como pode proporcionar um aumento dos níveis de glicose liberados, devido à hidrólise de outros polímeros de glicose, como a celulose (KIM et al., 2008).

Ainda, neste processo de hidrólise, o amido granular não gelatinizado pode ser submetido a uma etapa inicial de pré-sacarificação. A pré-sacarificação confere uma hidratação à matéria-prima, tornando os grânulos de amido mais suscetíveis à ação hidrolítica,

além de promover uma hidrólise inicial (LEHMANN e ROBIN, 2007; VIDAL et al., 2009). Nesta etapa são utilizadas as enzimas necessárias para a degradação do amido e demais enzimas acessórias, como proteases, celulasas e hemicelulasas (RATTANACHOMSRI et al., 2009; WANG et al., 2009). A pré-sacarificação é conduzida por intervalo de tempo próximo a 2 horas e a uma temperatura um pouco mais elevada, no entanto, ainda inferior à temperatura de gelatinização do amido, entre 40 e 57 °C. O pH nesta etapa é ácido, entre 3,5 e 4,5, faixa de pH ideal para a atuação da maioria das enzimas envolvidas no processo (WANG et al., 2005).

Utumphorn et al. (2010), em seus estudos, promoveram a hidrólise do amido granular proveniente do milho, da mandioca e do sagu empregando-se uma mistura de α -amilase e glucoamilase, a 35 °C, por 24 horas. Estudos similares envolvendo a hidrólise do amido granular do milho, da batata-doce e da tapioca foram conduzidos por Yussof et al. (2013). Rattanachomsri et al. (2009) investigaram a ação de um preparado enzimático, obtido por meio de fermentação submersa com o fungo *A. niger* na hidrólise da polpa de mandioca. Castro et al. (2010) também utilizaram o extrato enzimático obtido por meio do cultivo de *Aspergillus awamori* em fermentação em estado sólido na hidrólise da torta de babaçu. Li et al. (2012) estudaram o efeito do tratamento com uma etapa de pré-aquecimento 5 °C abaixo da temperatura de gelatinização do milho e de triticales (um cereal obtido pelo cruzamento artificial de trigo e centeio). Segundo os autores, por meio da realização de um pré-aquecimento em torno de 30 min a 51-60 °C foi possível alcançar 80 % de eficiência de hidrólise, em um menor tempo de reação (48 h).

Shariffa et al. (2009) relataram que uma etapa de pré-aquecimento sobre os grânulos de amidos de mandioca e batata-doce a 60 °C por 30 min representou um aumento na eficiência de hidrólise de até 14% após 24 h de incubação, em comparação com os processos sem o pré-aquecimento. Segundo os autores, o pré-aquecimento a uma temperatura de sub-gelatinização pode causar o rompimento parcial da estrutura de amido, com um inchaço da região amorfa e expansão de cavidades dos grânulos de amido, tornando-os mais suscetíveis ao acesso das enzimas.

Assim, estes e outros estudos prévios têm despertado o interesse pela descoberta de amilases que são capazes de promover a digestão de matérias-primas amiláceas que não requerem a gelatinização, isto é, amilases que diretamente hidrolisem o amido em uma única etapa, ou que consigam liquefazer o amido em temperaturas moderadas, muito abaixo das

temperaturas empregadas nos processos de gelatinização (Tabela 2). No entanto, é muito mais difícil as amilases atuarem sobre os grânulos de amido do que sobre o amido gelatinizado (UTHUMPORN et al., 2010). Estudos recentes têm demonstrado que as amilases provenientes de *A. niger* foram eficientes em hidrolisar o amido granular proveniente da polpa da mandioca (RATTANACHOMSRI et al., 2009), do trigo, do milho e do arroz (BLAZEK e GILBERT, 2010).

Tabela 2. Processos de hidrólise do amido granular por amilases microbianas.

Matéria-prima	Condições de hidrólise	Enzimas	Micro-organismo	Eficiência	Referência
Torta de babaçu	51 °C, 24 h	Extrato bruto	<i>A. awamori</i> <i>Aspergillus wentii</i>	52%	CASTRO et al., (2010)
Amido de triticale	51 °C, 30 min	Stargen 002		65%	LI et al. (2012)
Amido de milho	60 °C, 30 min	Stargen 002		75%	LI et. al. (2012)
Amido de mandioca	66 °C, 30 min	Stargen 001	<i>Candida</i> sp.		RUIZ et. al. (2011)
Mandioca	66 °C, 30 min	Stargen 001		35%	UTHUMPORN et al., (2010)
Milho	50 °C, 30 min	Stargen		56%	UTHUMPORN et al. (2012)
Milho	48 °C, 3 h	Stargen 001 e protease	<i>S. cerevisiae</i>		WANG (2005)
Batata-doce	60 °C, 1 h	Extrato bruto	<i>A. niger</i>	62,1%	OMEMU et al. (2008)
Batata-doce	60 °C, 30 min	α -Amilase e glucoamilase		27-34%	SHARIFFA et al. (2009)
Polpa de mandioca	40 °C, 48 h	Extrato bruto	<i>A. niger</i>	91,7%	RATTANA-CHOMSRI et al. (2009)
Amido de mandioca	60 °C, 90 min	Extrato bruto	<i>A. awamori</i>	60%	PERVEZ et al. (2014)
Milho	45 °C, 24 h	Extrato bruto	<i>Aspergillus</i> sp.		AGGARWAL et al. (2001)

3.5. Produção de enzimas microbianas

Para obtenção de enzimas de origem microbiana, Fellows (1994) recomenda que os micro-organismos sejam capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção da enzima deve ocorrer em ritmo elevado, constante e em pouco tempo; os métodos para recuperação das enzimas devem ser simples e a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

As vantagens da utilização de enzimas microbianas em relação às de origem animal ou vegetal, incluem o baixo custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, a produção de enzimas com características físico-químicas distintas, geralmente relacionadas ao habitat e fisiologia do micro-organismo produtor e a possibilidade de manipulação genética.

Nesse sentido, tanto a fermentação submersa (FSm), quanto a fermentação em estado sólido (FES) têm sido utilizadas para a produção de enzimas e de outros compostos de interesse industrial microbianos, a partir da utilização da biomassa, como uma alternativa para a valorização de resíduos e também para resolver os problemas ambientais decorrentes de sua deposição no ambiente (KUMAR et al., 2012). Em nível de pesquisas, ambos os sistemas têm sido empregados. Entretanto, algumas técnicas apresentam melhores resultados do que outras (SUBRAMANIYAM e VIMALA 2012).

A FSm, também conhecida como cultivo submerso, apresenta como principal característica o uso de meios líquidos fermentativos. Nesse tipo de fermentação, o substrato é dissolvido ou suspenso em água. Desta forma, a água não é um fator limitante. A FSm é geralmente empregada nos processos industriais, por ser mais facilmente adaptável aos processos fermentativos, proporcionar a obtenção de elevados rendimentos, além de apresentar um baixo custo e risco de contaminação (KRISHNA, 2005). Entretanto, apresenta como desvantagem a demanda por espaços físicos, por água e energia (JAIN et al. 2013).

A FES pode ser definida como um processo fermentativo que envolve uma matriz sólida que atua como suporte físico, além de ser uma fonte de nutriente que permite o desenvolvimento dos micro-organismos, na ausência de água livre (SINGHANIA et al. 2009). Esse sistema apresenta diversas vantagens, como a de mimetizar o habitat natural no qual o micro-organismo cresce, a atividade de água reduzida, a qual previne a contaminação microbiana, e o consumo limitado de água e de espaço. Adicionalmente, tem sido reportado

que a FES propicia a obtenção de maiores rendimentos, maior estabilidade do produto final e menor requerimento energético, quando comparada a FSm (AYYACHAMY e VATSALA, 2007; SINGHANIA et al. 2009; JAIN et al. 2013). Entretanto, a produção em larga escala representa um obstáculo a ser superado pelos processos de FES, uma vez que diferentes gradientes (umidade, temperatura, concentração de substrato, entre outros) podem ser estabelecidos ao longo do biorreator, os quais podem influenciar negativamente o processo. Nesse sentido, a dissipação de calor, a transferência de massa e o controle dos parâmetros de fermentação são os principais obstáculos a serem superados (HÖLKER e LENZ, 2005; KHANAHMADIA et al. 2006; SINGHANIA et al. 2009).

O processo de produção industrial de enzimas de origem microbiana pode ser dividido em duas etapas: processo fermentativo e processo de separação e recuperação das enzimas a partir da fermentação (RODARTE, 2005). Em todas as etapas de separação e recuperação das enzimas é necessário manter condições não desnaturantes, ou seja, condições nas quais as enzimas não perderão atividade. As enzimas intracelulares têm maior custo que a enzimas extracelulares e, conseqüentemente, as primeiras geralmente são imobilizadas para que possa realizar a recuperação após o processo. Além disso, o custo de produção também está associado ao grau de pureza requerido no processo (ROCHA, 2010). As exoenzimas, ou seja, as enzimas produzidas e secretadas pela célula, possuem maior interesse biotecnológico, visto que sua extração e purificação são menos complexas e onerosas (MARQUARDT et al., 2003).

Ainda, os substratos precisam ser adequados para o desenvolvimento do micro-organismo e para produção enzimática. A sua composição precisa suprir as exigências do micro-organismo, além de estar devidamente condicionada em termos de pH, temperatura e esterilidade (SCHMIDELL, 2001).

Os substratos mais pesquisados são os resíduos agroindustriais, porque em geral são de baixo custo e abundantes e possuem estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina (ROCHA, 2011). Além de serem atrativos do ponto de vista nutricional, os resíduos agroindustriais tornaram-se uma alternativa de baixo custo para a produção em larga escala. Também deve-se atentar ao fato de que com a sua utilização, o risco de aumento na poluição do ambiente é diminuído, uma vez que estes não serão descartados de forma inadequada na natureza (TREICHEL et. al., 2010; SBARDELOTTO et al., 2013; SHARMA e KANWAR, 2014,).

A cultura da batata-doce é uma das fontes geradoras de resíduos, compostos tanto por raízes quanto por sua parte aérea (ZABALETA et al., 2009). Em muitas indústrias, restaurantes e residências, onde as batatas-doce são consumidas ou processadas em produtos de maior valor agregado, a casca é essencialmente tratada como um resíduo, resultando em problemas ambientais decorrentes de sua deposição (BETIKU et al., 2013). Por esta razão, ressalta-se a necessidade de estudos no intuito de avaliar o emprego da casca de batata-doce em bioprocessos, a fim de agregar valor a este resíduo, bem como reduzir o seu descarte na natureza.

3.5.1. Produção de amilases microbianas

As amilases podem ser isoladas a partir de plantas, animais ou micro-organismos. No entanto, nos últimos anos, a maior parte das pesquisas tem focado na produção microbiana dessas enzimas. Além das razões já anteriormente apresentadas, as quais justificam o interesse em enzimas produzidas por micro-organismos, o fato de amilases microbianas serem geralmente mais estáveis do que aquelas advindas de plantas ou de animais (TANYILDIZI et al., 2006; SUNDARRAM et al., 2014) relevam a utilização de micro-organismos em sua produção.

Uma ampla variedade de micro-organismos incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras estão envolvidos na degradação do amido na natureza. Dentre as fontes bacterianas, as espécies mais frequentemente utilizadas na produção de amilases pertencem ao gênero *Bacillus*. As espécies *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* são as mais amplamente utilizadas para a produção comercial destas enzimas. Outras espécies que têm sido exploradas para a produção de amilases incluem *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (SUNDARRAM et al., 2014).

Em relação à produção de enzimas, os fungos filamentosos são particularmente interessantes, por promoverem sua secreção diretamente no meio de cultivo, em grandes quantidades, facilitando sua recuperação, bem como sua purificação (POLIZELI et al., 2005). Em adição, as amilases proveniente de fungos filamentosos são preferenciais quando comparadas a outras fontes microbianas, devido a uma maior aceitação de seu *status* GRAS (reconhecimento como seguro) (GUPTA et al., 2003; SINDHU et al., 2009). Ainda, as

amilases fúngicas têm atraído atenção devido aos altos níveis de produtividade apresentados por estes micro-organismos (DAR et al., 2014).

De acordo com Kathiresan e Manivannan (2006) e Dar et al. (2014), as fontes fúngicas produtoras de amilases têm se limitado a isolados terrestres, particularmente àqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Segundo Gomes et al. (2005), estudos sobre a produção de amilases em países desenvolvidos tem se centrado especialmente no gênero *Aspergillus*, devido à natureza ubíqua e não fastidiosa de suas espécies. A Tabela 3 apresenta estudos relacionados à produção de amilases por *Aspergillus* spp.

Tabela 3. Produção de amilases por *Aspergillus* spp.

Linhagem fúngica	Fermentação	Substrato	Produtividade	Referência
<i>A. flavus</i>	FES	Amido	74 U mg ⁻¹	BHARDWAJ et al. (2012)
<i>A. niger</i>	FES	Gramma preta	86 U mg ⁻¹	SUGANTHI et al. (2011)
<i>A. niger</i>	FES	Casca de amendoim	726 U g ⁻¹	PAULCHAMY (2008)
<i>A. niger</i>	FSm	Água de maceração do milho/sacarose	1744 U mL ⁻¹	CHIMATA et al. (2011)
<i>A. niger</i>	FSm	Farinha de mandioca	10,5 U mL ⁻¹	STROPARO, et al. (2011)
<i>A. oryzae</i>	FES	Farelo de trigo	1986 U g ⁻¹	ZAMBARE (2010)
<i>A. gracilis</i>	FSm	Amido	131.02U mg ⁻¹	ALI et al. (2014)
<i>A. niger</i>	FSm	Casca de mandioca	19,34 mg mL ⁻¹	LAWAL et al. (2014)
<i>A. awamori</i>	FES	Farelo de trigo	4528 U g ⁻¹	NEGI e BANERJEE (2010)
<i>A. niger</i>	FES	Casca de mandioca	54,08 U g ⁻¹	CRUZ (2011)
<i>A. oryzae</i>	FES	Bagaço de malte	34 U g ⁻¹	FRANCIS et al. (2003)
<i>A. niger</i>	FSm	Batata-doce	0,893 U mL ⁻¹	TAMILARASAN et al. (2012)

Nos estudos envolvendo a produção de amilases por fungos filamentosos, uma atenção especial tem sido dirigida a condições de cultivo específicas, bem como a seleção de linhagens para a produção de amilases em larga escala (GUPTA et al., 2003). A otimização das condições de fermentação, envolvendo especialmente parâmetros físicos e químicos, é essencial no desenvolvimento dos processos de produção dessas enzimas, devido seu impacto na economia e na praticidade do processo. Nesse sentido, o efeito de vários fatores incluindo

pH, temperatura, fontes de carbono e de nitrogênio e agitação sobre a produção de amilases tem sido investigado (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Ainda, o uso de meios de fermentação de baixo custo para a produção de amilases usando resíduos agroindustriais tem sido reportado em diversos trabalhos. Farelo de trigo, resíduos do processamento do arroz, sabugo de milho, resíduos de cervejaria, casca de mandioca, e outros resíduos contendo amido tem ganhado importância como suportes do crescimento microbiano durante a produção enzimática (ADENIRAN e ABIOSE, 2009; SINGH et al., 2012a; CELESTINO et al., 2014).

3.6. O gênero *Aspergillus* e a espécie *A. niger*

O gênero *Aspergillus* é muito comum entre os fungos filamentosos e bastante estudado. As espécies deste gênero têm ampla distribuição e podem ser encontradas na superfície, no ar e na água, bem como em organismos vegetais e animais. O sucesso da dispersão de *Aspergillus* spp. é atribuído à sua imensa produção de esporos, os quais são capazes de dispersarem-se por curtas e longas distâncias (KRIJGSHELD et al., 2013).

Os fungos deste gênero são degradadores de matéria orgânica, deteriorantes de alimentos e patogênicos de plantas, do homem e de outros animais. Entretanto, esses microorganismos são muito interessantes, não só em termos de aplicação biotecnológica, mas também para a economia, devido às suas propriedades metabólicas (ROSA et al., 2002; DAGENAIS e KELLER, 2009).

De acordo com Bennett (2010), o gênero *Aspergillus* compreende cerca de 260 espécies. No entanto, a sistemática deste gênero está em permanente estado de fluxo, com espécies sendo adicionadas, ou mesmo reclassificadas, com base em uma abordagem polifásica, compreendendo caracteres morfológicos, bioquímicos, ecológicos, genéticos e moleculares (PETERSON et al., 2001; FRISVAD et al., 2005; PETERSON, 2008; BENNETT, 2009; SAMSON e VARGA, 2009; KRIJGSHELD et al., 2013).

Para a sua classificação, é muito importante a análise de suas estruturas morfológicas (Figura 5). Em geral, as colônias têm crescimento rápido e exuberante, sendo inicialmente brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro (SANTOS, 2007). Um aspecto notável das espécies pertencentes a este grupo é o fato de produzirem o “aspergillum” ou cabeça aspergilar, que consiste de uma haste (estipe) asseptada que termina em uma vesícula,

sobre a qual nascem as células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídios com diferentes pigmentações e ornamentações. Quando simples, a cabeça aspergillar denominada uniseriada consiste em uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídios. Já a cabeça aspergillar bisseriada apresenta antes da camada de fiálides, uma camada de células que as geraram, denominadas de métulas. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estipe) e a célula pé é chamada de conidióforo (SANTOS, 2007; BENNETT, 2010).

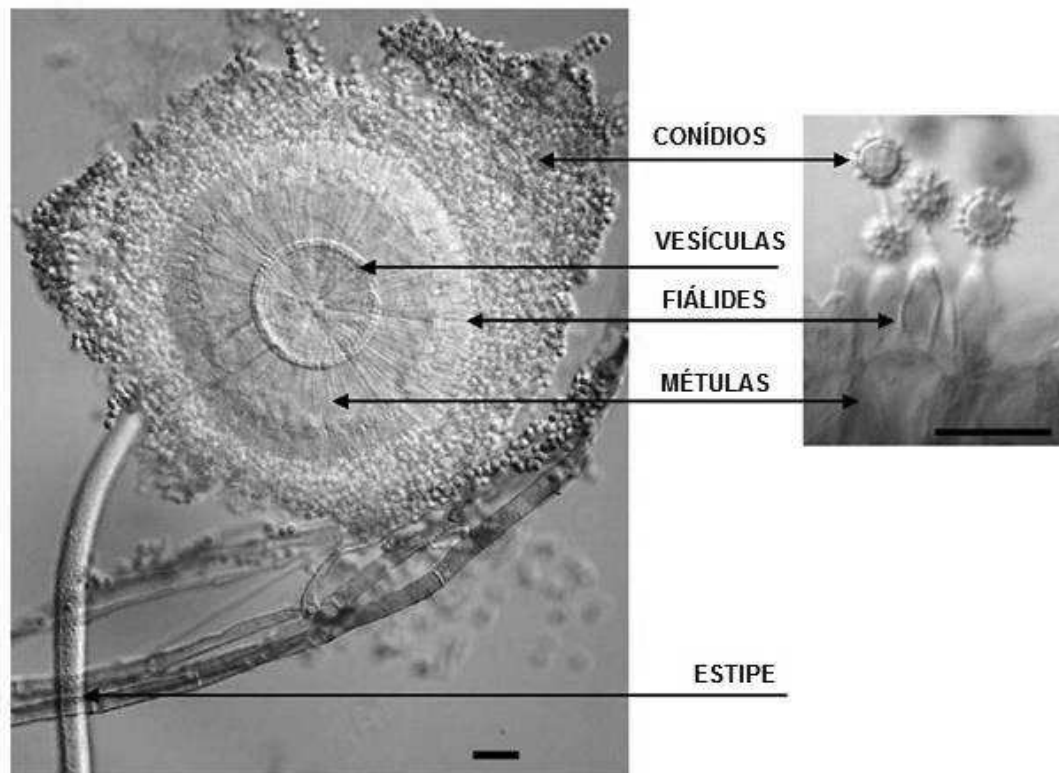


Figura 5. Conidióforo de um *Aspergillus* bisseriado (*Aspergillus ocraceus*) e terminologia das estruturas utilizadas em sua identificação e classificação. O conidióforo é constituído pelo aspergillum (designação que se dá à parte superior da estrutura, ou seja, o conjunto da vesícula e das células reprodutivas especializadas que contém) e pelo estipe. São visíveis nas figuras as métulas (células estéreis), fiálides (células conidiogênicas) e conídios (esporos assexuais).

Fonte: Adaptado de SERRA, 2005.

A. niger, como seu próprio nome sugere, é um fungo filamentosso, escuro, comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). É uma das espécies mais comuns

do gênero, apresentando algumas linhagens toxicogênicas. Este fungo é capaz de crescer rapidamente em vários substratos artificiais, produzindo colônias de base branca, cobertas por uma densa camada de cabeças conidiais, variando do marrom-escuro ao preto (Figura 6C). Os conidióforos variam de hialinos a marrons com cabeças globosas, com métulas e fiálides ou somente fiálides (Figura 6A). Os conídios são escuros e globosos, medindo de 3,5 a 5 μm de diâmetro (Figura 6B) (SAMSON et al., 2004).

A espécie *A. niger* é de grande destaque, não somente pela grande variedade de compostos que esta espécie é capaz de produzir, como também pelo fato de *A. niger* ser considerado um micro-organismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (ABARCA et al., 2004). Este fungo obteve seu primeiro destaque industrial em 1919, onde elevada produção de ácido cítrico por este micro-organismo foi constatada. Porém, somente a partir de 1960 seu uso foi expandido, tornando-se uma grande fonte de produção de enzimas industrialmente relevantes (SCHUSTER et al., 2002). Nos últimos anos, diversos outros compostos de grande importância têm sido isolados a partir de *A. niger*, incluindo a aurasperona A com atividade antioxidante (SONG et al., 2005), o rubrofusarem B com atividade citotóxica, o ácido tensiuico A com atividade antimicrobiana (HASEGAWA et al., 2007), os antifúngicos “yanuthones” (PETERSEN et al., 2015), dentre outros metabólitos (NIELSEN et al., 2009; RICHTER et al., 2014).

Espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir mais de 200 enzimas extracelulares, muitas de grande importância industrial (CASTRO et al., 2010; SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Dentre as espécies de maior interesse biotecnológico podem ser citadas *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007).

Em relação à produção de enzimas amilolíticas, as espécies *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* têm sido relatadas como ótimas produtoras de α -amilase, enquanto que *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. saitari*, *A. terreus* e *A. foetidus* são as espécies mais utilizadas para a produção de glucoamilases (PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005, SOUZA e MAGALHÃES, 2010, DAR et al., 2014). Entretanto, a produção de glucoamilases comerciais é exclusiva das espécies *A. niger* e *A. oryzae* (WANG et al., 2006; SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Ainda, a espécie *A. oryzae* tem recebido maior atenção, por ser um hospedeiro favorável para a expressão de proteínas heterólogas, incluindo amilases, visto que exibem uma extraordinária habilidade de secretar níveis elevados de proteínas e de enzimas industriais (KAMMOUN et

al., 2008). Ao tolerar valores de pHs mais ácidos ($\text{pH} < 3$), *A. niger* exibe uma interessante capacidade de produção de amilases, visto que a contaminação bacteriana pode ser evitada sob estas condições (DJEKRIF-DAKHMOCHE et al., 2008).

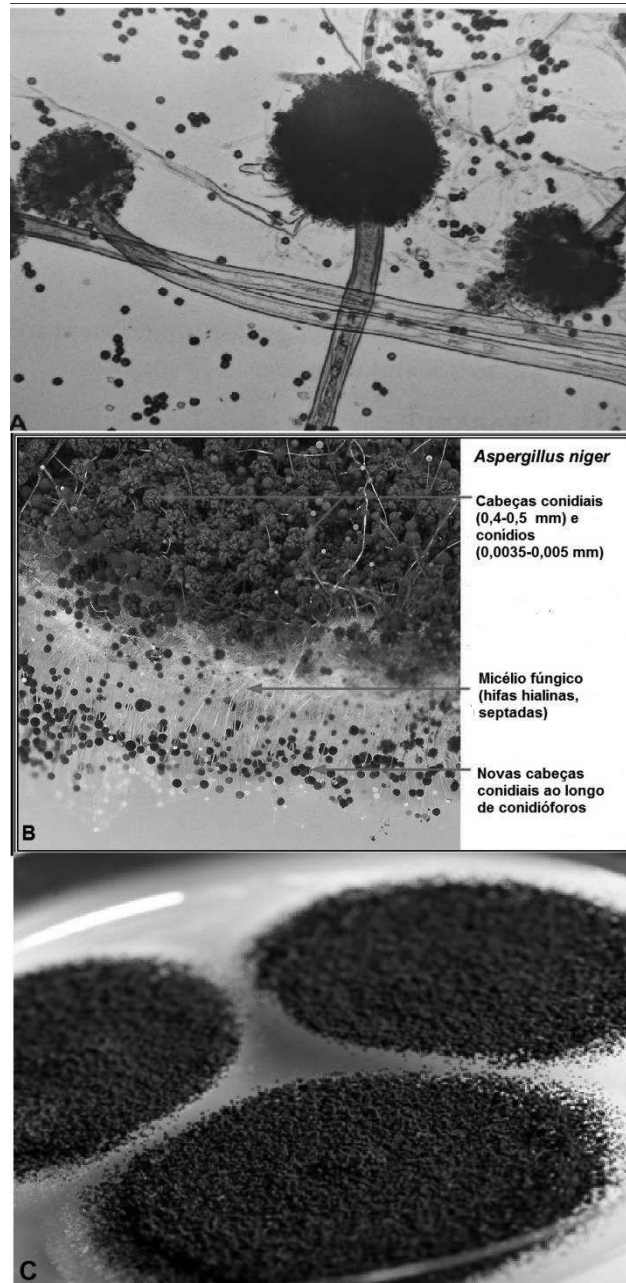


Figura 6. Micro e macromorfologia de *A. niger*. Visualização microscópica de *A. niger*, evidenciando a presença de conidióforos marrons com cabeças conidiais globosas (A, B). Aspecto macroscópico das colônias de *A. niger*, evidenciando a presença de colônias base branca, as quais variam do marrom-escuro ao preto (C).

Fonte: Adaptado de WANE'S World, 2012.

3.7. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

A Metodologia de superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas úteis para aplicações de modelagem e análise, em que a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e a meta é otimizar essa resposta (MONTORO, et al., 2013). Além de definir o efeito de variáveis independentes, isoladas ou em combinação nos processos, também gera um modelo matemático (BASRI, et al., 2007). Ela vem sendo amplamente utilizada como uma técnica de otimização, desenvolvimento e melhoria de processos, baseando-se na utilização de modelos fatoriais, onde a variável resposta é avaliada em todas as combinações possíveis dos fatores. O principal efeito de um fator é definido como a variação na resposta provocada por uma alteração no nível do fator considerado, quando os outros fatores permanecem constantes. Há uma interação (dependência) entre as variáveis, quando o efeito de um fator depende do comportamento do outro (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2012).

Um dos principais objetivos da MSR é a determinação das definições ótimas que resultam em um máximo (mínimo) ou uma resposta, em uma determinada região de interesse. Isso exige a montagem de um “bom” modelo que fornece uma representação adequada da resposta. Também inclui estabelecer um relacionamento entre a resposta e os fatores analisados, podendo desta forma prever os valores da resposta e determinar por meio de testes a importância dos fatores (KHURI e MUKHOPADHYAY, 2010).

Com o objetivo de observar um gráfico de superfície de resposta, linhas de resposta são desenhadas no plano x_1 e x_2 . Na maioria das vezes, o problema da MSR é estabelecer a relação desconhecida entre a resposta e as variáveis dependentes e independentes. Assim, o primeiro passo da MSR é encontrar uma aproximação adequada para a relação real entre Y e as variáveis independentes. Geralmente, um polinômio de baixo grau é aplicado a algumas áreas de variáveis independentes (MONTORO, et al., 2013). Se a resposta é bem modelada para a função linear de variáveis independentes, então a função de aproximação será o modelo de primeira ordem (Equação 1):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

(Equação 1)

Em que y é a resposta observada, β_0 e β_i são parâmetros do modelo que devem ser estimados, x_i são as variáveis em estudo e ε é o erro experimental.

Por outro lado, se houver curva no sistema, um polinômio de grau superior é utilizado, tal como no modelo de segunda ordem (Equação 2):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon$$

(Equação 2)

Em que y é a resposta, x_i e x_j são as variáveis independentes; β_0 e β_i , β_{ij} são parâmetros do modelo que devem ser estimados e ε é um erro aleatório (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

Dentre os diversos tipos de delineamentos experimentais, o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) tem sido amplamente utilizado para o ajuste de um modelo de segunda ordem (SINGH, 2012b). Este delineamento nada mais é do que uma ampliação natural do planejamento fatorial com ponto central, o qual pode ser realizado em uma primeira etapa. A este planejamento inicial, são adicionados pontos axiais (planejamento em estrela) que fornecem os níveis adicionais para o cálculo dos coeficientes do modelo quadrático. A distância dos pontos axiais ao centro do planejamento é $\pm \alpha$, sendo que α pode variar de 1 até \sqrt{k} , onde k é o número de fatores. O valor de α depende de certas propriedades desejáveis para o planejamento e da possibilidade de realização de experimentos ao longo do domínio experimental. Quando $\alpha = 1$, os pontos axiais estarão localizados sobre as arestas do quadrado para um planejamento fatorial 2^2 e sobre as arestas de um cubo para um planejamento 2^3 (BREITKREITZ et. al., 2014). A Figura 07 traz a representação gráfica de um DCCR com dois e três fatores.

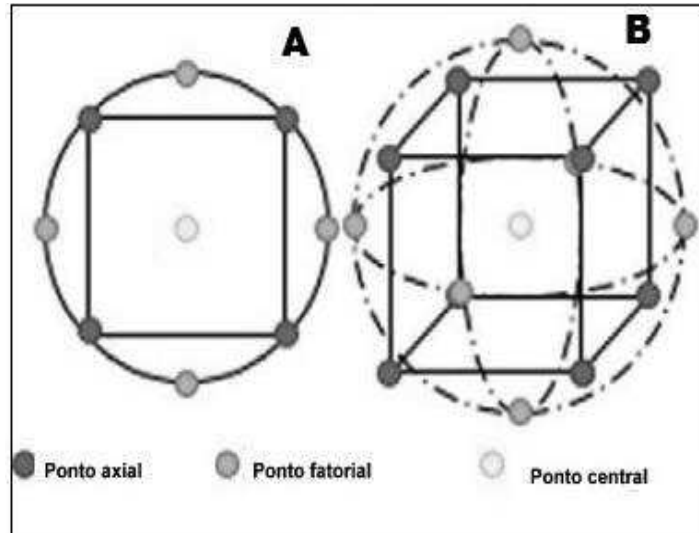


Figura 7. Visualização gráfica de um planejamento composto central para (A) $q = 2$ fatores; (B) $q=3$ fatores.

Fonte: WITEK-KROWIAK et al., 2014.

Atualmente, muitos estudos vêm utilizando o DCCR aplicável à MSR devido à algumas vantagens que essas ferramentas estatísticas apresentam. Seu uso é estimulado pela necessidade de novas formas de processos industriais, sendo o uso de modelos estatísticos, ferramentas fundamentais nesse sentido (BASS et al., 2007). Em relação à produção de amilases microbianas, a MSR e o DCCR vêm sendo amplamente utilizados como técnicas de otimização, considerando que a produção desta enzima é influenciada por diversos fatores como temperatura, pH, tempo de incubação, tipo de substrato, suplementação do meio com fontes indutoras e outros componentes do meio de cultivo (FRANCIS et al., 2003; TANYILDIZI et al., 2006; KAMMOUN et al., 2008; TAMILARASAN et al., 2012; SAXENA et al., 2014; STERGIOU et al., 2014; SINGH et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa de Horticultura e no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, PR.

4.2. Preparo da casca da batata-doce

A casca de batata-doce utilizada como substrato indutor da produção de amilases por *A. niger* no presente estudo foi obtida localmente. Esta foi lavada exaustivamente com água, seca em estufa a 60 °C por 24h (SAVIELLI et al., 1995), moída com o auxílio de um liquidificador e peneirada (35 mesh). Após este procedimento, as cascas foram armazenadas em locais livres de umidade.

4.2. Linhagem e condições de cultivo

A linhagem de *A. niger* empregada neste estudo pertence à coleção do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, sendo inicialmente isolada a partir de solo de Mata Atlântica proveniente da Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, São Paulo – Brasil por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004).

A. niger foi cultivado em meio sólido de Vogel (1956), contendo 1,5 % de glicose e 1,5% ágar, a uma temperatura de 28 °C, durante sete dias para produção de esporos. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas em câmara de Neubauer para $1,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹. Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, suplementados com diferentes concentrações de casca de batata-doce, bem como em diferentes valores de pH, de acordo com o delineamento experimental. Após o crescimento em meio líquido por períodos também estabelecidos no planejamento descrito posteriormente, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, os filtrados do meio de

cultivo livre de células foram obtidos, os quais foram utilizados como fonte de amilases extracelulares.

4.3. Determinação da atividade amilásica

A atividade amilásica foi determinada utilizando-se como substrato 750 µL de uma solução 1 % (m/v) de amido, em tampão McIlvaine pH 4,5, a 60 °C. O mesmo tampão e a enzima (filtrado bruto) foram adicionados, de modo a completar o volume de 1250 µL. Após 5 e 10 minutos de reação, alíquotas foram retiradas para a determinação dos açúcares redutores liberados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, de acordo com Miller (1959), utilizando-se a glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática sendo definida como correspondendo à liberação de 1µmol de açúcar redutor equivalente a glicose, por minuto por mL de amostra, nas condições de ensaio. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, utilizando-se brancos apropriados.

4.4. Otimização da produção de amilases por *A. niger* utilizando o DCCR e a MSR

Com o intuito de elevar os níveis de amilases produzidos por *A. niger*, as condições de cultivo foram testadas por meio do Delineamento Central Composto Rotacional e as respostas da atividade amilásica foram analisadas pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os experimentos foram realizados por fatorial 2³: concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH do meio de cultivo, com cinco níveis diferentes para cada variável, gerando 17 combinações de tratamentos com três amostras no ponto central e seis pontos axiais. A corrida 18 foi utilizada como validação interna nos modelos quadráticos gerados.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a seguinte equação polinomial de segunda ordem (Equação 3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

(Equação 3)

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação e x_1 , x_2 e x_3 , são as variáveis independentes, concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente.

4.5. Caracterização bioquímica das amilases produzidas por *A. niger*

4.5.1 Efeito da temperatura e do pH

A fim de determinar a temperatura ótima das amilases produzidas, a atividade enzimática foi avaliada em uma faixa de temperatura de 45 a 70 °C, em intervalos de 5 °C, em tampão McIlvane pH 4,5. O pH ótimo da atividade enzimática foi avaliado em tampão McIlvane na faixa de pH de 3,0 a 7,0, em intervalos de 0,5 unidades, em temperatura ótima previamente estabelecida.

4.5.2. Estabilidade frente a temperatura e ao pH

A estabilidade térmica foi determinada após incubação do extrato bruto a 60 °C, em diferentes intervalos de tempo. A atividade residual foi mensurada em pH e temperatura ótimos previamente estabelecidos. A fim de avaliar a estabilidade enzimática frente ao pH, o extrato bruto foi apropriadamente diluído (1:2 v/v) em tampão McIlvane pH 3,0 a 7,0 e incubado a 4 °C, por 24 horas. Posteriormente, a atividade residual também foi determinada em pH e temperatura ótimos.

4.6. Hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de *A. niger*

4.6.1. Preparo do material amiláceo

A partir da mesma cultivar de batata-doce utilizada na preparação do substrato da casca de batata-doce para produção das enzimas, a polpa passou por um processo de lavagem, a fim de eliminar resíduos, trituração e posteriormente secagem em estufa a 60 °C, por um

período de 24 horas (SAVIELLI et al., 1995). Em seguida, o material foi moído em moinho de facas elétrico e peneirado (20mesh).

4.6.2. Otimização do processo de hidrólise empregando-se o DCCR e a MSR

O processo de hidrólise enzimática do amido granular da batata-doce empregando-se o extrato bruto de *A. niger* foi avaliado, a fim de se elevar os níveis de glicose produzidos. Para tal, 300 mg da farinha de batata-doce foram incubados em 25 mL de tampão Mcllvaine (30.0 gL⁻¹) em diferentes valores de pH e em presença de diferentes concentrações enzimáticas, de acordo com o planejamento experimental. Previamente à adição do filtrado bruto de *A. niger*, as amostras foram submetidas a um pré-aquecimento, sendo incubadas a 50 °C, por 30 minutos, a fim de tornar os grânulos de amido mais suscetíveis ao acesso das enzimas. Após a adição das enzimas, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos no planejamento experimental, sendo posteriormente fervidas por um minuto para a desnaturação enzimática. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise de glicose, empregando-se o kit de determinação glicose oxidase.

A hidrólise foi realizada por DCCR, fatorial 2⁴: tempo, pH, temperatura e concentração da enzima foram utilizados como as variáveis independentes (fatores), resultando em 27 combinações de tratamentos, sendo três amostras no ponto central. A corrida número 28 foi utilizada como validação interna para os modelos quadráticos gerados.

Para o sistema com quatro fatores, o modelo é dado pela seguinte equação polinomial de segunda ordem (Equação 4):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4$$

(Equação 4)

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1 , β_2 , β_3 e β_4 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} , β_{33} e β_{44} são os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} e β_{34} são os coeficientes de interação e x_1 , x_2 , x_3 e x_4 , são as variáveis independentes de Tempo (T), pH, Temperatura (Temp) e concentração da enzima (E), respectivamente.

Os valores codificados dos planejamentos de otimização e hidrólise foram calculados de acordo com a equação de regressão (Equação 5):

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde x_i é o valor codificado, X_i é o valor real, X_0 é o valor real no ponto central e ΔX_i é o valor de mudança de passo.

O percentual de degradação do amido da batata-doce foi calculado como descrito por Pervez et al. (2014). As condições de cultivo e hidrólise foram realizados através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), a análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta foram gerados pelo programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da produção de amilases por *A. niger*

Ao analisar individualmente o efeito de fatores sobre a produção de amilases por *A. niger*, estudos prévios demonstraram que o tempo de cultivo, o pH de cultivo e a concentração do substrato exercem efeito significativo sobre este processo (dados não mostrados). Por esta razão, estes fatores foram considerados no DCCR, o qual foi conduzido com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a produção de amilases por *A. niger*, empregando-se a casca de batata-doce como substrato.

Os valores reais e codificados e os resultados obtidos no planejamento experimental estão representados na Tabela 4, onde os tratamentos 1 a 17 fazem parte do delineamento experimental e a corrida 18 refere-se à validação interna dos modelos.

Tabela 4. Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para a produção de amilases por *A. niger*.

Corrida	Substrato (%)	Valores reais (codificados)		
		pH	Tempo (dias)	Atividade amilásica (Uml ⁻¹)
1	1,1(-1)	4,2(-1)	4,4(-1)	52,18±3,27
2	2,9(1)	4,2(-1)	4,4(-1)	82,53±2,08
3	1,1(-1)	4,2(-1)	8,6(1)	112,29±4,05
4	2,9(1)	4,2(-1)	8,6(1)	140,47±6,43
5	1,1(-1)	7,8(1)	4,4(-1)	60,43±3,43
6	2,9(1)	7,8(1)	4,4(-1)	86,31±3,72
7	1,1(-1)	7,8(1)	8,6(1)	124,6±7,66
8	2,9(1)	7,8(1)	8,6(1)	152,62±6,90
9	0,5(-1,68)	6(0)	6,5(0)	94,83±2,99
10	3,5(1,68)	6(0)	6,5(0)	107,34±4,62
11	2(0)	6(0)	3(-1,68)	50,6±1,57
12	2(0)	6(0)	10(1,68)	157,24±13,42
13	2(0)	3(-1,68)	6,5(0)	151,19±4,76
14	2(0)	9(1,68)	6,5(0)	121,03±1,50
15	2(0)	6(0)	6,5(0)	217,17±4,71
16	2(0)	6(0)	6,5(0)	214,28±15,19
17	2(0)	6(0)	6,5(0)	201,98±7,56
18*	2(0)	6(0)	6,5(0)	222,95±9,64

*Validação interna em triplicata

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a atividade amilásica estão representados na Tabela 5. O modelo mostrou-se significativo ($p < 0,05$). Considerando-se o teste F , o modelo foi preditivo, pois o valor de F calculado foi maior do que o valor de F tabelado (52,27 vezes). O coeficiente de determinação R^2 de 0,9604 indica que 96,04% da variabilidade dos dados pode ser explicada por este modelo, valor considerado alto ao se considerar experimentos biológicos.

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para amilases produzidas por *A. niger* cultivado em casca de batata-doce e os valores de R^2 e F -valor.

Produção de amilases							
Termos	SQ	Gl	MQ	F	F_{tab}	F/F_{tab}	R^2
M	127,6818	9	14128,96	110,657	2,117	52,27	0,96046
R	5235,0	41	127,681				
T	132395,6	50					

Termos	Coeficientes	p -valor
Média/Intercepto	211,4729	0,000000
[S]	9,0463	0,000008
[S] ²	-40,0864	0,000000
pH	30,6113	0,000000
pH ²	-39,0831	0,000000
Tempo	-0,3072	0,862754
Tempo ²	-27,6779	0,000000
[S] x pH	1,2454	0,592151
[S] x Tempo	-1,8286	0,432217
pH x Tempo	0,3029	0,896157

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; F : F calculado; F_{tab} : F tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negrito são estatisticamente significativos.

Na Tabela 5, os coeficientes de regressão também podem ser observados, onde o p -valor indica a significância dos coeficientes. A mesma pode também ser verificada no diagrama de Pareto, representado na Figura 8. Aqui, os resultados são interpretados com base nas estimativas de como cada fator experimental afeta a resposta. A análise estatística fornece estimativas desses efeitos. O efeito de cada fator é a diferença no valor da resposta associado com a passagem do nível inferior para o superior. Quando um fator é significativo, este causa um grande efeito, assim o processo apresentará resultados significativamente melhores para

um dos níveis avaliados. Quando um fator não é importante para o processo, grandes alterações não são verificadas, sendo este então associado a um pequeno efeito (HAALAND et al., 1989). Assim, quanto menor o p -valor, maior a significância do coeficiente de variação correspondente. Segundo Faller et al. (2003), este tipo de análise é importante para compreender como o processo biológico em questão funciona ao nível de sistema, e como um fator individual interage de modo dinâmico com outro.

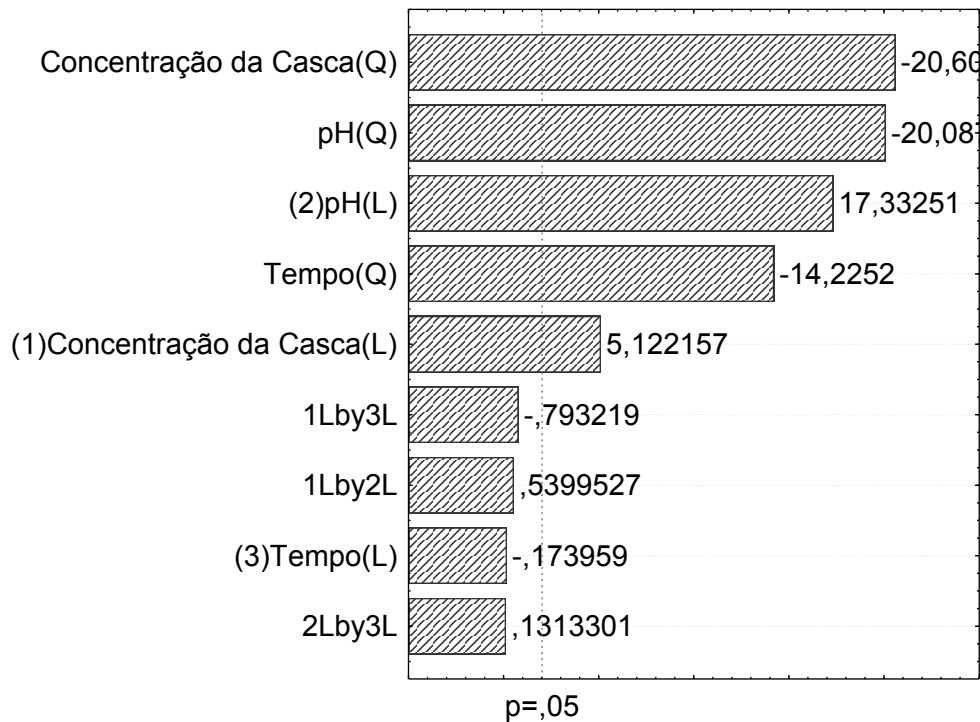


Figura 8. Diagrama de Pareto demonstrando as variáveis significativas na produção de amilases por *A. niger*.

Em relação à produção de amilases pelo fungo *A. niger*, todos os termos quadráticos, bem como os termos lineares das variáveis independentes concentração do substrato e pH foram significativos, enquanto que apenas o termo quadrático da variável tempo foi significativo. Neste caso, os termos significativos agem como fatores limitantes para produção de amilases por *A. niger*. Nota-se que nenhuma das interações entre os termos avaliados foi significativa. Desta forma, o efeito das variáveis tempo de cultivo, concentração do substrato e pH não depende do nível das outras variáveis estudadas. Observa-se, ainda, que a concentração do substrato, bem como o pH de cultivo são os fatores que mais influenciam esse processo.

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear múltipla e o modelo

matemático que representa a atividade amilásica foi expresso pela equação abaixo (Equação 6), levando-se em consideração somente os termos significativos:

$$\begin{aligned} & \textit{Atividade amilásica} \\ & = 211,47 + 9,04 S - 40,08 S^2 + 30,61 pH - 39,08 pH^2 - 27,67 T^2 \end{aligned} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde pH é o pH do meio de cultivo, S é concentração da casca de batata-doce e T é o tempo de cultivo.

Os modelos codificados permitiram a simulação de dados da produção de amilases por *A. niger* (Figura 9). As diferentes condições experimentais para a produção de amilases estão apresentadas na Tabela 4. As condições de cultivo que favoreceram a maior produção de amilases foram as estabelecidas no ponto central (corridas 15, 16 e 17, Tabela 4), correspondendo a 2% de concentração do substrato, pH de cultivo 6,0 e tempo de incubação de 6,5 dias. Condições similares foram estabelecidas para *Penicillium purpurogenum*, o qual atingiu a máxima produção de amilases (68,2 U mg⁻¹) em pH 6,0, por 6 dias, a 30 °C (SILVA et al., 2011). Nos estudos de Tamilarasan et al. (2012), uma linhagem de *A. oryzae* atingiu a máxima produção de amilases (0,893 U mL⁻¹) quando crescido em 2,01% de batata-doce, em pH 7,2.

Verifica-se que condições intermediárias de substrato favoreceram a produção de amilases por *A. niger*. De acordo com Amin et al. (2011), à medida que a concentração de substrato aumenta, a produção enzimática aumenta proporcionalmente, até o ponto em que o meio esteja saturado com o substrato. Quando este ponto de saturação é alcançado, a adição extra de substrato deixa de influenciar os níveis de enzimas produzidos.

Como citado anteriormente, o pH de cultivo também foi um dos fatores que mais influenciaram a produção de amilases por *A. niger*. Da mesma forma, outros estudos reportam que alterações no pH de cultivo influenciam significativamente a produção de amilases fúngicas (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2012). Segundo Prakasham et al. (2006), o pH do meio de cultura influencia o transporte de componentes através da membrana celular, bem como os processos enzimáticos, os quais, por sua vez, afetam o crescimento celular e a formação de produtos. Embora *A. niger* possa crescer de forma estável sobre uma ampla faixa de pH (2,0-8,0) (HESSE et al., 2002), maiores níveis de amilases têm sido obtidos quando o pH dos meios de cultura tem sido ajustado entre os valores 5,0 a 7,0 (DAR et al., 2014), o que

corroborar com os resultados obtidos no presente estudo.

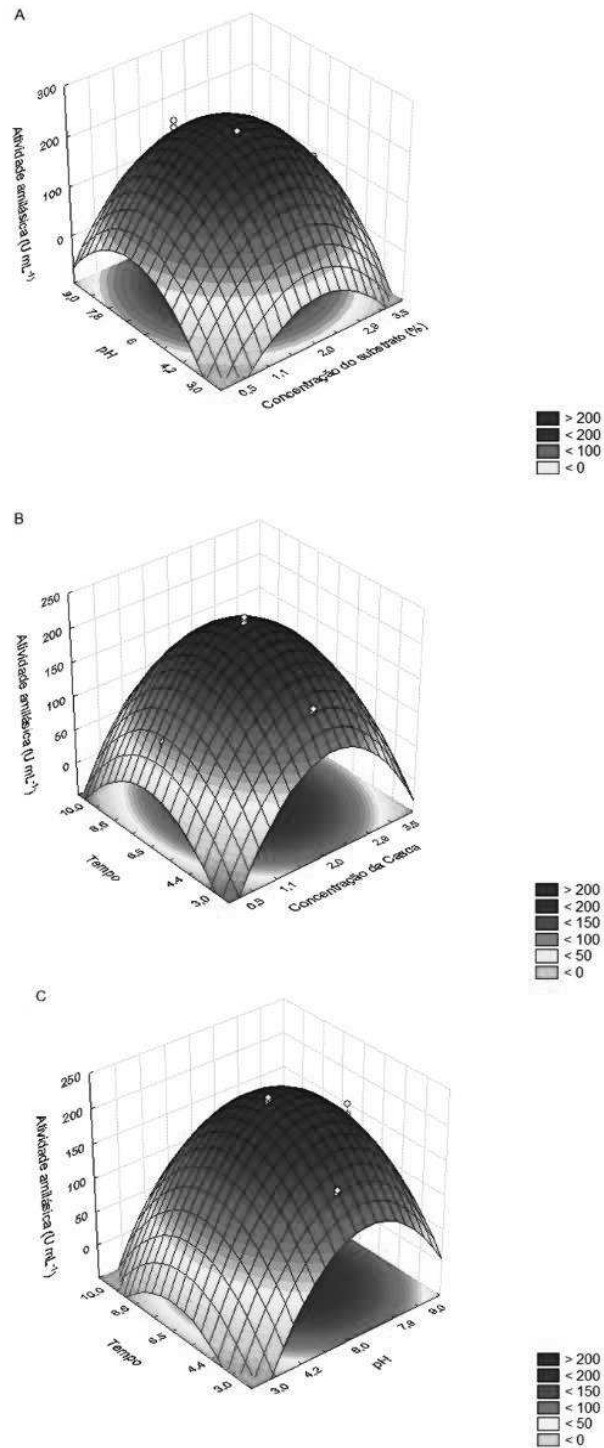


Figura 9. Superfície de resposta para a produção de amilases por *A. niger* cultivado em casca de batata-doce. (A) interação entre pH de cultivo x concentração do substrato;(B) interação entre tempo de cultivo x concentração do substrato e (C) interação tempo de cultivo x pH de cultivo.

Até o presente momento, a produção de amilases por micro-organismos utilizando a casca de batata-doce como substrato não foi reportada na literatura. No entanto, as amilases microbianas têm sido produzidas empregando-se outros resíduos, tais como farelo de trigo (CELESTINO et al., 2014; SINGH et al., 2012a), resíduos de cervejaria (ADENIRAN e ABIOSE, 2009), torta de mostarda (SAXENA e SINGH, 2014) e farelo de arroz (SHRUTI et al., 2013). Recentemente, Ubalua (2014) demonstrou o potencial de utilização da batata-doce como substrato para a produção de glucoamilases por uma linhagem de *A. niger*.

De acordo com BETIKU et al. (2013), a casca de batata-doce normalmente é tratada como um resíduo, sendo responsável por problemas ambientais decorrentes de sua deposição no ambiente. Deve-se considerar o fato de que, com a possível geração de etanol a partir da batata-doce, maiores níveis deste resíduo poderão ser futuramente gerados. Por estas razões, a utilização da casca de batata-doce como substrato para a produção de amilases microbianas apresenta-se como uma alternativa bastante interessante, tanto do ponto de vista econômico, quanto do ponto de vista ambiental.

Tradicionalmente, a produção e a otimização da produção de enzimas fúngicas é realizada pelo monitoramento dos fatores que influenciam essa produção individualmente (SHARMA; KANWAR, 2014). Enquanto se avalia um fator separadamente, o outro se mantém constante e não há a averiguação da interação desses para a resposta esperada, o que torna essa maneira de experimentação desvantajosa. Outro ponto desfavorável é o número de experimentos necessários para a realização da pesquisa, o que eleva os custos da pesquisa e também o tempo necessário para sua concretização (BEZERRA et al., 2008).

A fim de resolver esse problema, diversos modelos matemáticos têm sido propostos, envolvendo uma análise de fatores multivariados. Dentre estes, uma das técnicas mais utilizadas nos últimos anos de pesquisas na produção de enzimas é a MSR (AMIN et al., 2011). No presente estudo, o DCCR e a MSR mostraram-se metodologias adequadas para a otimização do processo de produção de amilases por *A. niger*. Após a otimização, os níveis de amilases obtidos (214,28 U mL⁻¹) foram 4,62 vezes superiores aos níveis de amilases inicialmente produzidos (46,38 U mL⁻¹, dados não mostrados), sendo esta produção mais elevada, quando comparada a outros estudos relacionados à produção de amilases fúngicas. Ao cultivar *A. niger* em resíduo de cervejaria suplementado com amido, Hernández (2006) obteve uma produção correspondente a 70,29 U mL⁻¹. Carvalho et. al. (2008) verificaram uma

produção máxima de 37 U mL⁻¹ ao cultivar *Bacillus* sp. em meio líquido contendo amido (5 g L⁻¹) como fonte de carbono, suplementado com proteínas do soro de leite (0,5 g L⁻¹) e peptona (2 g L⁻¹), por 32 horas. O processo de otimização de amilases por *A. oryzae* empregando-se a MSR e a batata-doce como substrato resultou em apenas 0,893 U mL⁻¹ (UBALUA, 2014).

De acordo com Saxena e Singh (2011), devido à elevada demanda industrial das amilases, a produção dessas enzimas a baixo custo é requerida. Nesse sentido, o emprego da casca de batata-doce para a produção de amilases por *A. niger* é bastante promissor, uma vez que além de agregar valor a este resíduo, poderá proporcionar uma diminuição nos custos de produção destas enzimas.

5.1.1. Validação do modelo

A validação interna dos modelos para a otimização da produção de amilases foi realizada na condição ótima previamente estabelecida: concentração do substrato 2,0%, tempo de cultivo 6,5 dias e pH de cultivo 6,0 (corrida 18 da Tabela 1). Na validação do modelo, os valores de atividade obtidos experimentalmente (222,65 U mL⁻¹) foram similares aos valores preditos pelo modelo (211,14 U mL⁻¹), correspondendo a uma recuperação de 105,45%. O alto valor de recuperação alcançado mostra a adequação ao modelo gerado, validando-o de forma satisfatória.

5.2. Caracterização bioquímica das amilases produzidas por *A. niger*

5.2.1 Efeito do pH e da temperatura

As amilases produzidas por *A. niger* apresentaram maior atividade a 60 °C (Figura 10 A). O mesmo foi observado para as amilases produzidas por *A. gracillis* (ALI et al., 2014) e por *A. fumigatus* (NWAGU e OKOLO, 2011). Contrariamente, Chimata et al. (2011) estabeleceram 75 °C como a temperatura ótima para as amilases de *A. niger*, enquanto que as amilases do fungo halofílico *Aspergillus penicilioides* apresentaram algumas características extremofílicas, como maior atividade a 85 °C (ALI et al., 2015).

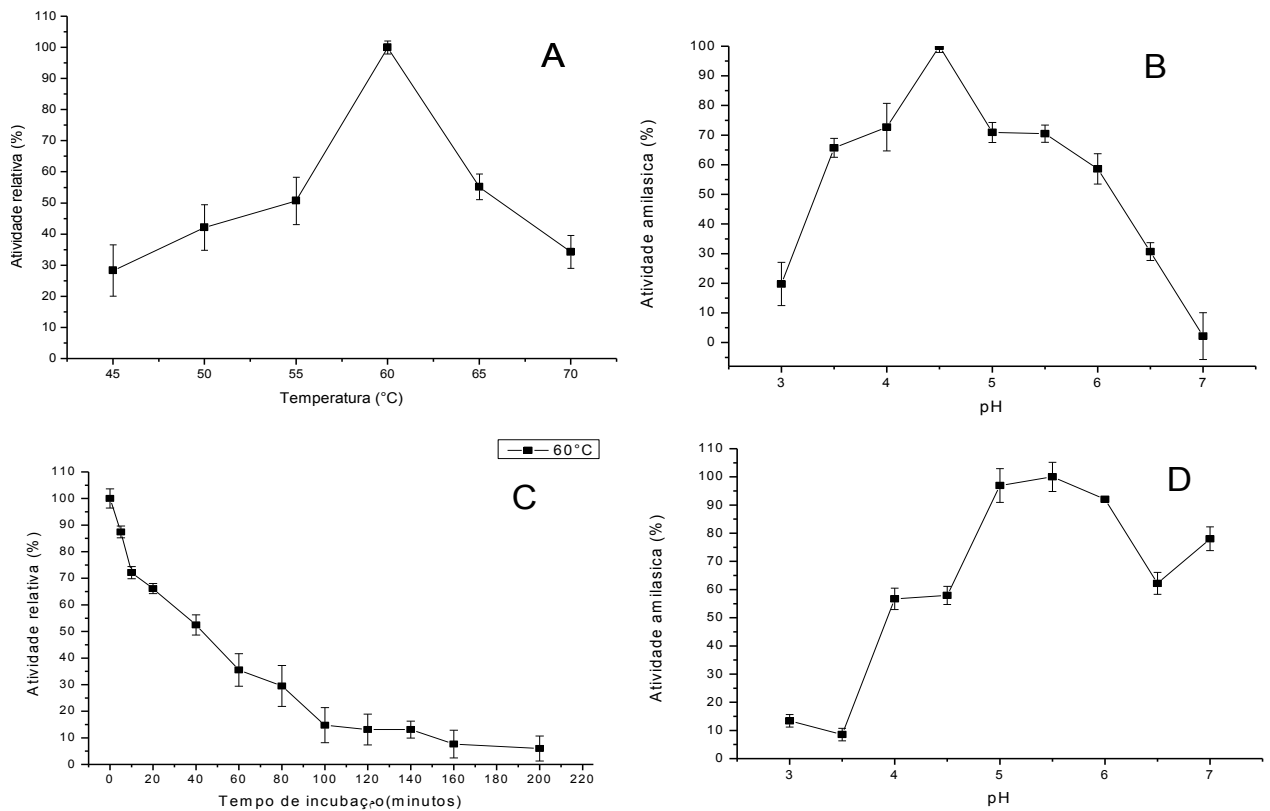


Figura 10. Influência da temperatura e do pH sobre a atividade das amilases produzidas por *A. niger*. Temperatura (A) e pH (B) ótimos; estabilidade térmica (C) e estabilidade frente ao pH (D).

Uma vez que o processo de hidrólise do amido granular deve ser conduzido em temperaturas de sub-gelatinização, o emprego das amilases de *A. niger* no processo de hidrólise do amido granular da batata-doce pode ser viabilizado, visto que a literatura reporta 74,2 °C como a temperatura de gelatinização do amido proveniente desta amilácea (SHARIFFA et al., 2009).

Em relação ao pH, as amilases de *A. niger* apresentaram atividade ótima em pH 4,5 (Figura 10B). Este valor também foi encontrado para as amilases produzidas por *Rhizopus oryzae* (FERREIRA et al., 2015). Ao caracterizarem bioquimicamente as amilases provenientes de *A. gracilis*, Ali et al. (2014) obtiveram os maiores valores de atividade amilolítica em pH 5,0, enquanto que Nwagu e Okolo (2011) e Chimata et al. (2011) estabeleceram os valores de pH 6,0 e 6,5 como ótimo para a atuação das amilases de *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente. Por outro lado, as amilases halofílicas apresentam

atividade ótima em valores de pH mais alcalinos (CASTRO et al., 2010), como as enzimas provenientes de *A. penicilioides*, mais ativas em pH 9,0 (ALI et al., 2015).

5.2.2. Estabilidade térmica e em diferentes valores de pH

A tolerância ao calor é uma característica essencial para a utilização de enzimas em processos industriais, como as amilases, uma vez que os processos enzimáticos de liquefação e sacarificação do amido são conduzidos em temperaturas elevadas (100-110 °C) (SOUZA e MAGALHÃES, 2010). No intuito de verificar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, o extrato bruto foi incubado a uma temperatura de 60 °C, estabelecida previamente como ótima para a atuação das amilases de *A. niger*. Estas enzimas, por sua vez, mostraram-se relativamente estáveis nessa temperatura, apresentando meia vida ($T_{1/2}$) de 40 minutos (Figura 10C). Similarmente, as amilases de *Syncephalastrum racemosum* foram estáveis a 60 °C, retendo aproximadamente 77,8% de sua atividade após 1 hora de incubação (FREITAS et al., 2014). Nos estudos de Slivinski et al. (2011), as amilases presentes no extrato bruto de *A. niger* também foram estáveis a 60 °C, apresentando 60,33% de sua atividade residual após um período de 24 horas. Já as amilases de *Penicillium janthinellum* foram termicamente estáveis a 70 °C, onde 75% de sua atividade inicial foi verificada após incubação nesta temperatura, por 1 hora (SINDHU et al., 2011).

Com relação a estabilidade frente a diferentes valores de pH, as amilases de *A. niger* apresentaram elevada estabilidade nos valores de pH entre 5,0 e 6,0, onde mais de 90% de sua atividade inicial foi verificada (Figura 10D). Ainda, estas enzimas foram relativamente estáveis em valores de pH 4,0-4,5 e 6,5-7,0. Entretanto, uma baixa estabilidade foi constatada nos valores de pH 3,0 e 3,5. Similarmente, a α -amilase produzida pelo fungo *A. oryzae* apresentou-se estável na faixa de pH entre 4,5 e 7,2 (DEY e BANERJEE, 2015). As amilases de *P. janthinellum* apresentaram estabilidade ao longo do intervalo de pH 4,0-8,0, com atividade máxima em pH 5,0 (SINDHU, et. al., 2011). Em contrapartida, a α -amilase do fungo *S. racemosum* apresentou elevada estabilidade ao pH, retendo em torno de 90% de sua atividade inicial nas faixas de pH entre 3,0 e 9,0. No respectivo estudo, 100% da atividade amilolítica inicial foi constatada na faixa de pH entre 4,5 e 7,0 (FREITAS, et. al., 2014).

5.3. Hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de *A. niger*

5.3.1. Otimização do processo de hidrólise empregando-se o DCCR e a MSR

O DCCR foi empregado para avaliar os principais efeitos e interações do tempo, pH, temperatura e concentração de amilases na liberação de glicose a partir do amido granular da batata-doce. Os modelos experimentais e resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6, sendo as corridas 1 a 27 pertencentes ao planejamento experimental, enquanto que a corrida 28 refere-se à validação interna do modelo.

Tabela 6. Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para a hidrólise enzimática do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de *A. niger*, com a liberação de glicose.

Corrida	Valores reais (codificados)			Resposta	
	Tempo (horas)	pH	Temperatura (°C)	Enzima (U g ⁻¹)	Glicose (g L ⁻¹)
1	15 (-1)	4,0 (-1)	50 (-1)	13,75 (-1)	7,30
2	15 (-1)	4,0 (-1)	60 (1)	13,75 (-1)	3,62
3	15 (-1)	4,0 (-1)	50 (-1)	31,25 (1)	15,86
4	15 (-1)	4,0 (-1)	60 (1)	31,25(1)	6,76
5	15 (-1)	6,0 (1)	50 (-1)	13,75 (-1)	0,33
6	15 (-1)	6,0 (1)	60 (1)	13,75 (-1)	1,86
7	15 (-1)	6,0 (1)	50 (-1)	31,25 (1)	0,00
8	15 (-1)	6,0 (1)	60 (1)	31,25(1)	1,87
9	37 (1)	4,0 (-1)	50 (-1)	13,75 (-1)	14,69
10	37 (1)	4,0 (-1)	60 (1)	13,75 (-1)	3,02
11	37 (1)	4,0 (-1)	50 (-1)	31,25 (1)	23,50
12	37 (1)	4,0 (-1)	60 (1)	31,25(1)	5,77
13	37 (1)	6,0 (1)	50 (-1)	13,75 (-1)	0,00
14	37 (1)	6,0 (1)	60 (1)	13,75 (-1)	1,32
15	37 (1)	6,0 (1)	50 (-1)	31,25 (1)	0,00
16	37 (1)	6,0 (1)	60 (1)	31,25(1)	1,94
17	4 (-2)	5,0 (0)	55 (0)	22,50 (0)	2,92
18	48 (2)	5,0 (0)	55 (0)	22,50 (0)	11,28
19	26 (0)	3,0 (-2)	55 (0)	22,50 (0)	1,84
20	26 (0)	7,0 (2)	55 (0)	22,50 (0)	0,00
21	26 (0)	5,0 (0)	55 (0)	5,00 (-2)	6,03
22	26 (0)	5,0 (0)	55 (0)	40,00 (2)	17,32
23	26 (0)	5,0 (0)	45 (-2)	22,50 (0)	10,01
24	26 (0)	5,0 (0)	65 (2)	22,50 (0)	2,84
25	26 (0)	5,0 (0)	55 (0)	22,50 (0)	17,59
26	26 (0)	5,0 (0)	55 (0)	22,50 (0)	17,64
27	26 (0)	5,0 (0)	55 (0)	22,50 (0)	17,31
28*	37	4,0	50	31,25	22,43

* Valores referentes à validação do modelo.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos gerados está resumida na Tabela 7. A significância estatística das variáveis foi calculada com o teste F (Fischer), comparando-se o F calculado com o F tabelado, sendo o primeiro a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir do amido granular da casca de batata-doce hidrolisado pelo extrato bruto de *A. niger*, e os valores de R^2 e F -valor.

Glicose						
Fontes de variação	SQ	MQ	gl	F	F_{tab}	F/F_{tab}
M	3521,50	251,53	14	37,35	1,84	20,29
R	439,71	6,66	66	-	-	-
T	3961,21					
R^2	0,888					
Termos	Coefficientes		p-valor			
Média/Interc.	17,517		0,000			
T	1,223		0,000			
T^2	-2,776		0,000			
pH	-3,202		0,000			
pH^2	-4,322		0,000			
Temp	-1,922		0,000			
$Temp^2$	-1,633		0,000			
E	-2,076		0,000			
E^2	-2,945		0,000			
T x pH	-0,889		0,019			
T x Temp	0,049		0,894			
T x E	-1,046		0,006			
pH x Temp	-1,435		0,000			
pH x E	3,052		0,000			
Temp x E	-0,657		0,082			

Constatou-se que o modelo foi preditivo, uma vez que o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado (20,29 vezes), a um nível de confiança de 95%. Logo, os resultados obtidos estão fora da área de aceitação da hipótese nula. Sendo assim, pode-se assegurar que o referido modelo é significativo, podendo ser empregado para fins preditivos. Ainda, o coeficiente de determinação R^2 de 0,8889 obtido indica que 88,89% da variabilidade dos dados podem ser explicadas por este modelo, valores considerados altos ao se considerar experimentos biológicos.

Os dados obtidos de conversão de glicose foram analisados por regressão linear

múltipla e as respostas foram previstas de acordo com a equação abaixo (Equação 7), levando-se em consideração apenas os termos significativos:

$$\begin{aligned}
 Gli = & 17,517 + 1,224T - 2,777T^2 - 3,202pH - 4,322pH^2 + 1,922 Temp - 1,633Temp^2 \\
 & - 2,076E - 2,945E^2 - 0,889TpH - 1,046TE - 1,435pHTemp + 3,052pHE
 \end{aligned}$$

(Equação 7)

Onde *Gli* é glicose, *T* é tempo, *Temp* é temperatura, *pH* é potencial hidrogeniônico e *E* é a concentração da enzima.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 7. Por meio da análise do *p*-valor, observa-se que todos os termos lineares e quadráticos das variáveis independentes, a saber, tempo, temperatura, pH e concentração da enzima foram significativos. Em relação às interações entre os termos, apenas as interações entre o tempo e a temperatura, bem como temperatura e concentração enzimática não foram significativas. O diagrama de Pareto apresentado na Figura 11 mostra a importância estatística de cada termo, indicando que o termo pH é o que mais influencia este processo, enquanto que as interações entre os termos pH e temperatura, tempo e concentração enzimática, bem como tempo e pH são as que exercem os menores efeitos, embora significativos.

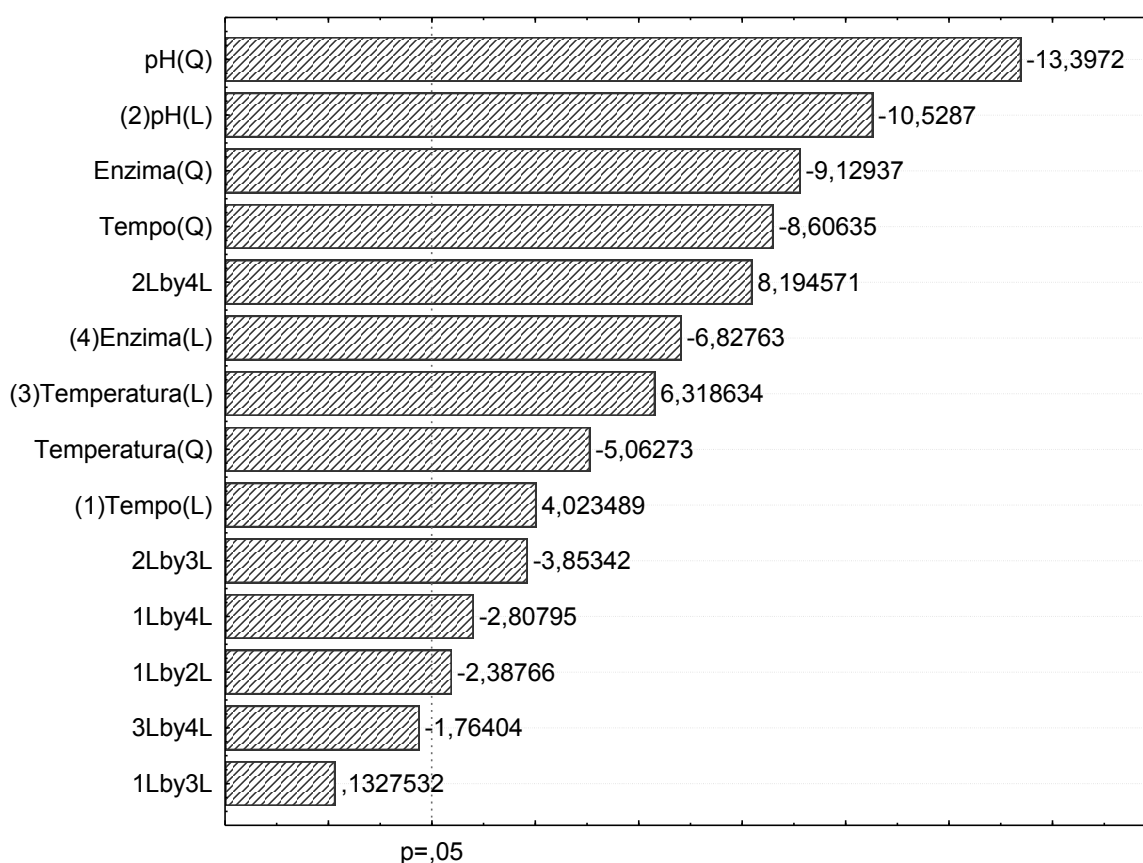


Figura 11. Diagrama de Pareto demonstrando as variáveis significativas no processo de hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de *A. niger*.

Os gráficos de superfície de resposta estão apresentados na Figura 12 e mostram os efeitos dos fatores tempo, pH, temperatura e concentração da enzima sobre o processo de hidrólise enzimática da casca de batata-doce, bem como determinam os pontos ótimos de cada variável para a resposta máxima. As condições de hidrólise enzimática onde houve maior taxa de conversão do amido granular em glicose foram 37 horas de incubação, pH 4,0, temperatura de 50 °C e concentração da enzima de 31,25 U g⁻¹ (corrida 11, Tabela 6). Nestas condições, a quantidade de glicose obtida correspondeu a 23,50 g L⁻¹. Desta forma, um alto grau de conversão do amido de batata-doce em glicose foi obtido por meio da utilização do extrato bruto de *A. niger*, correspondendo a 78,33 %.

Os resultados do estudo do efeito do pH sobre o processo de hidrólise enzimática revelam que o valor de pH 4.0 resultou em uma maior liberação de glicose a partir do amido granular de batata-doce, pressupondo uma maior atividade das enzimas em condições mais

ácidas. De acordo com Whitaker (1994), uma mudança do pH em uma reação enzimática pode afetar a estabilidade da enzima, causando uma desnaturação irreversível em sua estrutura conformacional, resultando em perda contínua de sua atividade.

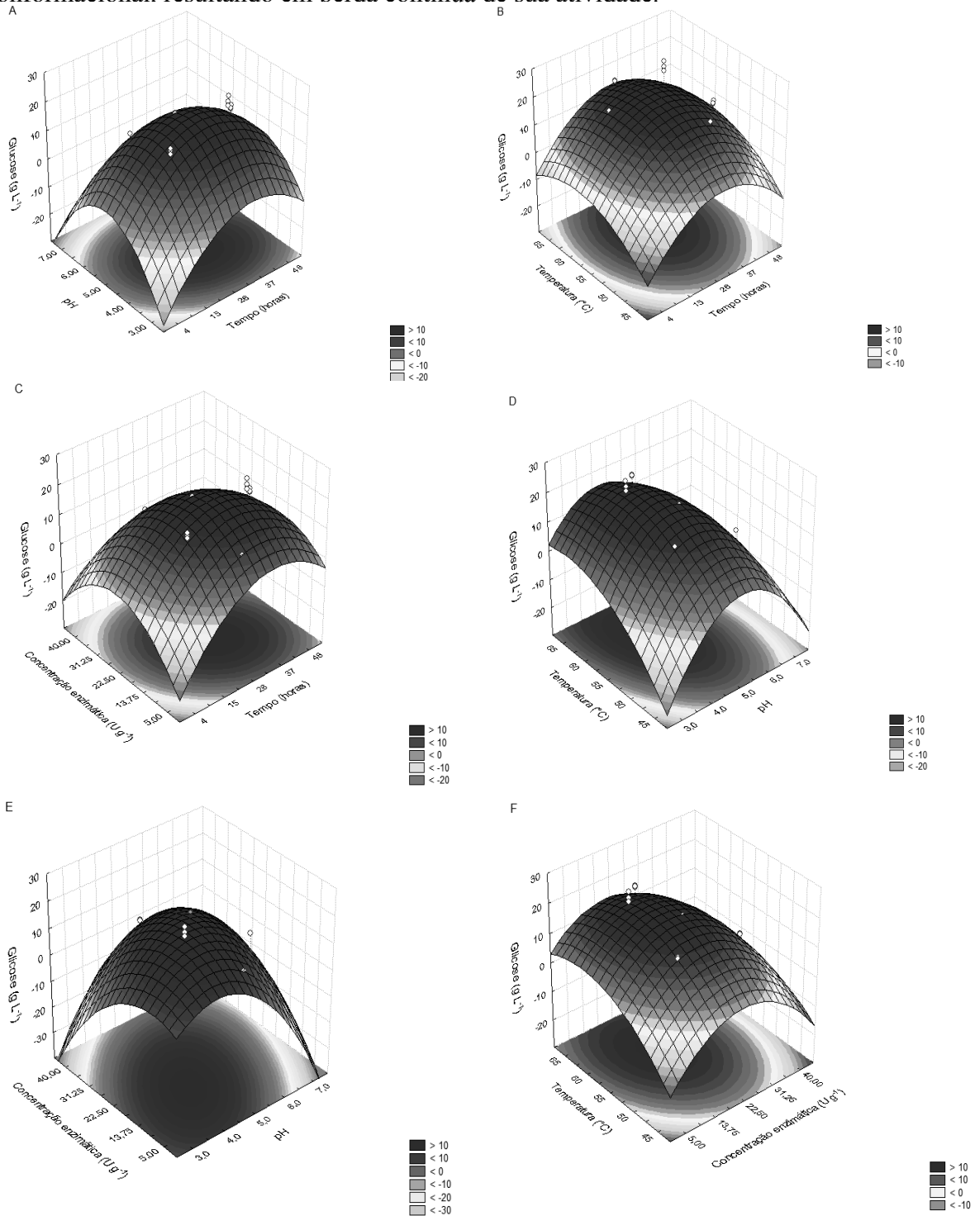


Figura 12. Superfície de resposta para a hidrólise do amido granular da batata-doce pelo extrato bruto de *A. niger*. (A) interação pH x tempo; (B) interação temperatura x

tempo; (C) interação concentração enzimática x tempo; (D) interação temperatura x pH; (E) interação concentração enzimática x pH; (F) interação temperatura x concentração enzimática. As condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela 6.

A dosagem enzimática tem sido reportada como um dos fatores mais importantes que afetam os processos de hidrólise. Normalmente, um aumento na dosagem enzimática resulta em melhorias nesse processo, supostamente por aumentar a velocidade de conversão do substrato em produto (CHEN et al., 2007; KARKI et al., 2011). No entanto, altas concentrações enzimáticas geralmente não influenciam os níveis de glicose obtidos. Esse fato corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho e pode ser explicado pela inibição da atividade enzimática pelo acúmulo dos produtos de hidrólise ou pela saturação dos grânulos de amido pelas enzimas ativas (SAINI et al., 2013). Neste último caso, algum tipo de inibição enzima-enzima pode reduzir a capacidade dos sítios ativos de se ligarem eficazmente às partículas de amido (APAR e OZEBEC, 2004). Uma vez que as enzimas fortemente influenciam o custo do processo, a concentração de enzimas a ser empregada deve ser minimizada, o quanto for possível.

O tempo de reação também influenciou significativamente os níveis de glicose obtidos. Recentemente, Shanavas et al. (2011) analisaram o efeito do tempo de reação sobre a sacarificação do amido de mandioca e verificaram os maiores índices de sacarificação após 30 minutos de incubação, seguido por uma discreta elevação, ao utilizar amilases comercialmente disponíveis. Aggarwal et al. (2001) obtiveram as maiores porcentagens de sacarificação do milho, empregando o filtrado bruto de *Aspergillus* sp. NA21 e amilases comerciais, após 24 horas de incubação.

De acordo com Cereda et al. (2004), ao se empregar enzimas comerciais, quatro horas de reação são suficientes para a completa sacarificação do amido. Para Pervez et al. (2014), a eficiência dos processos de liquefação e sacarificação enzimáticos também é dependente do grau de purificação das enzimas empregadas, visto que enzimas brutas demandam mais tempo para completar a hidrólise das moléculas do amido em glicose, quando comparadas às enzimas purificadas. Estes últimos autores observaram que a medida que o tempo reacional aumenta, a formação de glicose, bem como o percentual de sacarificação elevam-se até 90 minutos. Para além deste período, ambos os parâmetros permanecem constantes. Uma tendência similar também foi constatada no presente estudo, podendo ser justificada pelo

acúmulo de glicose no meio após longos períodos de incubação, os quais promovem uma inibição enzimática, bem como pela desnaturação das enzimas envolvidas no processo. Segundo Sun et al. (2010), esta inibição pode ser evitada mediante o fornecimento de uma dosagem extra de enzimas durante a reação, ou pela remoção do produto final por ultrafiltração ou por fermentação simultânea em um mesmo reator. Ainda, as enzimas podem ser recuperadas e recicladas, embora a qualidade das enzimas decresça gradualmente.

Em relação ao efeito da temperatura, observa-se que as amilases de *A. niger* apresentaram uma maior taxa de conversão do amido da batata-doce em glicose quando temperaturas mais baixas foram empregadas. A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática pode ser entendida em duas fases distintas: no princípio, aumentos na temperatura levam a aumentos na velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. No entanto, temperaturas elevadas promovem a desnaturação da enzima, com perda da sua atividade, ocorrendo a estabilização da reação enzimática (KUROZAWA et al., 2009). Apesar de não apresentarem um ótimo desempenho sobre temperaturas elevadas, o uso das amilases de *A. niger* nos processos de hidrólise de materiais amiláceos seria bastante interessante, visto que o emprego de menores temperaturas pode tornar o processo menos dispendioso.

Analisando-se o efeito da relação entre o pH e a temperatura sobre os níveis de glicose produzidos, observa-se que uma diminuição das respostas ocorre com o aumento do pH. Neste caso, infere-se que valores de pH mais ácidos promovem uma alteração no estado iônico dos resíduos de aminoácidos da enzima, resultando em uma conformação tridimensional mais eficaz em promover a hidrólise do amido, mas que, em contrapartida, seja capaz de atuar em temperaturas inferiores, em torno de 50 °C. Esse mesmo fato pode justificar o efeito da interação entre o pH e o tempo de reação. Neste caso, as amilases podem ter assumido em valores de pH mais ácidos uma conformação tridimensional mais estável ao longo do tempo.

Ao avaliar o efeito da relação entre tempo e concentração enzimática, verifica-se que a obtenção de maiores níveis de glicose ao longo do tempo é favorecida quando são utilizadas concentrações de enzimas mais elevadas. Sabe-se que as preparações enzimáticas geralmente perdem sua atividade ao longo do tempo, à medida que as moléculas proteicas que a constituem vão sofrendo alterações que gradualmente diminuem o teor de enzima ativo. Desta forma, se o aporte de enzimas for maior, pressupõe-se que a catálise enzimática seja mantida

por um período mais prolongado, culminando na obtenção de rendimentos superiores. De forma semelhante, ao avaliar a hidrólise da casca da batata-doce por amilases comerciais, Betiku et al. (2013) observaram que a medida que o tempo de reação e a dosagem enzimática aumentam, a concentração de glicose se eleva, sugerindo uma relação linear entre essas duas variáveis.

Os valores de glicose e de sua conversão verificados no presente estudo (78,33%) evidenciam o excelente potencial de hidrólise do amido granular da batata-doce por meio da utilização do extrato bruto de *A. niger*. Na literatura, muitos trabalhos avaliaram previamente a hidrólise ácida da batata-doce para a produção de açúcares fermentescíveis (AZHAR e HAMDY, 1981; KIM e HAMDY, 1985; GENKINA et al., 2009, HUNG et al., 2014). Nos últimos anos, diversos estudos relacionados à sacarificação da batata-doce empregando-se enzimas comerciais, ou mesmo filtrados brutos microbianos, têm sido conduzidos (SAWAI et al., 2004; SHARIFFA et al., 2009; OMEMU et al., 2008; LAREO et al., 2013; YUSSOF et al., 2013).

Similarmente ao presente estudo, Omemu et al. (2008) avaliaram a hidrólise da batata-doce, empregando-se o extrato bruto de *A. niger* obtido por meio de fermentação em estado sólido do farelo de arroz e farelo de soja. Os respectivos autores obtiveram uma eficiência de conversão de 62,1%. O efeito de tratamentos térmicos abaixo da temperatura de gelatinização sobre o amido granular da batata-doce foi investigado por Shariffa et al. (2009). Em seus estudos, o amido foi hidrolisado por amilases e glucoamilases comerciais, a 60 °C, por 30 minutos, obtendo-se uma eficiência de conversão de 27-34%.

Já as glucoamilases produzidas por *Aureobasidium pullulans* foram eficientes em hidrolisar os grânulos de amido de batata, mas foram ineficazes em degradar o amido da batata-doce, resultando em índices de conversão em glicose de apenas 22% (LI et al., 2007). Baixos níveis de conversão (27,3%) também foram verificados quando o amido de batata-doce foi tratado pelo preparado enzimático Stargen 01, uma mistura de α -amilases e glucoamilases, a 35 °C, por 24 horas. Melhores índices de conversão do amido em glicose por meio da utilização destas enzimas foram obtidos para o amido do milho e da tapioca, correspondendo a 52,5 e 35,7%, respectivamente (YUSSOF et al., 2013). Já os índices de conversão da casca de batata-doce em glicose obtidos por Betiku et al. (2013) ao empregarem amilases comerciais corresponderam a 70,4%. No entanto, os melhores índices de conversão da batata-doce em açúcares fermentescíveis foram obtidos por Lareo et al. (2013),

empregando-se os processos de liquefação e sacarificação do amido gelatinizado, por meio de amilases comerciais, os quais foram próximos a 100%.

A hidrólise de outros materiais amiláceos também tem sido amplamente investigada. Rattanachomsri et al. (2009) avaliaram o efeito de um preparado enzimático de *A. niger* produzido por fermentação submersa sobre a hidrólise do amido granular da polpa de mandioca, obtendo uma eficiência de hidrólise de 91,7%. Castro et al. (2010) também avaliaram a aplicação de um extrato enzimático de *A. awamori* obtido por fermentação em estado sólido na hidrólise da torta de babaçu, reportando uma eficiência de hidrólise de 52%. Já os valores de glicose alcançados por Pervez et al. (2014), ao avaliarem a hidrólise do amido de mandioca por amilases de *A. awamori*, corresponderam a 40 g L⁻¹ (60% de eficiência).

Atualmente, os processos de produção de etanol a partir de fontes amiláceas requerem a hidrólise destes materiais, geralmente por meio de um processo enzimático conduzido a elevadas temperaturas (UTHUMPORN et al., 2010). Entretanto, os altos custos associados à obtenção destas enzimas e a elevada demanda energética devido às altas temperaturas geralmente adotadas para a gelatinização e hidrólise do amido inviabilizam economicamente o processo (SHARIFFA et al., 2009). No presente estudo, elevados níveis de glicose foram obtidos por meio da hidrólise do amido granular da batata-doce, empregando-se as amilases de *A. niger* obtidas a partir de um resíduo agroindustrial e por meio de um processo conduzido em temperaturas de sub-gelatinização do amido. Desta forma, o presente processo de hidrólise enzimática fornece avanços significativos que podem vir a reduzir os custos implicados nas tecnologias enzimáticas, a fim de tornar o álcool a partir da batata-doce economicamente competitivo.

5.3.2. Validação do modelo

A validação interna do modelo relativo à otimização do processo de hidrólise do amido granular da batata-doce foi conduzida na condição ótima previamente estabelecida: 37 horas de incubação, pH 4,0, temperatura 50 °C e concentração da enzima de 31,25 U g⁻¹ (corrida 11, Tabela 4). Na validação, os valores de glicose obtidos experimentalmente (22,43 g L⁻¹) foram similares aos valores preditos pelo modelo (20,70 g L⁻¹), correspondendo a uma recuperação de 108,35%. O alto valor de recuperação alcançado mostra adequação ao modelo gerado, validando-o de forma satisfatória.

6. CONCLUSÕES

Elevados níveis de amilases foram produzidos por *A. niger* quando cultivado em presença de casca de batata-doce, uma fonte de carbono até então pouco explorada. O extrato bruto de *A. niger* mostrou-se eficiente em hidrolisar o amido granular da batata-doce, obtendo-se altos níveis de sua conversão em glicose. As enzimas produzidas apresentaram propriedades interessantes, como atuação em temperaturas elevadas, boa estabilidade térmica, bem como estabilidade em uma ampla faixa de pH. O DCCR e a MSR mostraram-se metodologias adequadas para a otimização dos bioprocessos estudados, resultando em elevados níveis de produtividade. Por fim, o processo de hidrólise da batata-doce desenvolvido é bastante promissor, devido aos elevados rendimentos de glicose obtidos utilizando resíduos agroindustriais na produção de enzimas e temperaturas de sub-gelatinização para a hidrólise o que propicia uma redução de custo. Desta forma, o presente estudo fornece novas perspectivas, a fim de tornar o processo de produção de álcool da batata-doce economicamente competitivo.

7. REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI F, C. J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ADENIRAN, A. H.; ABIOSE, S. H. Amylolytic potentially of fungi isolated from some Nigerian Agriculture waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 667-672, 2009.

AGGARWAL NK, YADAV SK, DHAMIJA SS, YADAV BS. Optimization of enzymatic hydrolysis of pearl millet for glucose production. **Starch/ Stärke**, v. 53, p. 330-335, 2001.

AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: does biofuels production increase food prices? **Energy**, v. 36, p. 2070-2076, 2011.

ALI, I.; AKBAR, A.; YANWISSETPAKDEE, B.; PRASONGSUK, S.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H. Purification, Characterization, and Potential of Saline Waste Water Remediation of a Polyextremophilic α -Amylase from an Obligate Halophilic *Aspergillus gracilis*. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 106937, 2014.

ALI, I.; AKBAR, A.; MOHAMMAD, A.; SEHANAT, P.; PONGTHARIN, L.; PUNNAPAYAK, H. Purification and characterization of a polyextremophilic -amilase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for use with detergents. **Biomed Research International**, v. 2015, Article ID 245649, 2015.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 28, p. 5514–5523, 2011.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (Brasil). O que são biocombustíveis? 2012. Disponível em:<<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em 10 junho 2015.

APAR, D. K; OZBEK, B. α -Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1877-1892, 2004.

AYYACHAMY, M.; VATSALA, T. M. Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C01 using agro-residues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 467-472, 2007.

AZHAR, A.; HAMDY, M. K., Alcohol fermentation of sweet potato. I. Acid hydrolysis and factors involved. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 879-886, 1981.

BASRI, M.; RAHMAN, R. N. Z. R.; EBRAHIMPOUR, A.; SALLEH, A. B.; GUNAWAN, E. R.; RAHMAN, M. B. Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester.(Research article). **BMC Biotechnology**, 7:53, 2007.

BASS, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 5-12, 2009.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. Caier Academic Press, Portland, 2010. p. 1-17.

BETIKU, E.; AKINDOLANI, O. O.; ISMAILA, A. R. Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peel using a statistical approach. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 467-476, 2013.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, n. 5, p. 965-77, 15 set. 2008.

BHARDWAJ, S.; VEDAMURTHY, A. B.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A. Effect of inorganic salts and surfactants on the production of alpha-amylase by a mangrove isolate of *Aspergillus flavus* using solid-state fermentation. **Journal of Chemistry, Biological and Physical Sciences**, v. 2, p. 1390-1397, 2012.

BLACK, C. K.; PANOZZO, J. F.; WRIGHT, C. L.; LIM, P. C. Survey of white salted noodle quality characteristics in wheat landraces. **Cereal Chemistry**, v. 77, p. 468-472, 2001.

BLAZEK, J. e GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3275-3289, 2010.

BNDES - Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social. Bioetanol de Cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, Nov. 2008. 316p.

BRADBURY, J. H. Chemical compositions of tropical roots crops and its implications for nutrition. In: EIGHTH SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOTS CROPS, 1990, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok, 1990, p. 159-170.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

CAMACHO, I. A. O. **Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para a produção de bioetanol e sua utilização na alimentação de aves**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2009.

CAO, Y.; TIAN, H.; YAO, K.; YUAN, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 5, p. 318-324, 2011.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008.

CASTRO, L.A.S. de; EMYGDIO, B.M. **Batata-doce para produção de biocombustível**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/BatataDoce/index.htm>. Acesso em: 11 fev. 2014.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Use of mesophilic fungal amylases produced by solid-state fermentation in the cold hydrolysis of raw babassu cake starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1612–1625, 2010.

CELESTINO, J. R.; DUARTE, A. C.; SILVA, C. M. M.; SENA, H. L.; FERREIRA, M. P. S. B. C.; MALLMANN, N. H.; LIMA, N. P. C.; TAVARES, C. C.; SOUZA, R. O. S.; SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from Manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as substrate. **Enzyme Research**, v. 2014, Article ID 725651, 2014.

CEREDA, M. P. Potencial das tuberosas americanas. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO CARÁ, 2001, **Anais...** Venda Nova do Imigrante: SNIC, 2001.

CHAVES, M. C. CARVALHO.; GOMES, C. F. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Production**, v. 24, p. 495-507, 2014.

CHEN, M.; XIA, L; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 85-89, 2007.

CHIMATA, M. K.; CHETTY, C. S.; SURESCH, C. Fermentative production and thermostability characterization of α -amylase from *Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. **Biotechnology Research International**, v. 2011, Article ID 323891, 2011.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias-primas amiláceas visando a obtenção de etanol**. 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL.

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

DAGENAIS, T. R.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DAR, G. H.; KAMILI, A. N.; NAZIR, R.; BANDH, S. A.; MALIK, T. A. Biotechnological production of α -amylases for industrial purposes: Do fungi have potential to produce α -amylases. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 5, 35-40, 2014.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 83-90, 2015.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152-161, 2012.

DJEKRIF-DAKHMUCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L.

Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Processing Engineering**, v. 73, p. 190-197, 2006.

DUVERNAY, W.H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 527-537, 2013.

EL-ZAWAWY, W. K.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 865–871, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PERQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 2007. **Cultivo da batata-doce**. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_batata_doce.htm>. Acesso em 10 jan. 2014.

FALLER, D.; KLINGMÜLLER, U.; TIMMER, J. Simulation methods for optimal experimental design in systems biology. **Simulation**, v. 79, n. 12, p. 717-725, 2003.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

FERREIRA, O. E.; MONTIJO, N. A.; MARTINS, E. S.; MUTTON, M. J. R. Production of α -amylase by solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 622-628, 2015.

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

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 26, p.266-232, 2014.

FRISVAD, J. C.; SHOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 442-453, 2005.

GALVEZ, A. Analyzing cold enzyme starch hydrolysis technology in new ethanol plant design. **Ethanol Producer Magazine**, v. 11, p.58–60. 2005.

GENKINA, N. K.; KISELEVA, V. I.; NODA, T. Comparative investigation on acid hydrolysis of sweet potato starches with different amylopectin chain-length. **Starch-Stärke**, v. 61, p. 321-325, 2009.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GOMES, E.; SOUZA, S. R.; GRANDI, R. P.; SILVA, E. D. Production of thermostable glucoamilase by newly isolated *Aspergillus flavus* A.1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75-82, 2005.

GONÇALVES NETO, A.C.; MALUF, W.R.; GOMES, L. A. A.; MACIEL, G. M.; FERREIRA, R. P. D.; CARVALHO, R. C. Correlação entre caracteres e estimação de parâmetros populacionais para batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 713-719, 2012.

GREENPEACE. **[R]evolução energética: a caminho do desenvolvimento limpo**. São Paulo: Greenpeace, 2010. Disponível em: <<http://www.greenpeace.org/brasil/Global/brasil/report/2010/11/revolucaoenergeticadeslimpo.PDF>>. Acesso em 10 junho 2015.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B.

Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599–1616, 2003.

HAALAND, P. D. **Experimental design in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989.

HASEGAWA, Y.; FUKUDA, T.; HAGIMORI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S. Tensyucic acids, new antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1338-1341, 2007.

HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUEZ, M. R.; GUERRA, N. P.; ROSÉS, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Processing Engineering**, v. 73, p. 93-100, 2006.

HESSE, S. J. A.; RUJITER, G. J. G.; DIJIKEMA, C.; VISSER, J. Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungi *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3485-3494, 2002.

HII, S. L.; TAN, J. S.; LING, T. C.; ARIFF, A. B. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2012, Article ID 921362, 14 p., 2012.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HUNG, P. V.; MY'AND, N. T. H.; PHI, N. T. L. Impact of acid and heat–moisture treatment combination on physicochemical characteristics and resistant starch contents of sweet potato and yam starches. **Starch - Stärke**, v. 66, p. 1013-1021, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf>. Acesso 14 junho 2015.

IOELOVICH, M. Recent findings and the energetic potential of plant biomass as a renewable

source of biofuels – a review. **Bioresources**, v. 10, p. 1879-1914, 2015.

JAIN, A.; MORLOK, C. K.; HENSON, J. M. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 905-917, 2013.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, E.; TORRES-SALINAS, D.; MORENO, R.B.; BAÑOS, R.R.; JUWON, A.D.; EMMANUEL, O.F. Experimental investigations of the effects of carbon and nitrogen sources on concomitant amylase and polygalacturonase production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in submerged fermentation. **Biotechnology Research International**, v. 2012, Article ID 904763, 2012.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5602-5609, 2008.

KARKI, B.; MAURER, D.; KING, T. H.; JUNG, S. Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1228-1233, 2011.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN, S. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 829–832, 2006.

KHANAHMADIA, M.; MITCHELL, D. A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SANCHEZ, R. L. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2675-2687, 2006.

KHURI, A.I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **WIREs Computational Statistics**, v. 2, p. 128-149, 2010.

KIM, Y., MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., EZEJI, T., BLASCHEK, H., DIEN, B., COTTA, M., DALE, B. e LADISCH, M. R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thins tillage. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 12, p. 5165-5176. 2008.

KIM, K.; HAMDY, M. K. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 316-320, 1985.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 223-253, 2010.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MULLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, H. A. B.; WOSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems: an overview. **Critical Review in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Lipase production in solid state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. **Dynamic Biochemistry Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, p. 13-27, 2012.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis of chicken meat. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 577-566, 2009.

LAREO, C.; FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; FARJADO, L.; LARNAUDIE, V.; RAMÍREZ, M. B.; MARTÍNEZ-GARREIRO, J. Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 493, 2013.

LAWAL, A. K.; BANJOKO, A. M.; OLATOPE, S. O.; ALEBIOSU, F. A.; ORJI, F. A.; SUBERU, Y. L.; ITOANDON, E. E.; SHITTU, K. A.; ADELAJA, O. D.; OJO, E.; DIKE, E.

N.; ELEMÓ, G. N. Production and partial purification of amylase by *Aspergillus niger* isolated from cassava peel. **Journal of Basic & Applied Science**, v. 10, p. 287-291, 2014.

LEATHERS, T.D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi, **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 133-140, 2003.

LEE, R. A.; LAVOIE, J. M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 6-11, 2013.

LEHMANN, U.; ROBIN, F. Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 7, p. 346-355, 2007.

LI H, CHI Z, DUAN X, WANG L, SHENG J. WU L. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 462–465, 2007.

LI, J.; VASANTHAN, T.; BRESSLER, D. C. Improved cold starch hydrolysis with urea addition and heat treatment at sub-gelatinization temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1649-1656, 2012.

LI, C.; DU, M.; CHENG, B.; WANG, L.; LIU, X.; MA, C.; YANG, C.; XU, P. Close relationship of a novel Flavobacteriaceae α -amylase with archaeal α -amylases and good potentials for industrial applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7:18, 2014.

LIMA, U. A. (Coord.); AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biocologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, 1.ed. São Paulo: Blücher, 2001.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.

MAGALHÃES, K. A. B. **Análise da sustentabilidade da cadeia produtiva de etanol de**

batata-doce no município de Palmas – TO. 2007, 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, 2007.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013). Anuário estatístico de agroenergia. Secretaria de Produção e Agroenergia. Brasília : MAPA/ACS, 2013. 284 p.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em 10 de junho de 2015.

MARQUARDT, M. M. **Estudos da atividade proteolítica de *Bacillus cereus* em biorreator.** 2003, 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 11, p. 426-428, 1959.

MONTORO, R. S.; MEDEIROS, S.F.; SANTOS, A.M.; SILVA, M.B.; TEBALDI, M.L. Application of 2K Experimental Design and Response Surface Methodology in the Optimization of the Molar Mass Reduction of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PHBHV). **Design of Experiments - Applications**, p. 93-120, 2013.

MURILLO, I. A. Analysis of the viability of ethanol production in Brazil: economical, social & environmental implications. **Energy and Environment Research**, v. 3, p. 166-175, 2013.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 3, p. 73-80, 2010.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 395, p. 1225- 1242, 2009.

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium sp.* isolated from eastern nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 54, p. 649-658, 2011.

OLIVEIRA, L. C. **Indústria de etanol no Brasil: uma estrutura de mercado em mudança**. 2009. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) - Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OMEMU, A. M.; BANKOLE, M. O.; AKPAN, I. Production and characterization of extracellular amyloglucosidase from *Aspergillus niger* CA-19 by solid-state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 129-135, 2008.

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

PAULCHAMY, C. Solid-state cultivation of *Aspergillus niger* NCIM 548 for glucoamylase production on groundnut shell. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, p. 1-6, 2008.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. **Starch-Stärke**, v. 62, p. 389-420, 2010.

PERVEZ, S.; AMAN, A.; IGBAL, S.; SIDDIQUI, N.N.; QADER, S.A.U. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amyolytic enzymes by double fermentation process. **BMB Biotechnology**, 14:49, 2014.

PETERSEN, L. M.; HOLM, D. K.; KNUDSEN, P. B.; NIELSEN, K. F.; GOTFREDSEN, C. H., MORTENSEN, U. H., LARSEN, T. O. Characterization of four new antifungal yanuthones from *Aspergillus niger*. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 201-205, 2015.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v. 93, n. 4, p. 689-703, 2001.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, n. 2, p. 205-226, 2008.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIN, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SHARMA, P. N. Gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v. 97, 1449-1460, 2006.

PRASAD, N. K. **Enzyme Technology: Pacemaker of Biotechnology**. PHI Learning Pvt. Ltd., 2011.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

RATTANACHOMSRI, U.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, p.357. 2009.

RICHTER, L.; WANKA, F.; BOECKER, S.; STORM, D.; KURT, T.; VURAL, O.; SÜBMURHT, R.; MEYER, V. Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. **Fungal Biology and Biotechnology**, 2014, 1:4, 2014.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

ROCHA, N. R. A. F. **Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para a produção de etanol**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias Leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005, 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RUEGGER, M. J. S.;TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205-211, 2004.

SAINI, J.K., ANURAG, R.K.; ARYA, A.; KUMBHAR, B.K., TEWARI, L. Optimization of saccharification of sweet sorghum bagasse using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 211-219, 2013.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. “What is a species in *Aspergillus*?” **Medical Mycology**, v. 47, p. 13-20, 2009.

SAMSON, R.A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section nigri. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA. C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol

from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007, 132 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2007.

SAVIELLI, R. A.; PADUA, T.S.; DOBRZYCKI, J.H.; CAL-VIDAL, J. Análise texturométrica e microestruturais de pães franceses, contendo farinha de batata-doce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 395-400, 1995.

SAWAI, J., NAKAI, T., HASHIMOTO, A. AND SHIMIZU, M., A comparison of the hydrolysis of sweet potato starch with b-amylase and infrared radiation allows prediction of reducing sugar production. **International Journal of Food Science and Technology**, 39, 967-974, 2004.

SAXENA, R.; SINGH, R. Contemporaneous production of amylase and protease through CCD response surface methodology by newly isolated *Bacillus megaterium* strain B69. **Enzyme Research**, v. 2014, Article ID 601046, 2014.

SAXENA, R.; SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1334-1342, 2011.

SBARDELOTTO, M. et al. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp. utilizando torta de canola como substrato. In: III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. **Anais...**p. 293–296, 2013.

SCHMIDELL W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v.2. São Paulo: E. Blücher, 2001.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. DIJCK, P. W. M. van. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SENANAYAKE, S. A.; RANAWEERA, K. K. D. S.; GUNARATNE, A.; BUMUNUARACHCHI, A. Comparative analysis of nutritional quality of five different cultivars of sweet potatoes (*Ipomea batatas* (L) Lam) in Sri Lanka. **Food Science & Nutrition**, v. 1, p. 284-291, 2013.

SERRA, R.M.A. **Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina**. 212p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Escola de Engenharia da Universidade do Minho de Portugal, 2005.

SHANAVAS, S.; PADMAJA, G.; MOORTHY, S. N.; SAJEEV, M. S.; SHERIFF, J. T. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 901-909, 2011.

SHARIFFA, Y. N., KARIM, A. A., FAZILAH, A. AND ZAIDUL, I. S. M., Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 434-440, 2009.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 625-658, 2014.

SHRUTI, P.; ARORA, M.; SARAQ, L. Production and optimization of amylase and glucoamilase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**, v. 3, p. 83-88, 2013.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Batata-doce (*Ipomoea batatas* L.). EMBRAPA HORTALIÇAS. **Sistemas de produção**, 6. Versão Eletrônica, Jun./2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce_Ipomoea_batatas/apresentacao.html>. Acesso em 01/04/2014.

SILVA, T. M.; OLIVEIRA, M.; SOMERA, A. F.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.;

POLIZELI, M. L. T. M.; GUIMARÃES, L. H. S. Thermostable saccharogenic amylase produced under submerged fermentation by filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1136-1140, 2011.

SILVEIRA, M. A. Batata-doce: Bioenergia na agricultura familiar. In: 52° CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. AGROINDUSTRIALIZAÇÃO DE HORTALIÇAS: GERAÇÃO DE EMPREGO E RENDA NO CAMPO, Salvador. **Anais...** Salvador: CBO, 2012.

SILVEIRA; M.A. **Batata-doce: Uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol**. In: . INSTITUTO EUVALDO LODI – IEL / NÚCLEO CENTRAL. Álcool Combustível – Série Indústria em Perspectiva. v. 1. Brasília: IEL/NC, 2008. p. 109-122.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Optimization of process parameters for the production of alpha amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 498-503, 2009.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) and its application in detergent industry. **Biotechnology Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, p. 25-32, 2011.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

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

SINGH, G.; PAI, R. S.; DEVI, V.K. Optimization of Pellets Containing Solid Dispersion Prepared by Extrusion/Spheronization Using Central Composite Design and Desirability Function. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 3, p. 146-156, 2012b.

SINGH, S.; GUPTA, N.; KAUR, J.; GUPTA, A. Valorization of sal deoiled cake as media for acidic amylase and invertase co-production by *Aspergillus niger* NJ-1: Optimization by response surface methodology and application in oligosaccharide synthesis. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2015. In press.

SINGHANIA R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SLIVINSKI, C. T.; MACHADO, A. V. L.; IULEK, J.; AYUB, R. A.; ALMEIDA, M. M. Biochemical characterization of a glucoamilase from *Aspergillus niger* produced by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 54, p. 559-568, 2011.

SLIVINSKI, C. T. 2007. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 128 p. (Dissertação: Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOCCOL, C. R. ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.

SONG, Y. C; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. Characterization of Graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, and endophytic fungus in *Trachelospermium jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

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

STERGIOU, P-Y.; FOUKIS, A.; THEODOROU, L.; PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL,

E. Optimization of the production of extracellular α -amylase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 by response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 421-426, 2014.

STROPARO, E. C. **Avaliação do Processo de Hidrólise da Bata doce por Enzimas Comerciais e por Enzimas Produzidas por *A. niger* em Condições Otimizadas**. 2011, 60 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science & Nature**, v. 3, p. 480-486, 2012.

SUGANTHI, R.; BENAIZIR, J. F.; SANTHI, R.; RAMESH, K. V.; ANJANA, H.; NIDHIYA, K. A.; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, 2011.

SUN, H.; ZHAO, P.; GE, X.; XIA, Y.; HAO, Z.; LIU, J.; PENG, M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 998-1003, 2010.

SUNDARRAM, A.; PANDURANGAPPA, T.; MURTHY, K. α -Amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, p. 166-175, 2014.

TAMILARASAN, K.; MUTHUKUMARAN, C.; KUMAR, M. D. Application of response surface methodology to the optimization of amylase production by *Aspergillus oryzae* MTCC 1847. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 4241-4247, 2012.

TANYILDIZI, M. S.; OZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2291-

2296, 2006.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**. v. 39, n. 2, p.151-165, 2004.

TREICHEL H, et al. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology** v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

UBALUA, A. O. Sweet potato starch as a carbon source for growth and glucoamilase production from *Aspergillus niger*. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 788-795, 2014.

UTHUMPORN, U.; Z Aidul, I. S. M.; KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 47-54, 2010.

UTHUMPORN, U.; Z Aidul, I. S. M.; KARIM, A. A. Hydrolysis of native and heat-treated starches at sub-gelatinization temperature using granular starch hydrolyzing enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1167-1182, 2012.

VASCONCELLOS, J.N. Fermentação etanólica. In: Santos, F.; Borém, A.; Caldas, C. **Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa: Ed. da UFV: Viçosa, 2010, p. 407-435.

VIDAL, B. C., RAUSCH, K. D., TUMBLESon, M. E. e SINGH, V. Protease treatment to improve ethanol fermentation in modified dry grind corn processes. **Cereal Chemistry Journal**, v. 86, n. 3, , p. 323-328, 2009.

VIKTOR, M. J.; ROSE, S. H.; ZYL, W. H. van.; MARINDA, V-B. Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 167-174, 2013.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics**

Bulletin, v. 13, n. 1, p. 42-43, 1956.

YANG, B., DAI, Z., DING, S-Y., WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, p. 421-450, 2011.

YUSSOF, N. S.; UTRA, U.; ALIAS, A. K. Hydrolysis of native and cross-linked corn, tapioca, and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Starch-Stärke**, v. 65, p. 285-295, 2013.

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

WANG, P., SINGH, V., XU, L., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D. e TUMBLESÓN, M. E. Comparison of enzymatic (E-Mill) and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. **Cereal Chemistry**, v.82, n.6, p.734-738. 2005.

WANG, X. J.; BAI, J. G.; LIANG, Y. X. Optimization of multi enzyme production by two mixed strains in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 73, p. 533-540, 2006.

WANG, R., GODOY, L. C., SHAARANI, S. M., MELIKOGLU, M., KOUTINAS, A.; WEBB,C; Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n.4, p.223-228. 2009.

WANG, S.; COPELAND, L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1081-1097, 2015.

WAYNE'S WORLD. *Aspegillus* cultured on bakery bread at Wayne's Word. Disponível em: <http://waynesword.palomar.edu/chemid2.htm>. Acesso em 10 de junho de 2015.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2 ed. New York, Basel & Hong Kong: Marcel Dekker, 1994.

WITEK-KROWIAK, A. et al. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 150-60, 2014.

ZABALETA, J.P.L., THIESEN M. A. H.,SCHUTZ N., SILVA S. F., CASTRO M.,CHIELLE Z. Utilização de resíduos de batata-doce na alimentação de aves coloniais. Resumos do VI CBA e II CLAA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

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

ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 61, p. 209-234, 2010.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TOBERT, H. A.; SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 1503-1508, 2009.