



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE / UNICENTRO-PR
CAMPUS CEDETEG
MESTRADO EM BIOENERGIA

ERIVELTON CÉSAR STROPARO

HIDRÓLISE DO AMIDO DA BATATA DOCE POR ENZIMAS PURIFICADAS E
PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS

GUARAPUAVA-PR
2012

ERIVELTON CÉSAR STROPARO

HIDRÓLISE DO AMIDO DA BATATA DOCE POR ENZIMAS PURIFICADAS E
PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Bioenergia da
Universidade Estadual do Centro Oeste,
em cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioenergia.

Orientador: Prof^o Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende
Co-orientadora: Prof^a Dra. Adriana Knob

GUARAPUAVA-PR
2012

ERIVELTON CÉSAR STROPARO

HIDRÓLISE DO AMIDO DA BATATA DOCE POR ENZIMAS PURIFICADAS E
PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Bioenergia da Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, em cumprimento parcial das exigências para a obtenção de título de mestre em Bioenergia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende
Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof^a. Dra. Adriana Knob
Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof. Dr. Augusto Celso Antunes
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Guarapuava, ____ de _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Élio Miguel Stroparo e Zenilda Alice Stroparo,

Pelas angústias e preocupações que passavam por minha causa, por terem dedicado suas vidas a mim, pelo amor, carinho e estímulo que me ofereceram dedico-lhes esta conquista como gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me acompanhado nesta jornada e por ter me amparado nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais e meu Irmão Edson, por torcerem pelo meu sucesso e incentivar a minha escolha;

A Professora Doutora Adriana Knob, pelos ensinamentos, orientações e confiança à realização deste trabalho;

Ao Professor Doutor Juliano Tadeu Vilela de Resende pela orientação, dedicação e a oportunidade de desenvolver o trabalho como um todo;

Ao Professor Doutor Paulo Rogério Pinto Rodrigues pela confiança e as oportunidades concedidas;

Aos colegas do mestrado, em especial a Amanda Cantos que sempre me ajudou e apoiou;

A UNICENTRO pela oportunidade de cursar o Mestrado em Bioenergia;

A CAPES pelo suporte financeiro

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

*"Perdi-me em fórmulas e soluções,
busquei resultados e reações, dia após
dia de estudo, repetições! Mas agora o
fruto de um trabalho árduo, o qual será
refletido num futuro bom e próspero e
com a certeza de que mais esse sonho
está concretizado"*

Cristina Pavelski

STROPARO, E. C. Hidrólise do amido da batata doce por enzimas purificadas e produzidas por *aspergillus niger* em condições otimizadas. 2012. 99 páginas

Dissertação (Mestrado) em Bioenergia-Universidade estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2012.

RESUMO

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L) Lam] apresenta-se como uma excelente fonte de biomassa para produção de álcool combustível, associada a baixo custo de produção e rusticidade, porém inviável economicamente devido a altos custos em seu processo de hidrólise. As atividades desenvolvidas neste estudo visaram otimizar a produção de enzimas amiláceas produzidas por *Aspergillus niger* e posteriormente utilizá-las no processo hidrolítico de cinco cultivares de batata-doce, bem como comparar a eficiência destas com enzimas comerciais. A fim de se estabelecer níveis de produção de amilases mais elevados, foram avaliadas diferentes condições de cultivo do fungo tais como fonte de carbono, pH do meio de cultivo, cinética e temperatura de crescimento. Posteriormente, as melhores condições hidrolíticas para batata-doce foram determinadas utilizando-se tanto enzimas purificadas (α -amilase e amiloglicosidase) quanto produzidas por *A. niger*. Os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método ADNS (Miller, 1959) e o teor de glicose por meio da utilização do kit glicose método enzimático. Excelentes níveis de produção de amilases foram obtidos quando *A. niger* foi cultivado em farinha de mandioca, por cinco dias, pH 5,0 e a temperatura de 30°C. Maior eficiência do processo hidrolítico da cultivar UGA 5 em relação ao custo/benefício empregando-se enzimas comerciais foi obtida por meio da associação de amiloglicosidase e α -amilase purificadas, nas concentrações de 0,5 U/g amido e 750 U/g amido, respectivamente, por 120 minutos. Ao se empregar as enzimas produzidas por *A. niger*, as melhores condições de hidrólise estabelecidas para este mesmo cultivar foram seis horas de reação, temperatura de 60 °C e pH 4,5, resultando na liberação de 0,76 g de açúcares redutores e 0,53 g de glicose, a partir de 1 g de batata-doce. Após sua otimização, o processo hidrolítico foi avaliado sobre todas as cultivares. Dentre elas, a UGA56 apresentou os maiores rendimentos, porém a UGA5 mostrou-se mais promissora, por apresentar maior produtividade e bons índices de sacarificação, correspondendo a 0,77 g de glicose para enzimas purificadas e 0,53 g para enzimas fúngicas, implicando, estequiometricamente em 50 e 34 ml de etanol. O bioprocesso utilizando *A. niger* como produtor de amilases se mostrou satisfatório, possibilitando boa conversão do amido de batata-doce em açúcares e, principalmente, uma considerável redução nos custos associados ao processo de sacarificação.

Palavras chave: Amilases. *Aspergillus niger*. Batata-doce. Hidrólise enzimática.

STROPARO, E. C. **Starch hydrolysis of potato and sweet for purified enzymes produced by *Aspergillus niger* under optimized conditions** 2012. 99 páginas.

ABSTRACT

The sweet potato [*Ipomoea batatas* (L) Lam] presents itself as an excellent source of biomass for ethanol production, coupled with low production cost and hardiness, but not economically viable due to high costs in the process of hydrolysis. The activities developed in this study aimed to optimize the production of starch enzymes produced by *Aspergillus niger* and later use them in the hydrolytic process in five cultivars of sweet potato, as well as to compare the efficiency of these commercial enzymes. In order to establish levels of amylases higher, were evaluated under different conditions of cultivation of the fungus such as a carbon source, pH of the culture medium, kinetics and growth temperature. Subsequently, the best conditions to hydrolytic sweet potatoes were both determined using purified enzymes (α -amylase and amyloglucosidase) or produced by *A. niger*. The reducing sugars were quantified by ADNS (Miller, 1959) and the glucose content by using enzymatic kit glucose. Excellent production levels of amylase are obtained when *A. niger* was grown in cassava flour, for five days, pH 5.0 and 30 ° C. Improved efficiency of the process of cultivating hydrolytic UGA 5 to the cost / benefit of employing commercial enzymes was obtained through the association of α -amylase and amyloglucosidase purified in concentrations of 0,5 U/g starch and 750 U/g starch , respectively, for 120 minutes. By employing the enzymes produced by *A. niger* best hydrolysis conditions established for the same genotype were six hours of reaction at 60°C and pH 4,5, resulting in the release of reducing sugars of 0,76 g and 0,53 g of glucose from 1 g of sweet potato. After the optimization, the hydrolytic process was evaluated on all cultivars. Among them, UGA56 showed the highest yields, but UGA5 was more promising, due to its higher productivity and good rates of saccharification, corresponding to 0,77 g of glucose to purified enzymes and 0,53 g for fungal enzymes, implying , stoichiometrically in 50 ml of ethanol and 34. The bioprocess using *A. niger* as a producer of amylases were satisfactory, allowing good conversion of sweet potato starch into sugars, and especially a considerable reduction in costs associated with the process of saccharification.

Key words: Amylases. *Aspergillus niger*. Sweet potato. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química e conformação espacial da amilose.....	22
Figura 2 - Estrutura química da amilopectina, ilustrando as ligações α -1,4 e α -1,6 e a estrutura geral da molécula.....	22
Figura 3 - Microscopia do amido de batata doce.....	24
Figura 4 - Representação esquemática da atuação das enzimas amilásicas: α -amilases; β -amilases e Amiloglicosidase.....	28
Figura 5 - Conidióforo de um <i>Aspergillus</i> bisseriado (<i>Aspergillus ocraceus</i>) e terminologia das estruturas utilizadas na identificação e classificação.....	41
Figura 6 - <i>A. niger</i> em fase de esporulação (a) e uma micrografia eletrônica deste mesmo fungo.....	42
Figura 7 - <i>A. niger</i> crescido em meio sólido de Vogel, após sete dias de incubação a 28 °C (a) e <i>A. niger</i> crescido em meio líquido de Vogel, suplementado com farinha de mandioca como fonte de carbono, por cinco dias, a 28 °C (b).....	45
Figura 8 - Diferentes etapas do processamento da batata-doce, o qual antecedeu o processo de hidrólise enzimática. Batata-doce in natura (a); após ralagem (b); após secagem (c) e após processo de moagem (d).....	50
Figura 9 - Fluxograma do processo hidrolítico via enzimas purificadas.....	51
Figura 10 - Fluxograma do processo de hidrólise da cultivar UGA 5 utilizando amilases produzidas por <i>A. niger</i>	53
Figura 11 - Efeito de diferentes combinações de alfa-amilase e amiloglicosidase comerciais na hidrólise do cultivar UGA5. O processo de hidrólise foi conduzido em pH 5,6, a 60 °C, por duas horas.....	63
Figura 12 - Otimização da cinética de hidrólise da cultivar UGA5 utilizando alfa-amilase e amiloglicosidase comerciais. O processo de hidrólise foi conduzido em pH 6,5, a 60 °C.....	65
Figura 13 - Hidrólise das cultivares selecionadas via α -amilase e amiloglicosidase comerciais. O processo foi conduzido em pH 6,5, a 60 °C, por 120 minutos.....	66
Figura 14 - Efeito do pH do meio reacional na conversão de batata-doce em açúcares redutores e glicose. A hidrólise foi conduzida em diferentes valores de pH, a 50 °C, por duas horas, utilizando 10U/g amido.....	68
Figura 15 - Efeito da temperatura no processo hidrolítico da batata-doce via enzimas	

produzidas por <i>A. niger</i> . A hidrólise foi conduzida em diferentes valores de temperatura, em pH 4,5, a 50 °C, por duas horas, utilizando 10 U/g amido.....	70
Figura 16 - Influência do tempo sobre a hidrólise do cultivar UGA5 usando amilases produzidas por <i>A. niger</i> . A hidrólise foi conduzida em pH 4,5, a 50 °C, por diferentes períodos, utilizando 10U/g amido.....	72
Figura 17 - (a) Hidrólise das cultivares em banho-Maria; (b) Determinação de açúcares redutores (método ADNS) e (c) Quantificação de glicose (Kit Glicose Método Enzimático).....	73
Figura 18 - Sacarificação das cultivares selecionadas por amilases produzidas por <i>A. niger</i> . A hidrólise foi conduzida em pH 4,5, a 50 °C, por 6 horas, utilizando 10 U/g amido.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da produtividade e massa média de diferentes cultivares de batata-doce, na região de Guarapuava-PR.....	49
Tabela 2 - Combinações de enzimas comerciais utilizadas no processo de hidrólise do amido do cultivar UGA5.....	51
Tabela 3 - Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de amilases por <i>A. niger</i>	55
Tabela 4 - Cinética da produção de amilases por <i>A. niger</i> , em condição estacionária. O cultivo foi realizado em meio líquido de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), a 28°C e pH 6,5.....	57
Tabela 5 - Efeito do pH inicial de cultivo sobre a produção de amilases por <i>A. niger</i> . O cultivo foi realizado em meio de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), a 28 °C, por cinco dias.....	60
Tabela 6 - Efeito da temperatura sobre a produção de amilases por <i>A. niger</i> . O cultivo foi realizado em meio de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), pH 4,5 por cinco dias.....	61
Tabela 7 : Estimativa de produção de etanol das cultivares hidrolisadas por enzimas comerciais via reação de fermentação de Gay Lussac.....	67
Tabela 8 . Estimativa de produção de etanol das cultivares hidrolisadas por enzimas fungicas via reação de fermentação de Gay Lussac.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

U: Unidade Enzimática

α : Alfa

pH: Potencial Hidrogeniônico

m: metros

β : Beta

μmol : micro mol

M: molar

atm: atmosférico

mL: mililitros

m/m: massa por massa

v/m: volume por massa

μL : microlitro

NaOH: Hidróxido de Sódio

HCl: Ácido Clorídrico

g: grama

t/ha: tonelada/hectare

ADNS: Ácido 3,5-Dinitrossalicílico

UGA: Unicentro Guarapuava Agronomia

mg: miligrama

U/mL: Unidades por mililitros

h: hora

min: minutos

mg/mL: miligramas por mililitros

UFT: Universidade Federal do Tocantins

$^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius

GRAS: *Generally Regarded As Safe*

FMS: fermentação submersa

FES: fermentação em estado sólido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	19
3.1 A CULTURA DA BATATA DOCE.....	19
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BATATA-DOCE.....	20
3.3 PROCESSOS DE HIDRÓLISE DO MATERIAL AMILÁCEO.....	21
3.4 AMILASES.....	25
3.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS.....	29
3.5.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	32
3.5.1.1 Fontes de Carbono.....	32
3.5.1.2 Efeito da Temperatura.....	33
3.5.1.3 Efeito do pH.....	34
3.5.1.4. Agitação e Tamanho do Inoculo.....	34
3.5.1.5 Outros Fatores e Componentes Importantes na Produção das Enzimas.....	36
3.6 AMILASES FÚNGICAS.....	37
3.7 O GÊNERO ASPERGILLUS E A ESPÉCIE <i>A. niger</i>	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 LINHAGEM, CULTIVO E MANUTENÇÃO.....	43
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	43
4.2.1 Meio Sólido.....	43
4.2.2 Meio Líquido.....	45
4.3 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	45
4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES.....	46
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA.....	46
4.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	46
4.7 DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES.....	47
4.8 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE LIBERADA.....	47
4.9 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>A. niger</i>	47
4.9.1 Seleção da Fonte de Carbono Melhor Indutora da Atividade Amilásica.....	47
4.9.2 Influência do Tempo de Cultivo Sobre a Produção de Amilases.....	48
4.9.3 Influência da Temperatura e pH Sobre a Produção de Amilases por <i>A. niger</i>	48
4.10 HIDRÓLISE DO MATERIAL AMILÁCEO.....	49
4.10.1 Tratamento da Matéria-prima para Hidrólise Enzimática.....	49
4.10.2 Otimização do Processo de Hidrólise do Cultivar UGA5 Utilizando Enzimas Purificadas.....	50
4.10.3 Hidrólise dos Demais Cultivares Utilizando-se Enzimas Comerciais e Produzidas por <i>A. niger</i> Sob Condições Otimizadas.....	52
4.10.4 Otimização do Processo de Hidrólise da Cultivar UGA5 Utilizando Enzimas Produzidas por <i>A. niger</i>	52
4.10.5 Hidrólise das Demais Cultivares Utilizando Enzimas Produzidas por <i>A. niger</i> Sob Condições Otimizadas.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>A. niger</i>	54
5.1.1 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono Sobre a Produção de Amilases.....	54
5.1.2 Cinética da Produção de Amilases por <i>A. niger</i>	57
5.1.3 Efeito do pH de Cultivo Sobre a Produção de Amilases por <i>A. niger</i>	59
5.1.4 Efeito da Temperatura de Cultivo Sobre a Produção das Amilases.....	60
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA BATATA-DOCE UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIAIS.....	62
5.2.1 Avaliação de Diferentes Combinações de Enzimas Comerciais Utilizadas no Processo de Hidrólise do Amido do Cultivar UGA5.....	62
5.2.2 Estudo Cinético da Reação de Hidrólise Utilizando Enzimas Purificadas.....	64
5.2.3 Hidrólise das Demais Cultivares Seleccionadas Via Enzimas Purificadas.....	65
5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA BATATA-DOCE UTILIZANDO ENZIMAS PRODUZIDAS POR <i>A. niger</i>	68
5.3.1 Avaliação da Influência do pH de Reação Sobre a Hidrólise da Cultivar UGA5 Utilizando Amilases Produzidas por <i>A. niger</i>	68
5.3.2 Efeito da Temperatura Sobre a Taxa de Hidrólise da Cultivar UGA5 Via Enzimas Produzidas por <i>A. niger</i>	69
5.3.3 Influência do Tempo de Hidrólise da Batata-doce Com Enzimas Produzidas Por <i>A. niger</i>	71
5.3.4 Hidrólise das Demais Cultivares Via Enzimas Produzidas por <i>A. niger</i>	73
6 CONCLUSÕES	76
8 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O etanol que antes era tido como um anacronismo de outras décadas se tornou, no século XXI, uma grande oportunidade de negócios para o país. A principal matriz energética mundial continua a mesma: o petróleo. Porém, as preocupações mudaram, principalmente em relação ao ambiente, em decorrência das mudanças do clima. O consenso da comunidade científica em relação ao aquecimento do planeta, devido ao aumento das emissões de poluentes provenientes da queima de combustíveis fósseis, reacendeu o interesse sobre os biocombustíveis.

Basicamente, a alternativa energética reside na agricultura, a qual oferece uma amplitude de matérias-primas adequadas à produção de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel. Em relação ao etanol, várias culturas se destacam, sendo que no Brasil a cana-de-açúcar domina amplamente o mercado. Entretanto, algumas restrições estão atreladas a seu cultivo, tais como o não desenvolvimento em áreas de temperaturas mais baixas e a existência de somente um ciclo anual, dentre outras (FELTRAN, 2009).

Segundo Silveira (2008), a batata-doce surge como uma alternativa interessante, podendo vir a somar na produção de etanol brasileiro. Para isso, deve-se ressaltar as principais características positivas da utilização desta amilácea, tais como: curto ciclo de desenvolvimento (4-5 meses), rusticidade no campo, adaptação às condições tropicais, alto rendimento por tonelada de matéria prima e aproveitamento do co-produto resultante de sua fermentação na alimentação animal, uma vez que este concentra cerca de 23% de proteína em sua constituição.

Do ponto de vista do potencial para produção de etanol, a batata-doce tem sido relatada por alguns autores como uma fonte altamente promissora, podendo produzir de 120 a 130 litros de etanol por tonelada de raízes (MENEZES, 1980). Em seu trabalho, Araújo et al. (1978) obtiveram excelentes níveis de produtividade, correspondendo a 158 litros de etanol por tonelada de raiz de batata-doce. Entretanto, há mais de 30 anos, os estudos sobre a potencialidade da cultura foram praticamente abandonados, deixando-se uma imensa lacuna sobre conhecimento do verdadeiro potencial da cultura para a produção de etanol.

Atualmente, um dos principais gargalos tecnológicos que tem inviabilizado a utilização da cultura da batata-doce como uma fonte viável e segura para a produção de etanol refere-se ao seu processo de hidrólise. Uma vez que a maior concentração de carboidratos encontra-se na forma amilácea, processos específicos são necessários para a conversão do amido em açúcares, os quais deverão ser posteriormente fermentados para a produção de etanol (GIRARD, 2006).

A hidrólise ou sacarificação do amido pode ocorrer por meio de um processo ácido ou enzimático. A hidrólise ácida apresenta como uma de suas vantagens o tempo de conversão mais curto. Porém, desvantagens como a necessidade de neutralização ao final do processo a fim de não inibir a fermentação posterior, a corrosão de equipamentos e geração de açúcares não fermentativos são observadas (CEREDA, 2001).

Usualmente, o processo de sacarificação enzimática ocorre em reatores de conversão, com a utilização de enzimas que podem ser de origem vegetal ou microbiana (LEONEL, 2000). Este processo oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além de ser menos poluente (LEATHERS, 2003).

Embora a hidrólise enzimática tenha se consolidado como o procedimento mais efetivo sua viabilidade econômica está fortemente atrelada ao custo com as enzimas utilizadas no processo de hidrólise da biomassa (FARINAS et al., 2008). Adicionalmente, a utilização de enzimas comerciais durante o processo hidrolítico do amido necessita de controladas temperaturas, as quais inviabilizam ainda mais o processo, tornando-o menos vantajoso em relação à utilização da cana de açúcar, por exemplo.

Uma vez que amilases estão diretamente envolvidas nos custos de produção do etanol a partir da batata doce, este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de amilases produzidas por uma linhagem de *A. niger*, previamente selecionado como um excelente micro-organismo amilolítico. Objetivou-se também otimizar o processo de hidrólise da batata doce, empregando-se tanto enzimas comerciais, quanto produzidas por *A. niger* em condições otimizadas, para um estudo comparativo da eficiência desses processos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Otimizar a produção de amilases por uma linhagem de *A. niger*, previamente selecionada como boa produtora destas enzimas. Avaliar o potencial de hidrólise da batata doce empregando-se enzimas purificadas e produzidas por *A. niger*, sob condições otimizadas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a influência de diferentes fontes de carbono amilásicas, de baixo custo, sobre a produção de amilases por *A. niger*;
- Avaliar a cinética de produção das amilases em meio estacionário;
- Avaliar as influências do pH do meio de cultivo bem como da temperatura de cultivo sobre a produção de amilases;
- Analisar a influência de fatores físico-químicos sobre o processo de hidrólise, empregando-se enzimas comerciais e produzidas por *A. niger*;
- Comparar o rendimento de conversão do material amiláceo em açúcares redutores via enzimas purificadas e produzidas por *A. niger*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A CULTURA DA BATATA DOCE

A batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) é uma amilácea originária da América Tropical, sendo que o centro de sua origem refere-se à Região Nordeste da América do Sul (SILVA et al, 1995). Possui elevado valor econômico e alimentício, sendo uma das fontes de segurança alimentar de inúmeras populações, principalmente daquelas situadas em regiões pobres.

Pertencente à família das convolvuláceas, é uma planta de constituição herbácea, rastejante verde ou arroxeadada, podendo alcançar de 3 a 5 m de comprimento. Suas raízes são tuberosas e variam de forma, tamanho e coloração, conforme a cultivar e o meio ambiente em que são produzidas. Por ser uma planta natural de regiões quentes, necessita de temperaturas elevadas durante todo o ciclo vegetativo (SILVA e MAGALHÃES, 2002).

Esta amilácea é uma das plantas mais eficientes na conversão de energia solar em química. Um dos pontos fortes dessa cultura é a rusticidade, ou seja, a elevada capacidade de ser produzida em solos onde não seria possível a produção de outras culturas mais exigentes. Além dessa característica, uma vantagem competitiva da batata-doce é o seu curto ciclo de produção (5-6 meses), permitindo que sejam produzidas duas safras por ano. A vocação natural voltada para pequenas e médias propriedades também é considerada um dos pontos fortes dessa cultura (SILVA et al, 1995).

A batata doce é uma hortaliça típica das regiões tropicais e subtropicais, que apresenta custo de produção relativamente baixo, com investimento mínimo. No Brasil, a batata-doce é cultivada, praticamente, em todas as localidades e principalmente como cultura de segurança alimentar em pequenas propriedades rurais. Esta distribuição se deve, além da riqueza nutricional, à sua capacidade de produção em solos com baixa a média fertilidade (SILVEIRA, 2008). Em 2006, os dados do IBGE apontaram o Nordeste (19.381 ha), o Sul (18.768 ha) e o Sudeste (5.635 ha) como as regiões que tem as maiores áreas de produção de batata-doce (IBGE, 2006).

Em relação à eficiência em quantidade de energia líquida, produzida por unidade de área cultivada e por unidade de tempo, esta amilácea supera culturas consagradas como arroz, banana, milho e sorgo. Produz grande volume de raízes num ciclo relativamente curto, a um custo baixo e durante o ano inteiro (CAMARGO FILHO et al., 2001).

A produção de glicose a partir do amido da batata-doce tem por finalidade a produção de etanol. A idéia de produção de etanol a partir da batata-doce não é nova. Desde os anos 1970, muitos pesquisadores já buscavam desenvolver combustível dessa forma, mas sempre esbarravam na baixa produtividade, sendo esta responsável pela inviabilização dos projetos (VITAL, 2008). Hoje, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando o melhoramento das variedades de batata-doce e técnicas para aumento da produtividade por hectare para lavouras comerciais.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BATATA-DOCE

A composição química das raízes da batata-doce revela que esta hortaliça é muito rica principalmente em carboidratos (amido), podendo variar de 13,4 a 29,2% e açúcares redutores de 4,8% a 7,8% em raízes frescas. Constitui-se ainda de vitaminas B, proteínas, pequenas quantidades de gorduras e elevada porcentagem de água (59,1 a 77,7%). Como fonte de minerais, a batata doce apresenta, em 100 g, os seguintes teores: cálcio (30 mg), fósforo (49 mg), potássio (273 mg), magnésio (24 mg), enxofre (26 mg) e sódio (13 mg) (EMBRAPA, 2011). A batata-doce apresenta pigmentos como o beta-caroteno, bem como comocarotenos e xantofilas, os quais estão presentes em quantidades menores. Durante o processo de armazenamento, devido à presença de enzimas amilolíticas, parte do amido é convertida em açúcares solúveis e açúcares redutores totais (MIRANDA et al., 1995). Esta característica é de suma importância para a utilização da batata doce como matéria-prima na produção de etanol, pois facilita o processo de hidrólise do amido.

3.3 PROCESSOS DE HIDRÓLISE DO MATERIAL AMILÁCEO

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza e depois da celulose, é o principal carboidrato sintetizado pelas plantas. Além de ser uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores, este polissacarídeo, composto inteiramente por unidades de D-glicose, constituiu também uma fonte de energia essencial para muitos seres vivos, incluindo o homem (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1978) o amido refere-se ao polissacarídeo de reserva de partes aéreas vegetais, tais como, milho, sorgo, tubérculos de batata, batata-doce, mandioca, o qual pode apresentar variadas características conforme sua origem, tais como o formato e tamanho de grânulos, a proporção entre seus constituintes químicos, a absorção de água e a temperatura de gelatinização. Este polissacarídeo pode ser hidrolisado liberando glicose, maltose e oligossacarídeos menores, que por sua vez podem ser utilizados para a produção de outros compostos químicos e também servir como substratos para fermentações posteriores (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

O amido acumula-se nas plantas na forma de grânulos insolúveis, sendo constituído basicamente por dois compostos quimicamente muito semelhantes: a amilose e amilopectina. As proporções de amilose e amilopectina variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta, aparecendo na proporção média de 20% a 22% e 75% a 80%, respectivamente (LASZLO et al., 1986).

De acordo com Lima (2001), a amilose é um polímero linear helicoidal da glicose, solúvel em água, consistindo de mais de 6000 unidades de D-glicose com ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (Figura 1). Ao contrário da amilose, a amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada (Figura 2), 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 (Van der MAAREL et al., 2002).

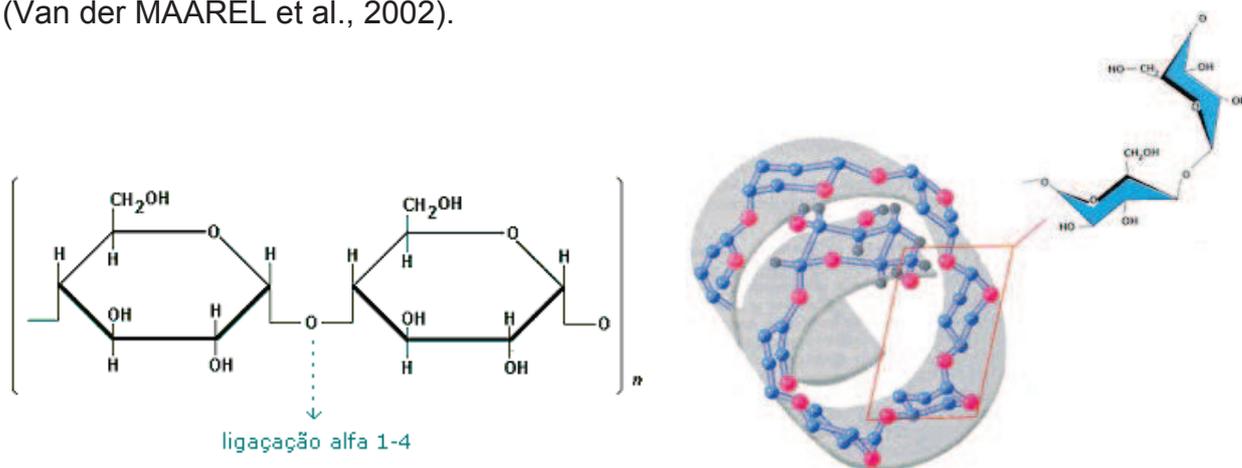


Figura 1: Estrutura química e conformação espacial da amilose (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Cada amido é único na organização e na estrutura dos seus grânulos e geralmente possui estrutura, propriedade e comportamento limitado. Sendo assim, amidos de origens diferentes não se comportam da mesma maneira. As propriedades dos amidos são determinadas pela estrutura química e molecular dos polímeros e pela quantidade de outros componentes, como os lipídios, proteínas e açúcares.

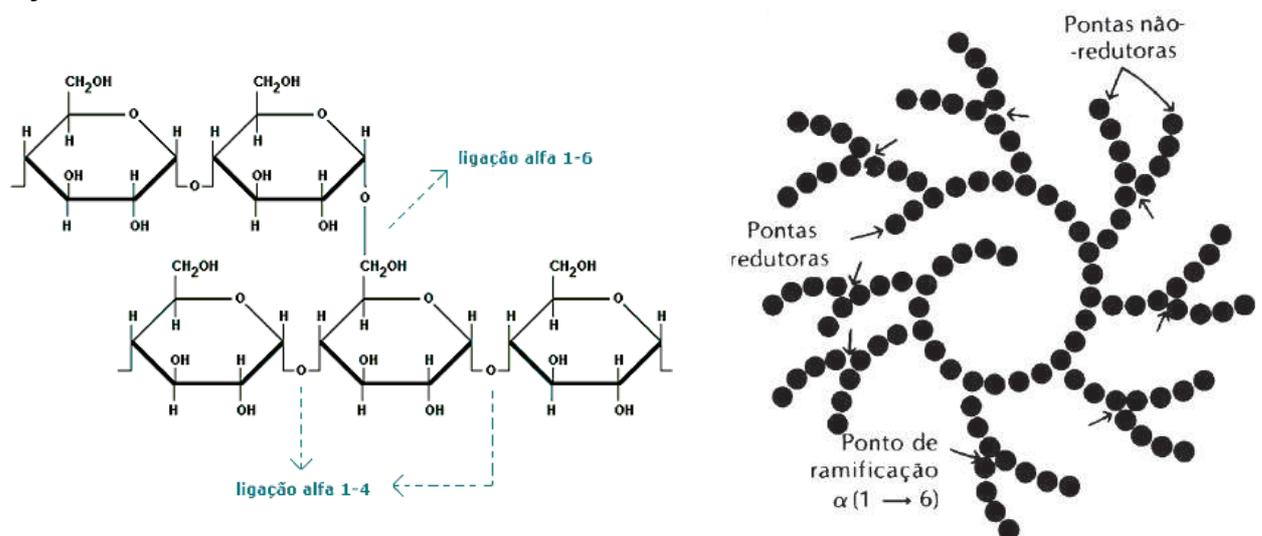


Figura 2: Estrutura química da amilopectina, ilustrando as ligações α -1,4 e α -1,6 e a estrutura geral da molécula (Fonte: JACQUES et al., 1999).

Em comparação com amidos de outras fontes botânicas, os teores de amilose observados para os amidos de batata doce (22,6%) ficam próximos aos observados para amidos de mandioca (19,8%), porém inferiores aos teores observados para amidos de inhame (32,6%) e biri (31,7%) (PERONI et al., 2006).

A estrutura do grânulo é importante para explicar as características funcionais identificadas no amido. Uma maneira indireta que possibilita o entendimento da

estrutura física e química dos amidos é a hidrólise enzimática do amido granular (FRANCO et al., 2001). As moléculas de amilose e amilopectina estão arranjadas no grânulo formando uma estrutura de camadas que se superpõem ao redor de um ponto denominado hilo, que pode estar no centro do grânulo ou deslocado lateralmente. As camadas que circundam o hilo são resultantes da deposição de amido de diferentes graus de hidratação, resultantes da presença de amilose ou amilopectina. Devido a isto têm regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas (FRANCO et al., 2001).

O tamanho dos grânulos afeta diretamente a composição do amido, gelatinização e propriedades de pasta, suscetibilidade enzimática, características de cozimento e propriedade de inchamento e cristalinidade. Grânulos grandes são classificados como maiores que 25 μm , médios com valores entre 10 e 25 μm , pequenos entre 5 e 10 μm e bem pequenos com tamanhos inferiores a 5 μm . O conteúdo de amilose é mais alto em grânulos maiores, entretanto, o conteúdo de lipídeos é mais elevado em grânulos menores (LINDEBOOM et al., 2004).

A taxa de hidrólise, além do tamanho dos grânulos, também é depende da origem botânica deste polissacarídeo, do sistema enzimático utilizado, entre outros fatores. Amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como os de milho, são degradados com maior facilidade que aqueles cuja superfície é lisa, como por exemplo, o de mandioca (FRANCO et al., 1998). Em especial, o amido de batata-doce apresenta grânulos com formato arredondado e poligonal, demonstrado na figura 3, como observado por Gracia et al. (2002) e Leonel et al. (2004) e distribuição de tamanho com diâmetro maior variando de 10 a 55 μm , estando concentrada na faixa de 12 a 20 μm (LEONEL et al., 2004).

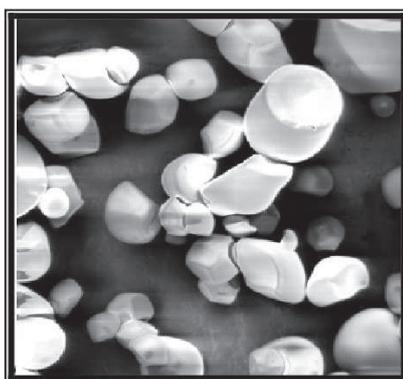


Figura 3: Microscopia do amido de batata doce (GRACIA et al., 2002).

Segundo Cereda (2001), o amido pode ser utilizado para produzir álcool, porém antes da fermentação, necessita-se da ocorrência de conversão do amido em açúcares simples, processo denominado hidrólise. A hidrólise ou sacarificação do amido pode ocorrer por meio de um processo ácido ou enzimático. A hidrólise ácida apresenta como vantagem o tempo de conversão mais curto, porém tem como principais desvantagens a necessidade de neutralização ao final do processo a fim de não inibir a fermentação posterior, a corrosão de equipamentos e geração de açúcares não fermentativos.

Por estas razões, a hidrólise enzimática é o objeto da maior parte dos estudos. Normalmente este processo ocorre em reatores de conversão, com a utilização de enzimas que podem ser de origem vegetal ou microbiana (LEONEL, 2000). Segundo Lima (2005), os modelos de hidrólise descontínua são desenvolvidos por meio da adição das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, juntamente à massa sob agitação para a quebra do amido.

O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente (LEATHERS, 2003). No entanto, no estágio de desenvolvimento atual, o processo ainda é economicamente inviável, devido ao elevado custo das enzimas e as elevadas temperaturas de reações empregadas, o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo (RABELO, 2007).

Devido a estes inconvenientes, com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, processos alternativos estão sendo desenvolvidos visando posteriormente à fermentação para a geração de etanol. Um dos procedimentos consiste em adicionar microorganismos que, em condições favoráveis, tornam-se capazes de secretar as enzimas necessárias à sacarificação (ALTINTAS et al., 2002). Outra alternativa inclui a obtenção prévia de amilases, por meio do cultivo de microorganismos na presença de substratos indutores, e posterior aplicação destas enzimas diretamente sobre o substrato a ser hidrolisado. Esta última configura-se

como uma excelente opção, pois além de gerar bons rendimentos em termos de açúcares, propicia a redução de custos de todo o processo.

Nos últimos anos, as amilases tem assumido um papel importante na conversão do amido em álcool, utilizando-se, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação. A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado, em parte, os problemas que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível (RAJOKA et al., 2004). Estudos relatam que a ação conjunta de enzimas para a digestão de amidos nativos apresenta bons resultados. O sinergismo mais comum estudado é de endo e exo enzimas (ROBERTSON et al., 2006), como no caso da α -amilase (endo) e da amiloglucosidase (exo).

No entanto, o custo de processamento de matérias-primas amiláceas para a produção de etanol ainda é elevado nos dias atuais, o que torna o etanol de amiláceas não competitivo em relação aos custos do etanol produzido da cana-de-açúcar. Contudo, a adoção de cultivares de batata doce de alto teor de matéria seca e com elevada produtividade de raízes e ajustes nos processo fermentativos como o uso de enzimas mais eficientes ou modificadas geneticamente pode permitir melhores resultados econômicos, como os obtidos por Silveira (2008).

3.4 AMILASES

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (HARGER, 1982). Estas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido, resultando em diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005). Atualmente, são conhecidas inúmeras enzimas amilásicas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para sua hidrólise completa (GUPTA et al., 2003).

Amilases podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação ou quanto o tipo de ligação que hidrolisam. Quanto ao mecanismo de ação, estas enzimas são divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases (GUPTA et al., 2003). As primeiras hidrolisam o amido de forma aleatória no interior de sua molécula. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de

cadeias de vários comprimentos e, dessa forma, quebram as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina. Já as exoamilases atuam externamente nas ligações dos substratos a partir das extremidades não redutoras, produzindo produtos de baixo peso molecular (GUZTMÁN-MALDONADO e PAREDE-LOPEZ, 1995).

Quanto às ligações hidrolisadas, as amilases são principalmente agrupadas em α -amilases (endoamilases), β -amilases (exoamilases), glucoamilases (amiloglucosidases), isoamilases, pululanases e ciclodextrina glicosiltransferases (Figura 4) (CORNELIS, 1987).

A α -amilase (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase , EC 3.2.1.1) pode ser definida como uma enzima que hidrolisa as ligações de polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia concomitantemente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de cinco a sete unidades de glicose, apresentando a configuração α no carbono C₁ na unidade de glucose redutora produzida (SPIER, 2005). A maior parte das α -amilases tem capacidade de contornar as ligações do tipo α -1,6 encontradas nos pontos de ramificação sem, no entanto, clivá-las. Entretanto, a α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* tem capacidade de hidrolisar tanto ligações α -1,4 como α -1,6 (SAKANO et al., 1982).

As amiloglucosidases ou glicoamilases (1,4- α -glucano glucanohidrolase , EC 3.2.1.3) são enzimas que atuam nos mesmos substratos que as endoamilases, mas de forma diferenciada. Estas enzimas extracelulares rompem as ligações α -1,4 partir da extremidade não redutora da amilose e da amilopectina, liberando β -D-glicose como produto. Algumas glicoamilases são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do tipo α -1,6. Nestes casos, verifica-se que a taxa de hidrólise das ligações α -1,6 é lenta quando comparada com a hidrólise das ligações α -1,4. Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados por esta enzima, a qual pode atuar também sobre as ligações α -1,3 (SPIER, 2005). As glicoamilases representam aproximadamente 30% da produção mundial de enzimas (Van der MAAREL et al., 2002). Apesar de várias culturas de microorganismos também produzirem esta

enzima, a amiloglicosidase produzida por *Aspergillus* é preferida por sua maior termoestabilidade, além de se encontrar no produto final baixa atividade de transglicosidase.

A amiloglicosidase desempenha o papel principal na hidrólise do amido *in natura* e quando associada a α -amilase apresenta um grande efeito sinérgico (ABE et al., 1988). Segundo Ueda et al. (1974), misturas de enzimas contendo α -amilases e amiloglicosidase são mais efetivas quanto à hidrólise do amido. Com base nestes resultados, os autores sugerem que a existência de amilose pode impedir a digestão no grânulo pela amiloglicosidase, enquanto a presença concomitante de α -amilase propicia a hidrólise desse componente, evitando a inibição da primeira enzima.

A β -amilase (1,4- α -glucano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) é considerada uma enzima sacarificante por produzir açúcar a partir do amido de uma extremidade não redutora (CEREDA, 2001). Essa enzima hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, formando maltose (SPIER, 2005). São também denominadas enzimas sacarificantes, uma vez que as maltoses resultantes são facilmente fermentáveis.

Isoamilases (glicogênio 6-glucanohidrolase, EC 3.2.1.68) são enzimas capazes de hidrolisar ligações tipo α -1,6 da amilopectina, glicogênio, dextrinas ramificadas e alguns oligossacarídeos. Estas se diferenciam da pululanase por não serem capazes de hidrolisar o pululano (polímero de maltotrioses, unidas pela extremidade por ligações glicosídicas do tipo α -1,6) (LEE e WHELAN, 1971).

Pululanases (α -dextrinas 6-glucosidase, EC 3.2.1.41) clivam as ligações glicosídicas do tipo α -1,6 nos pontos de ramificação do amido ou amilopectina, fazendo a conversão em moléculas de amilose que possuem ligações somente do tipo α -1,4. Também são capazes de atuar nas ligações α -1,6 da pululana, que por sua vez são separadas por três ligações glicosídicas do tipo α -1,4, liberando moléculas de maltotriose. As enzimas amilolíticas desramificantes são utilizadas na elucidação da estrutura do amido e oligossacarídeos relacionados e empregadas na produção industrial de glicose e maltose a partir do amido juntamente com α -amilases e β -amilases respectivamente.

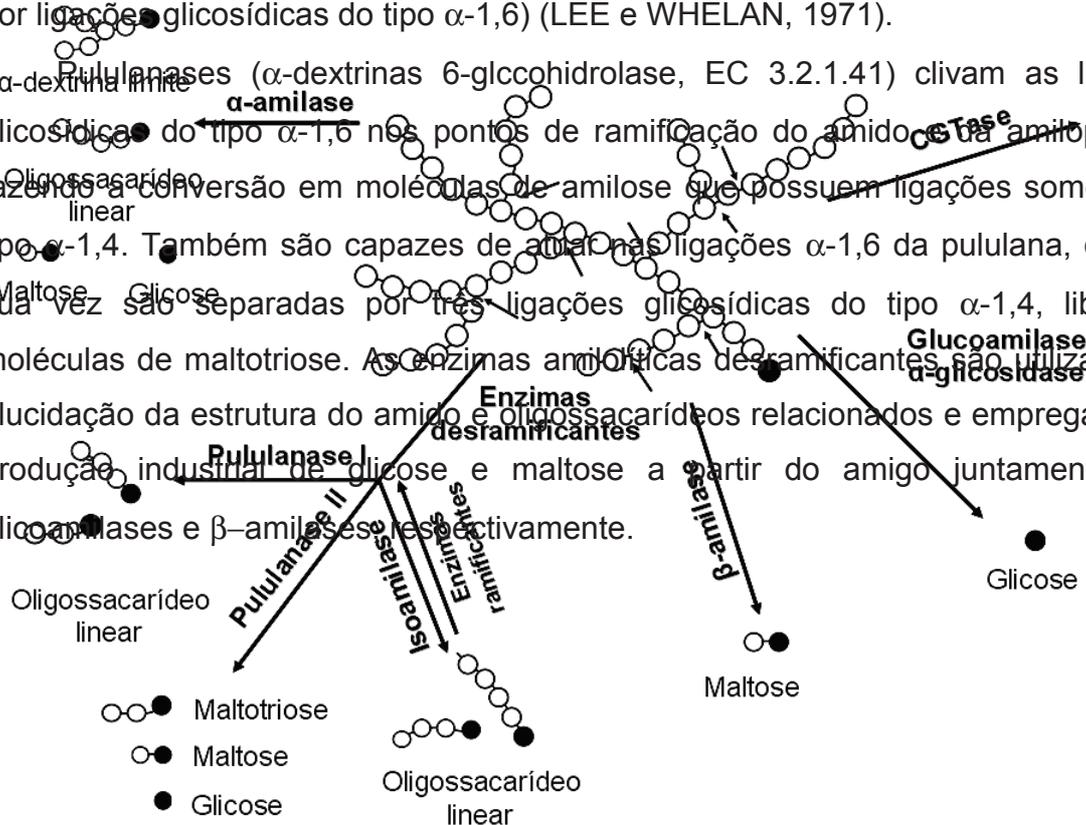


Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos de ação de diferentes classes de amilases sobre a molécula de amido (GONÇALVES, 2006).

Ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) são enzimas que hidrolisam o amido originando estruturas circulares denominadas ciclodextrinas, unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Estes anéis podem ser constituídos por 6,7 e 8 unidades de glicose, sendo chamados de α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente.

Outras enzimas classificadas como amilases, mas que são pouco relatadas na literatura são as isomaltases (dextrina 6- α -D-glucano hidrolase, EC 3.2.1.10), as quais hidrolisam as ligações α -1,6-D-glicosídicas em isomaltose de dextrinas e as α -glucosidases (α -D-glucosídica, EC 3.2.1.20), que hidrolisam as ligações α -1,4-D-glicose nos terminais não redutores nos resíduos de oligossacarídeos, liberando α -D-glicose (MINAFRA, 2007).

As amilases destacam-se entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica nos mais diversos setores, tais como têxteis, de bebidas destiladas e de cerveja, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza. Apesar de serem derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microorganismos, enzimas de origem microbiana são as que apresentam maior demanda industrial. Atualmente, um grande número de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e estas vem substituindo a hidrólise ácida nas indústrias de processamento do amido (PANDEY *et al.*, 2000).

3.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas possuem grande importância nos mecanismos celulares e alto potencial de aplicação na substituição dos processos químicos convencionais, sendo, portanto, o principal alvo de estudos em biotecnologia (SILVA e CARREIRO, 2007). Para ser utilizada comercialmente, a enzima deve proporcionar a obtenção de produtos que sejam de melhor qualidade que o produto original, permitir uma melhoria do processo e possibilitar a fabricação de produtos que não estão disponíveis ou que estão disponíveis em pequenas quantidades (ABRAHÃO NETO, 2001).

Dentre as principais vantagens de se utilizar células microbianas como fonte de enzimas, encontram-se a obtenção de elevadas concentrações através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microorganismos superprodutores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação a baixo custo e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, a qual possibilita a flexibilidade nas condições de uso (CANILHA *et al.*, 2006; ZIMMER *et al.*, 2009).

Uma maior aplicação industrial destes biocatalisadores biológicos de origem microbiana, face às vantagens por estes apresentadas, depende do melhoramento dos processos de produção e de purificação, os quais ainda apresentam um custo elevado. A melhora na produção pode ser obtida a partir da descoberta de novos microorganismos produtores; do melhoramento genético daqueles já utilizados; de modificações na composição e otimização dos meios de cultivo, utilizando substratos de baixo custo e de modificações no modo de condução da fermentação, como o pH, temperatura e aeração (CORZO e REVAH, 1999; CASTILHO *et al.*, 2000).

Em relação à produção industrial de enzimas microbianas, Fellows (1994) recomenda que sejam observados os seguintes requisitos: os microorganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em um ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo e a preparação enzimática obtida deve apresentar considerável estabilidade.

Segundo Joo e Chang (2005), a produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microorganismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento destes. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção.

A fermentação, sob o ponto de vista biotecnológico, pode ser definida como a transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de microorganismos e pode ser desenvolvida por processos submersos ou sólidos (MITCHELL et al., 2000; SILVA, 2003). A fermentação submersa (FSM) envolve a utilização de fontes de carbono em meios líquidos, enquanto que a fermentação em estado sólido (FES) emprega os mais variados substratos sólidos como fontes de carbono (WARD, 1989; FELLOWS, 1994). O meio utilizado deve conter uma fonte de carbono e de fonte energética, bem como uma fonte de nitrogênio, que permitam a proliferação celular. Além disso, pode requerer também nutrientes específicos para o crescimento e alguns minerais para a produção de enzimas.

A fermentação submersa é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica, com grande importância sócio-econômica (GIBBS et al., 2000). É influenciada por diversos fatores, os quais vão desde o crescimento e obtenção de biomassa até a produção de metabólitos. A FMS é amplamente utilizada, pois permite o controle dos parâmetros físico-químicos do processo como pH, oxigênio dissolvido e troca de calor e apresenta fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos. Ainda, permite que se evite a repressão catabólica pelo controle da fonte de carbono e retirada do produto (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2002). No entanto, os produtos são diluídos e os extratos enzimáticos podem apresentar menor estabilidade (PANDEY et al., 2000; ELLAIAH et al., 2002; SANDHYA et al., 2005). Um dos

maiores inconvenientes desse processo é o fato de gerar grandes volumes de resíduos (RAIMBAULT, 1998; ELLAIAH et al., 2002).

Em contrapartida, a FES utiliza sólidos em ausência de água livre entre as partículas, embora o substrato possua suficiente umidade para suportar o crescimento e metabolismo dos microorganismos. Esse processo é mais aplicado para fungos filamentosos, visto que estes crescem na superfície da partícula utilizando o oxigênio presente entre elas e sua estrutura filamentosa permite a penetração no interior, com melhor aproveitamento dos nutrientes nela contidos. A interação entre o fungo e o substrato possibilita a decomposição de substratos sólidos. O processo requer baixa energia, produz menos resíduo líquido e agrega valor a resíduos sólidos, principalmente os agro-industriais. Por outro lado, o controle dos parâmetros físico-químicos é um processo mais complexo (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2002).

Independentemente do processo utilizado, o sucesso de um processo fermentativo dependerá diretamente do crescimento microbiano e de sua atividade sobre o substrato. Tanto a maneira com que o micro-organismo degrada a partícula quanto o “pool” de enzimas necessário a essa degradação devem ser considerados (SILVA, 2003), bem como os custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima devem ser reduzidos (FELLOWS, 1994).

Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação de outros métodos (FELLOWS, 1994).

Com o intuito de tornar o processo de hidrólise do amido economicamente competitivo, várias linhagens fúngicas potencialmente produtoras de amilases tem sido isoladas nos últimos anos. Alguns trabalhos tem relatado a produção de diferentes tipos de amilases termoestáveis e termotolerantes, com características físico-químicas bastante diversificadas.

3.5.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

3.5.1.1 Fontes de Carbono

Para a produção de amilases é preciso disponibilizar ao micro-organismo uma fonte de carbono como dextrina, lactose, maltose, amido solúvel e outros, os quais podem ser substituídos por produtos agrícolas de baixo custo em um meio de cultura, gerando uma economia no processo produtivo (GUPTA et al., 2003; HAQ et al., 2002; GHOSH e CHANDRA, 1984). Neste sentido, farinhas, farelos de grãos, arroz, milho, trigo, cevada, mandioca e batata tem sido utilizados nos meios fermentativos a fim de aumentar a produtividade de amilases produzidas por bactérias e fungos (AJAYI e FAGADE., 2003; HAQ et al., 2005; RAMESH et al., 2001; VIJAYARAGHAVAN et al. 2011). Esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (MACIEL, 2006).

No Brasil, especialmente por suas características climáticas, substratos que podem ser empregados nos cultivos microbianos para a obtenção de enzimas estão disponíveis em abundância. Adicionalmente, existe uma grande variedade de recursos naturais renováveis, os quais podem ser transformados enzimaticamente em produtos de maior valor agregado (MINAFRA, 2007).

Na produção de amilase por fungos, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão é muito importante como forma de regulação de sua biossíntese (RABALHO, 2002). Verifica-se que a produção de α -amilase geralmente é induzida pela presença de amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose. Desta maneira, os substratos amiláceos são as principais fontes de carbono empregadas para induzir sua síntese e liberação, podendo ser utilizados resíduos agrícolas ou de processamento do amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para este fim. Já a glicose e outros açúcares facilmente metabolizáveis, como xilose e frutose, podem inibir a sua produção (GUPTA et al., 2003). Lachmund et al. (1993) verificaram que a produção de α -amilases por *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus nidulans* foi induzida na presença de amido e maltose, porém inibida por glicose.

Ao estudar a produção de amilases por *A. oryzae*, através da fermentação no estado sólido, Tunga e Tunga (2003) verificaram que a suplementação do meio com diferentes fontes de carbono tais como glucose, sacarose, maltose e lactose não contribuíram para o aumento da produção da enzima, enquanto que os maiores

níveis de produção foram observados quando *A. oryzae* foi cultivado na presença de farelo de trigo.

3.5.1.2 Efeito da Temperatura

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis aos microorganismos (HASAN, 1998). A temperatura afeta tanto a germinação dos esporos, quanto o crescimento, a esporulação dos microorganismos, o metabolismo e a formação de produtos. Essa dissipação de calor pode ser feita através da circulação forçada de ar ou por outro sistema que impeça o aquecimento (LONSANE et al., 1985, SCHMIDELL et al., 2001).

A literatura relata vários estudos visando produção de amilases, a partir de fungos mesofílicos crescidos dentro da faixa de temperatura de 25 a 37 °C. Bons níveis de produtividade de α -amilase foram alcançados empregando-se a temperatura entre 30 e 37 °C para o crescimento de *Aspergillus* sp., 30 °C para *A. niger* em relação a produção da amiloglucosidase; 30 °C para a produção de α -amilase por *A. oryzae* (TUNGA e TUNGA, 2003), bem como 55 °C e 50 °C para a produção de α -amilases pelos fungos termofílicos *Thermomonospora* sp. e *Thermomyces lanuginosus*, respectivamente (GUPTA et al., 2003).

3.5.1.3 Efeito do pH

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio (GUPTA et al., 2003). Segundo Prior et al. (1992), o intervalo de pH ideal para o crescimento microbiano e aquele para a formação do produto podem diferir consideravelmente.

A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de α -amilases bacterianas por fermentação submersa, apresenta pH ótimo entre 6 e 7, mas este varia muito especificamente de acordo com o gênero e a espécie da bactéria ou do fungo produtor. Os fungos filamentosos, mais tolerantes as condições ácidas, se desenvolvem melhor em valores de pH entre 6, e 8,0, onde os maiores níveis de produtividade enzimática são observados (GUPTA et al., 2003).

O pH do meio é um fator muito relevante, porém frequentemente negligenciado o que pode afetar a morfologia dos fungos. Diferentes valores de pH podem ser observados durante a incubação e podem estar relacionados ao transporte e solubilização dos nutrientes, às reações enzimáticas, produtos de excreção ou fenômenos de superfícies. Os efeitos deste processo, acrescido de uma limitação de nutrientes, tendem a aumentar o nível de stress celular levando a morte do micro-organismo (HUMPHREY, 1998; GIBBS et al., 2000).

Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante o cultivo (SCHMIDELL et al., 2001). Segundo Gupta et al. (2003), em certos processos envolvendo fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do próprio meio de cultura, em alguns casos, pode eliminar a necessidade de controle do pH.

3.5.1.4. Agitação e Concentração do Inóculo

O emprego de agitação pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos, impedir a formação de agregados e favorecer a exaustão de gases e a troca de calor do meio (SCHMIDELL et al., 2001; SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992). Em contrapartida, quando são utilizados fungos filamentosos, a agitação do substrato pode levar ao rompimento das hifas e liberação de metabólitos intracelulares, afetando a produção e a estabilidade de outros metabólitos produzidos durante o processo fermentativo (MITCHELL, 2002; KHANAHMADI et al., 2006).

A agitação na fermentação submersa está ainda relacionada com a forma como o micélio se desenvolve, o qual pode se dispersar livremente no meio de cultivo, ou emaranhar-se de maneira a formar aglomerados macroscópicos, na

forma de *pellets* (METZ et al., 1979; CHANG e OLLIS, 1982). A diminuição do comprimento da hifa e o aumento das ramificações ocorrem com o aumento da agitação e, conseqüentemente, com a diminuição da viscosidade do meio (PETRUCIOLI et al., 1995).

Está muito bem documentado que a formação de muitos produtos depende da estrutura morfológica do crescimento macroscópico de fungos filamentosos e que a mesma é influenciada por diversos fatores, como a agitação, composição do meio, pH e força iônica, bem como concentração do inóculo (METZ e KOSSEN, 1977). Em alguns casos, a formação de agregados miceliais é um pré-requisito para a produção de metabólitos secundários, como ácido cítrico, e para algumas enzimas fúngicas, tais como poligalacturonidases ou α -glucosidases. Em outros casos, a morfologia micelial livre é preferida para ótima produção metabólica (BRAUN e VECHT-LIFSHITZ, 1991).

De acordo com Sandhya et al. (2005), o tamanho do inóculo é um importante fator biológico, o qual determinará a biomassa produzida pela fermentação. Quando o tamanho do inóculo é pequeno, a atividade amilásica é baixa, possivelmente devido ao número insuficiente de células microbianas para produzir a enzima ou devido ao longo tempo necessário para a multiplicação das células atingir um determinado nível capaz de utilizar o substrato e produzir a enzima (RAMACHANDRAN et al., 2004; PENGTHAMKEERATI et al. 2012).

Em contraste, células microbianas abundantes originadas a partir de um inóculo maior podem afetar adversamente a produção de amilases, uma vez que a competição por nutrientes estabelecida entre os microorganismos presentes resulta em baixa produtividade enzimática (RAMACHANDRAN et al, 2004). Desta forma, um tamanho de inóculo adequado é importante para promover o equilíbrio entre a biomassa proliferativa e a quantidade de substratos disponíveis, a fim de elevar ao máximo os níveis de enzimas produzidas.

3.5.1.5 Outros Fatores e Componentes Importantes na Produção das Enzimas

Outro fator a ser considerado é a tensão de O₂ e CO₂ no meio. Doran (1995) ressalta que a transferência de oxigênio no meio de FSM para as células ativas é um fator crítico para as fermentações aeróbicas, pois este, na forma mais solúvel, é

escasso no meio. A transferência de massa de oxigênio no meio é ainda mais complexa em se tratando de meios mais viscosos, pois este deve ser transferido através do meio de fermentação a partir do local onde está sendo injetado até regiões de intenso metabolismo, ou seja, no interior das células. Segundo MITCHELL et al. (2000), a fermentação com substratos amiláceos pode ser prejudicada pelo aumento da viscosidade do substrato, que pode causar uma aglomeração das partículas durante os processos de FES, especialmente se o substrato for misturado a outros materiais. Essa compactação pode reduzir a troca de ar do meio e desta forma prejudicar o crescimento microbiano.

Muitas vezes, a forma como o O_2 se dispersa no meio pode ser restrita a determinadas regiões do fermentador, levando a um aumento do volume das bolhas no meio, tornando-o mais viscoso, e dificultando a transferência de oxigênio do meio para as células (GIBBS et al., 2000). As consequências dessa limitação vão desde a supressão ou total inibição da produção de metabólitos como enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos. Todavia, estudos reportam que a pO_2 não exerce grande influência sobre a morfologia fúngica (ZHOU et al., 1992; GIBBS e SEVIOUR, 1998).

Em decorrência da atividade respiratória da célula, a produção de CO_2 em grandes quantidades é muitas vezes comum em fermentações aeróbicas, podendo influenciar a morfologia fúngica. Segundo McINTYRE e MCNEIL (1998), o aumento do pCO_2 (~15-20% saturação) pode levar ao inchaço, raquitismo e alta ramificação das hifas e, às vezes, à formação de *pellets* miceliais.

Ainda, conforme citado por GUPTA et al (2003) o magnésio (Mg^{2+}) é um componente importante na produção de α -amilase, ocorrendo um aumento da produção da enzima em sua presença. O magnésio, juntamente com o sódio (Na^+) mostraram ser bons ativadores da produção de amilases por *Bacillus* sp. Potássio (K^+), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}), molibdênio (Mo^{2+}), cloreto (Cl^-) e sulfato não apresentaram efeito sinérgico sobre a produção de amilases por *A. oryzae*, enquanto o cálcio (Ca^{2+}) foi inibidor para a sua produção.

O fosfato tem um importante papel regulatório na síntese de metabólitos primários e secundários dos microorganismos, assim como exerce efeitos sob seu crescimento e produção de amilases. Um aumento significativo na produção de amilases por *A. oryzae* foi relatado em sua presença, em níveis ao redor de 0,2 M.

Por outro lado, altas concentrações de fosfato inibiram a produção desta enzima por *Bacillus amyloliquefaciens* (GUPTA et al., 2003).

3.6 AMILASES FÚNGICAS

Fungos são organismos heterotróficos, decompositores da matéria orgânica ou parasitas, que crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos denominados hifas, cujo conjunto constitui o micélio, sendo este último responsável por todas as funções vegetativas do micro-organismo. A obtenção de alimento é realizada por absorção através das paredes das células, sendo que os elementos nutritivos devem ser disponibilizados na forma de solução (ESPOSITO, 2004). A fim de auxiliar em sua nutrição, os fungos secretam no ambiente uma grande diversidade de enzimas, sendo desta forma responsáveis pela deterioração de vários materiais, naturais ou processados (FASANELLA, 2008). Estes organismos são encontrados no solo, colonizando vegetais, raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes e possuem habilidade para desenvolverem-se em qualquer substância orgânica, fazendo uso dos mais variados substratos. As fontes de carbono como amido, celulose, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedoras de energia para a atividade metabólica dos fungos (AGUIAR e MENEZES, 2000; MODA et al., 2005).

Nas últimas décadas, o emprego de fungos em bioprocessos tem ganhado importância devido à produção de inúmeras enzimas, com as mais diversas características físico-químicas e excelentes potenciais para a aplicação industrial (IWASHITA 2002). Dentre estas inúmeras enzimas, as amilases aparecem como uma das mais importantes.

A capacidade de síntese em larga escala, bem como a facilidade com que estas enzimas são secretadas para o meio externo constituem apenas algumas das características que tornam as espécies fúngicas particularmente interessantes do ponto de vista industrial (IWASHITA, 2002). Por serem geralmente extracelulares, o processo de recuperação do meio de fermentação de enzimas fúngicas é facilitado. Além disso, o uso de fungos como produtores de enzimas é mais seguro do que bactérias, já que normalmente são considerados como GRAS (*generally regarded as safe*) (GERMANO et al., 2003). Adicionalmente, enzimas de origem fúngica, ao

contrário das de origem vegetal, não estão sujeitas as intempéries climáticas, sendo produzidas sob condições controladas de cultivo.

A amilase é uma enzima universal em fungos (FADEL, 2000; WANG et al., 2001). Dentre as enzimas amilolíticas sintetizadas por fungos, as α -amilases e glucoamilases são relatadas com maior frequência (PANDEY, 2000). Estes microorganismos podem utilizar o amido como fonte de energia para o crescimento e esporulação. No entanto, a produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (GRIFFIN, 1994). Inúmeros fatores de natureza biológica ou físico-química podem influenciar o número e a atividade enzimática dos microorganismos (SANOMIYA e NAHAS, 2003; MACCHERONI JUNIOR et al., 2004).

Segundo Pandey et al. (2005), as enzimas amilolíticas são preferencialmente produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*. Wainwright (1995) e Pandey et al. (2005) descrevem as espécies *A. niger*, *A. oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* como produtoras de α -amilase e *A. niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus saitari*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus foetidus*, *Rhizopus foetidus* e *Rhizopus delemere* como espécies fúngicas utilizadas para a produção de amiloglicosidase.

As α -amilases com aplicação comercial produzidas por algumas bactérias, como as pertencentes ao gênero *Bacillus*, são atualmente preferidas em relação às produzidas por fungos e leveduras, por apresentar algumas características desejáveis para determinados processos conduzidos em elevadas temperaturas, como termoatividade e termoestabilidade. Entretanto, α -amilases bacterianas não apresentam a capacidade sacarificante de algumas α -amilases fúngicas (PANDEY, 2000).

Em relação às amiloglicosidases comerciais, a maioria é produzida a partir de linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo as sintetizadas por espécies de *Aspergillus* mais termoestáveis. Além da capacidade de produção em alta escala, algumas espécies de *Aspergillus* podem sintetizar mais de uma forma da enzima com características diferenciadas, comparadas com aquelas sintetizadas por bactérias com características e propriedades únicas (KUMAR et al., 2004).

As propriedades físico-químicas das amilases fúngicas variam de acordo com o tipo de enzima produzida, e com o gênero ou espécie desses microorganismos.

Segundo Spier (2005), o pH ótimo para a atividade da α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0, e a faixa ótima de temperatura é de 55 °C a 70 °C. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 °C a 50 °C, enquanto que as amiloglucosidases apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 e temperatura ótima entre 50 °C e 60 °C.

3.7 O GÊNERO *Aspergillus* E A ESPÉCIE *A. niger*

Aspergillus é o gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais extensivamente estudados. Espécies deste gênero são consideradas ascomicetos degradantes primário da celulose e lignina (FASANELLA, 2008) com cerca de 274 diferentes espécies descritas (KAAIJ, 2007).

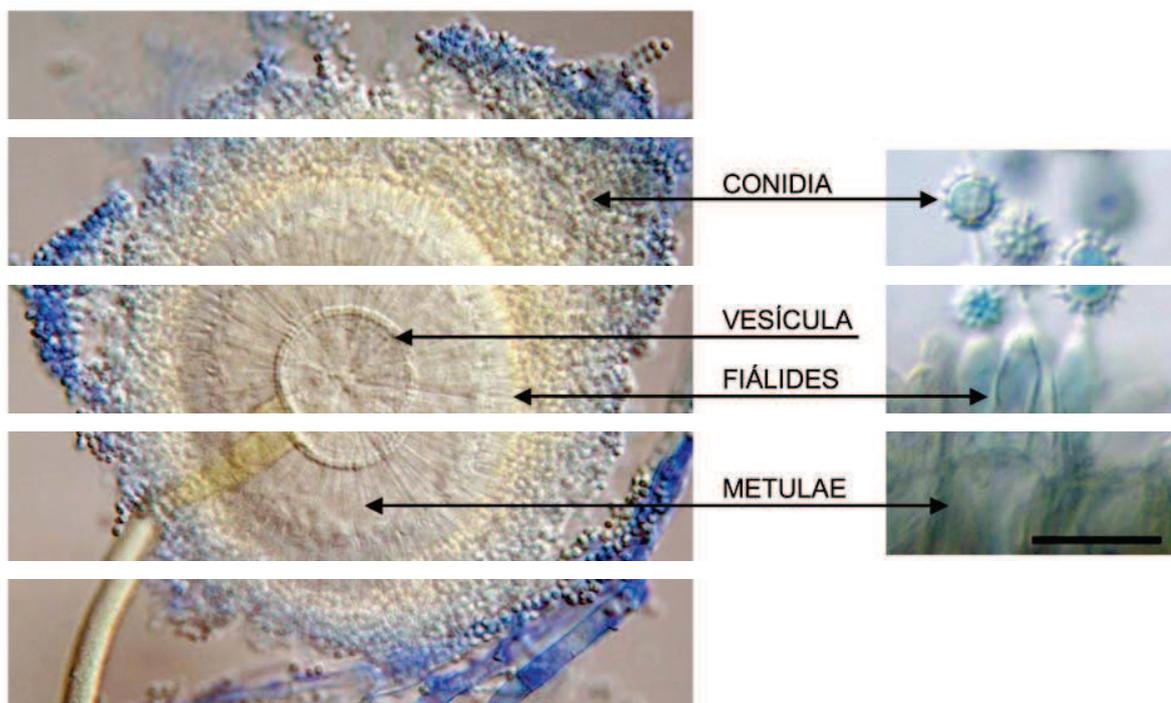
O gênero *Aspergillus* apresenta grande variedade de espécies economicamente importantes, tanto por serem utilizadas como fonte de enzimas industriais, como por causarem prejuízo, principalmente devido à produção de toxinas potentes (KLICH e PITT, 1988). Além da produção de micotoxinas, espécies do gênero *Aspergillus* podem crescer sobre produtos agrícolas armazenados como milho, soja, amendoim, café e cereais em geral, causando perda da coloração dos grãos e produção de odores ou sabores desagradáveis (VARGA et al., 2004). O gênero apresenta, ainda, espécies de importância médica, sendo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* as principais, podendo causar aspergilose em pacientes imunocomprometidos (McWINNEY et al., 1993; PANACKAL et al., 2006).

A palavra *Aspergillus* significa em latim globo perfurado que contém uma esponja ou pincel usado para aspergir água benta (KLICH e PITT, 1988). O gênero caracteriza-se pela produção de esporos assexuais se dar em uma estrutura chamada aspergilum (designação que se dá à parte superior da estrutura, ou seja, o conjunto da vesícula e das células reprodutivas especializadas que contém), a qual é especializada e característica do gênero. Eles possuem uma estrutura que é denominada conidióforo, o qual é constituído pelo aspergillum e pelo estipe (SERRA, 2005). O estipe é normalmente asseptado e termina na forma de um "T", onde se une à hifa vegetativa. Existem dois tipos de aspergillum, unisseriados e bisseriados. O aspergillum bisseriado, ao invés do unisseriado, tem uma paliçada de células designadas metulae entre a vesícula e as fiálides. Na figura 4 encontra-se

representado um conidióforo típico do gênero e a designação de cada estrutura (KLICH e PITT, 1988).

Existem espécies de *Aspergillus* capazes de reprodução sexuada. Estes estados teleomórficos pertencem à divisão Ascomycota, e são caracterizados pela formação de ascos que contém ascósporos (KLICH e PITT, 1988). As características microscópicas de maior valor na classificação e identificação das espécies de *Aspergillus* são o tipo de aspergillum, a forma, ornamentação e a cor dos esporos. A fim de identificar os teleomorfos, a natureza da parede do ascocarpo, bem como o tamanho, forma, ornamentação e cor dos ascósporos são parâmetros importantes. Além das características microscópicas, são utilizadas adicionalmente características culturais em meios e condições de incubação específicas, tais como o tamanho, cor e textura das colônias (SERRA, 2005).

A. niger, como seu próprio nome sugere, é um fungo filamentoso escuro, comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). Segundo PRADO (2002), *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, porém rapidamente forma milhares de esporos, conferindo sua aparência escura (Figura 6). Os conídios (esporos assexuais) são esféricos, medindo de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação.



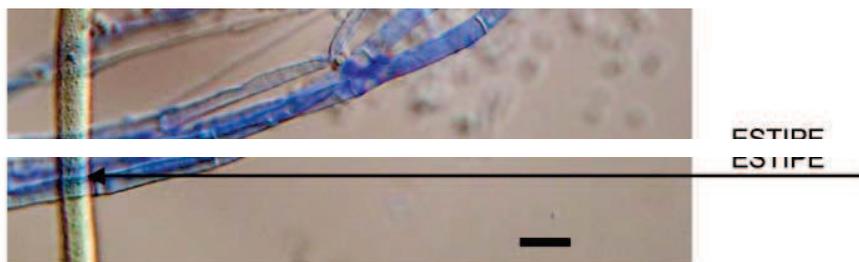


Figura 5: Conidióforo de um *Aspergillus* bisseriado (*Aspergillus ocraceus*) e terminologia das estruturas utilizadas na identificação e classificação. O conidióforo é constituído pelo aspergillum (designação que se dá à parte superior da estrutura, ou seja, o conjunto da vesícula e das células reprodutivas especializadas que contém) e pelo estipe. São visíveis nas figuras as métulas (células estéreis), fiálides (células conidiogênicas) e conidia (esporos assexuais) Extraído de SERRA (2005).

Embora esta espécie seja geralmente não-patogênica, a inalação de grande quantidade de esporos pode levar à doença pulmonar (aspergilose). Ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela Organização Mundial de Saúde, o qual abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas (KAAIJ, 2007).

A aplicação do *A. niger* em determinados bioprocessos apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. Adicionalmente, o fato de *A. niger* ser considerado um micro-organismo GRAS justifica o uso comercial desta espécie em grande escala (PRADO, 2002).



Figura 6: *A. niger* em fase de esporulação (a) e uma micrografia eletrônica deste mesmo fungo. Capturado por WAINRIGHT, (1995).

Muitas enzimas úteis industrialmente são produzidas por esta espécie. Segundo o regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano (ANVISA - D.O.U de 22/12/2005), enzimas produzidas por *A. niger*: α -galactosidase, amiloglucosidase, β -amilase, β -glucosidase, carboidrase, celulases, fitase, frutossiltransferase, glicose-oxidase, hemicelulase, inulinase, invertase, lipase, naringinase, pectina liase, pectinase, protease e transglucosidase. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato empregado na fermentação.

Apesar de existir alguns trabalhos relatando a produção e as propriedades de amilases produzidas por *A. niger*, as informações apresentadas na maioria dos casos dificilmente podem ser generalizadas para diferentes linhagens. De acordo com Underklofer et al. (1958), as quantidades absolutas e relativas de cada enzima produzida pode variar consideravelmente entre espécies e mesmo entre linhagens da mesma espécie. As características físico-químicas das enzimas produzidas também podem diferir, visto que diferentes microorganismos e linhagens se comportam de maneira variada frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas.

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM, CULTIVO E MANUTENÇÃO

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem de *A. niger* isolada do solo da Mata Atlântica por Ruegger (2001), na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, região do Banhado Grande, Estado de São Paulo, Brasil. A respectiva linhagem pertence à coleção de cultura do Centro de Estudos Ambientais – CEA/UNESP. Os fungos foram mantidos em laboratório em meio sólido de Vogel (VOGEL, 1964), suplementado com glicose como fonte de carbono, na concentração de 1,5% (m/v). Repiques das culturas foram realizados periodicamente, sendo incubadas a 28 °C, por sete dias. Após este período, a linhagem foi utilizada ou armazenada a 4 °C.

4.2. MEIOS DE CULTURA

4.2.1. Meio Sólido

O meio de Vogel sólido foi utilizado para manutenção da cultura e produção de inóculo.

Para a preparação do meio de Vogel, utilizou-se uma solução de traços de elementos, em água destilada. A esta solução, acrescentou-se 1,0 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano.

Solução de elementos-traço:

Ácido cítrico.H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ .6H ₂ O	1,00 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Água destilada	100 mL

A solução de sais de Vogel foi preparada pela dissolução dos sais abaixo relacionados:

Citrato de sódio.5H ₂ O	15,0 g
KH ₂ PO ₄	25,0 g
NH ₄ NO ₃	10,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5 g
Solução de biotina (0,1mg/mL)	0,5 mL
Solução de traços de elementos	0,5 mL
Água destilada qsp	100 mL

Em seguida foram adicionados 0,2 a 0,3 mL de clorofórmio, como agente antimicrobiano, e a solução foi estocada em refrigerador. A diluição da solução de sais de Vogel foi feita pela adição de uma parte da solução estoque em 49 partes de água destilada (v/v).

O meio sólido de Vogel foi preparado a partir da solução de sais de Vogel diluída suplementada com glicose 1,5 % (m/v) e ágar 1,5 % (m/v). Após a distribuição em tubos de cultura (7 mL/tubo) e esterilização, estes foram deixados em repouso à temperatura ambiente, sob inclinação.

4.2.2. Meio Líquido

Os meios de cultura líquidos foram utilizados para a produção de amilases por *A. niger*. Para preparação do meio líquido de Vogel, utilizou-se a solução de sais de Vogel diluída (conforme descrito no item 4.2.1), acrescido de 1 % (m/v) da fonte de carbono especificada para cada experimento.

4.3 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

Conídeos da linhagem de *A. niger*, cultivados em meio sólido de Vogel, a 28°C, por sete dias (Figura 7a), foram suspensos em água destilada esterilizada,

sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas, e sua concentração foi ajustada em Câmara de Neubauer para $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em frascos Elenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel (item 4.4.2), suplementado com fontes de carbono e condições de cultivo especificadas para cada experimento (Figura 7b).

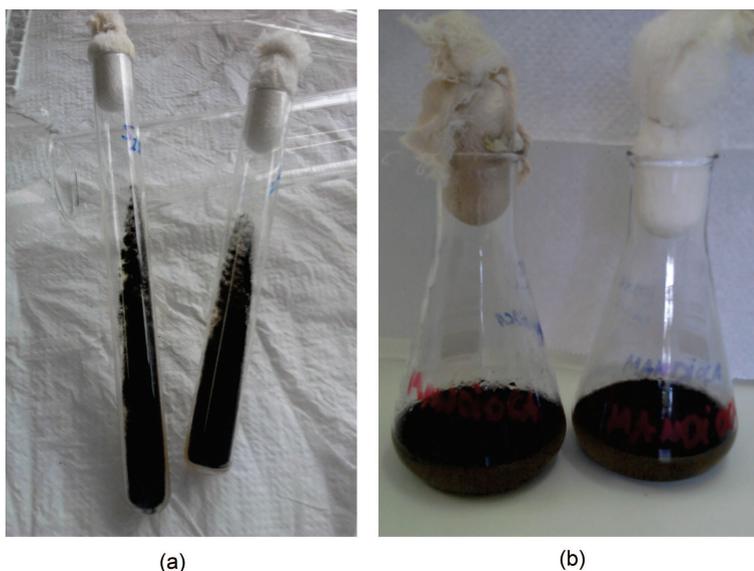


Figura 7: *A. niger* crescido em meio sólido de Vogel, após sete dias de incubação a 28 °C (a) e *A. niger* crescido em meio líquido de Vogel, suplementado com farinha de mandioca como fonte de carbono, por cinco dias, a 28 °C (b).

Após o crescimento em meio líquido por períodos pré-estabelecidos, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, obteve-se um filtrado do meio de cultivo livre de células, o qual foi utilizado como fonte de enzimas e de proteínas extracelulares.

4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES

O micélio, também obtido pela filtração, foi previamente congelado e triturado com três partes de areia lavada (m/m), com auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, 15 partes de tampão apropriado foram adicionadas, para cada parte de micélio seco (v/m). A mistura foi centrifugada (7500g, 20 minutos) e o sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de proteínas intracelulares.

4.5 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 Mc Ilvaine, pH 6,0. O mesmo tampão e a enzima (filtrado bruto) foram adicionados, de modo a completar o volume reacional a 1250 μL . A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 50 °C. Em intervalos de tempo apropriados, a reação foi interrompida e a determinação de açúcares redutores liberados foi realizada de acordo com Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como correspondendo à liberação de 1 μmol de açúcar redutor equivalente a glicose, por minuto por mL de amostra, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata, utilizando-se brancos apropriados.

4.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas foram determinadas a partir do método colorimétrico de Bradford modificado (SEDMAN & GROSSBERG, 1977), o qual se baseia na capacidade de o corante *Coomassie brilliant blue* BG-250 se ligar às proteínas, em meio ácido, resultando na mudança proporcional da cor, detectável em 595 nm. A soroalbumina bovina foi usada como padrão. Às amostras de proteínas apropriadamente diluídas de volume de 1,5 mL foram adicionados 1,5 mL do corante Comassie devidamente preparado. Após 10 minutos à temperatura ambiente, a leitura espectrofotométrica foi realizada a 595 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.7 DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

A dosagem de açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959). A mistura de reação foi constituída por 250 μl da amostra apropriadamente diluída e 250 μl do reagente DNS. Após homogenização e incubação durante cinco minutos em banho de ebulição, a mistura de reação foi resfriada em água corrente e diluída com 2,5 ml de água destilada. A

leitura foi realizada a 540 nm contra um branco preparado como descrito, substituindo-se o volume de amostra por água destilada. A conversão dos valores de absorbância em mg de açúcares redutores foi feita através da equação de regressão obtida pela curva padrão de glicose.

4.8 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE LIBERADA

A quantidade de glicose liberada durante o processo de hidrólise da batata doce foi realizada por meio do método da glicose oxidase, utilizando-se o kit comercial Glicose Método Enzimático (Laborlab). A mistura de reação foi constituída por 20 µL da solução de hidrólise convenientemente diluída e 2,0 ml do reativo de trabalho. Após a incubação da mistura de reação a 37 °C por 10 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em 505 nm.

4.9 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *A. niger*

4.9.1 Seleção da Fonte de Carbono Melhor Indutora da Atividade Amilásica

A. niger foi cultivado de forma estacionária, a 28 °C, por cinco dias, em meio líquido de Vogel, pH 6,5, suplementado com diferentes fontes de carbono 1% (m/v). Substratos puros (amido) e naturais (resíduos agrícolas e agroindústrias), disponíveis em larga escala e de baixo custo, foram utilizados a fim de se estabelecer o(s) substrato(s) mais eficiente(s) em induzir a atividade amilásica. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

4.9.2 Influência do Tempo de Cultivo Sobre a Produção de Amilases

A cinética de produção de amilases por *A. niger* foi avaliada de forma estacionária, a fim de verificar a influência do tempo de cultivo sobre este processo. Para tal, *A. niger* foi cultivado em meio líquido de Vogel, pH 6,5, suplementado com 1% de farinha de mandioca, por 3 a 8 dias, a 28 °C. O crescimento fúngico e a produção de amilases foram avaliados, respectivamente, por meio da dosagem de

proteínas intracelulares e pela determinação das atividades amilásicas extracelulares.

4.9.3 Influência da Temperatura e pH Sobre a Produção de Amilases por *A. niger*.

O efeito do pH sobre a produção de amilases foi verificado por meio do cultivo de *A. niger* em meio líquido de Vogel, contendo 1 % (m/v) de farinha de mandioca, por 5 dias, à 28 °C. Os meios de cultura tiveram seus pH ajustados entre 2,5 a 8,0, com variações de 0,5 unidades, pelo acréscimo de HCl (0,5 mol/L) ou de NaOH (0,5 mol/L). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Para o estabelecimento da temperatura mais apropriada para a produção de amilases, a respectiva linhagem foi cultivada nas melhores condições previamente estabelecidas e otimizadas (farinha de mandioca como fonte de carbono a 1% (m/v), 5 dias de crescimento, pH 4,5). Os cultivos foram realizados em temperaturas específicas de 15 °C a 35 °C, com intervalos de 5 °C.

4.10 HIDRÓLISE DO MATERIAL AMILÁCEO

4.10.1 Tratamento da Matéria-prima para Hidrólise Enzimática

Inicialmente, sete clones de batata-doce foram selecionadas para o processo hidrolítico. Estes clones foram provenientes do bando de Germoplasma da UNICENTRO, e do banco de Germoplasma da Unversidade Federal do Tocantins/ /UFT (UGA5 e UGA7). Todos os genótipos foram cultivados no Campus CEDETEG da UNICENTRO, Guarapuava-PR. A tabela 1 mostra os resultados obtidos, em função da produtividade e massa média de cada cultivar.

Tabela 1: Análise da produtividade e massa média de diferentes cultivares de batata-doce, na região de Guarapuava-PR.

<i>GENÓTIPO</i>	RAÍZES	
	PRODUTIVIDADE (t/ha)	MASSA MÉDIA (g)
UGA5 (Júlia – UFT)	62,01	360
UGA7 (Lívia – UFT)	56,70	440
UGA64 (Quedas do Iguaçu)	50,88	330
UGA82 (Pinhão)	30,45	400
UGA56 (Pinhão)	16,68	140
UGA48 (L. Do Sul)	41,50	690
UGA77 (Turvo)	48,61	410

Estes resultados foram obtidos a partir dos experimentos que fazem parte da Tese de Doutorado de Letícia K. Pinheiro Camargo, Doutoranda Agronomia/Produção Vegetal UFPR/PGAPV. Os clones selecionados passaram por um processo de secagem e moagem antes de serem submetidos à hidrólise enzimática (Figura 8).



Figura 8: Diferentes etapas do processamento da batata-doce, o qual antecedeu o processo de hidrólise enzimática. Batata-doce in natura (a); após ralagem (b); após secagem (c) e após processo de moagem (d).

Para o processo de secagem uma estufa digital com fluxo de ar contínuo foi utilizada, com temperatura constante de 60°C, por um período de 24 horas, segundo SAVIELLI et al. (1995).

Realizada as devidas secagens, os clones foram submetidos à moagem, obtendo-se uma farinha extremamente fina. Posteriormente, os clones foram devidamente identificados e armazenados para a sequência do trabalho.

4.10.2 Otimização do processo de hidrólise da cultivar UGA5 utilizando enzimas purificadas

A cultivar UGA5 foi previamente selecionada para a condução dos experimentos envolvendo a otimização do processo de hidrólise, visto que seus níveis de produtividade (t/ha) foram superiores aos apresentados pelos demais clones. Inicialmente, a evolução do processo enzimático foi avaliada, testando diferentes combinações entre as enzimas comerciais alfa-amilase de *Bacillus* sp. (Sigma-Aldrich) e amiloglicosidase de *A. niger* (Sigma-Aldrich). A temperatura de hidrólise e o pH selecionados foram de 60 °C e 5,6, respectivamente, visto que estes valores são próximos aos valores ótimos de atuação de ambas enzimas comerciais, segundo informações do fabricante. Em todos os ensaios, 1 g de amido foi incubado em tampão McIlvaine, acrescido de diferentes volumes de enzimas comerciais, de forma a totalizar um volume reacional de 20 mL.

O processo de hidrólise conduzido segue o fluxograma a seguir (Figura 9).

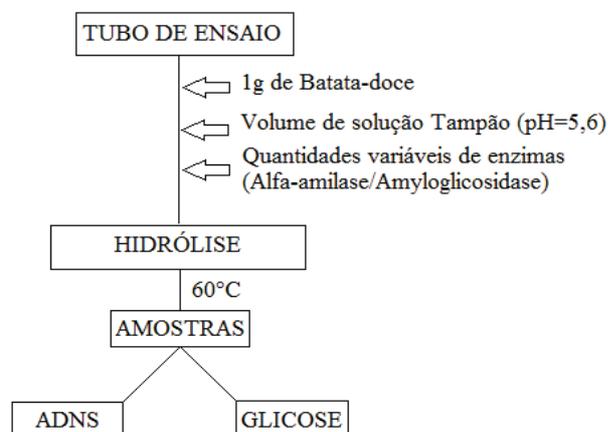


Figura 9: Fluxograma do processo hidrolítico via enzimas purificadas.

A tabela 2 apresenta as respectivas combinações de enzimas comerciais empregadas, para cada grama de amido da cultivar UGA5 hidrolizado, bem como seus volumes correspondentes.

Tabela 2: Combinações de enzimas comerciais utilizadas no processo de hidrólise do amido do cultivar UGA5.

α -Amilase	U/g de amido	Volume (μ L)	Amiloglicosidase	U/g de amido	Volume (μ L)
A	0,5	13	1	250	19
B	1,0	26	2	500	38
C	1,5	39	3	750	57
D	3,0	78	4	1500	114
E	6,0	156	5	2000	150

Diversas combinações de enzimas foram avaliadas, como, por exemplo, A1, A2, A3, A4 e A5. As mesmas sequências foram avaliadas em relação a B, C, D e E, sendo que todos os ensaios foram realizados em duplicata. Após duas horas de hidrólise, a quantificação dos açúcares redutores e de glicose liberados foi conduzida.

Após o estabelecimento da melhor combinação de enzimas comerciais a ser utilizada no processo, o tempo de hidrólise do material amiláceo foi avaliado. Para este fim, a hidrólise foi realizada utilizando-se a melhor combinação de enzimas comerciais previamente estabelecida, em pH 5,6, a 60 °C. Após os tempos de reação de 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos, amostras foram retiradas e a determinação de açúcares redutores e de glicose liberados conduzida. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se brancos apropriados.

4.10.3 Hidrólise dos Demais Cultivares Utilizando-se Enzimas Comerciais e Produzidas por *A. niger* Sob Condições Otimizadas.

Após a otimização de hidrólise da cultivar UGA5, foi realizado o processo de hidrólise dos demais clones de batata-doce selecionados. O mesmo foi realizado de acordo com a metodologia empregada nos processos anteriores, utilizando as melhores condições de hidrólise, previamente estabelecidas para o cultivar UGA5.

4.10.4 Otimização do Processo de Hidrólise da Cultivar UGA5 Utilizando Enzimas Produzidas por *A. niger*.

O processo de hidrólise do clone UGA5 pelas amilases produzidas pelo fungo *A. niger* também foi avaliado, no intuito de estabelecer os melhores rendimentos do processo. A figura 7 esquematiza o procedimento conduzido para a obtenção do hidrolisado do cultivar UGA5, variando-se o pH do meio reacional, a temperatura e o tempo de hidrólise do material amiláceo. Em todos os ensaios, 1 g de amido foi incubado em tampão McIlvaine, acrescido de um volume de solução enzimática equivalente a 10 U, de forma a totalizar um volume reacional de 30 mL. Após a condução de todos os ensaios, amostras foram realizadas e a quantificação de açúcares redutores e glicose liberados foi realizada como descrita anteriormente.

Fixando-se o tempo de reação em duas horas, a 50 °C, o efeito do pH do meio de reação sobre a hidrólise do cultivar UGA5 foi avaliado, empregando-se o tampão McIlvaine pHs 3,5 a 8,0, com variações de 0,5 unidades.

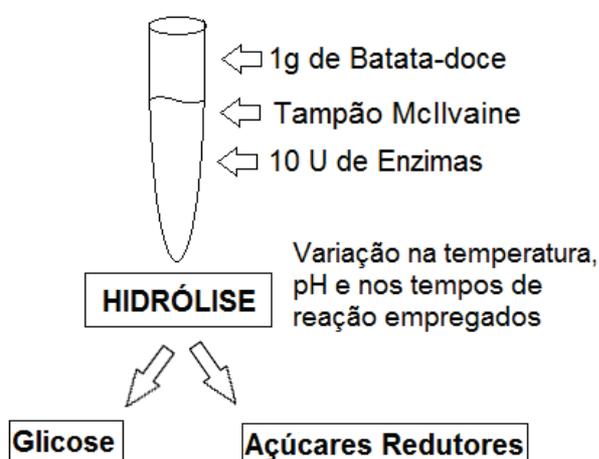


Figura 10: Fluxograma do processo de hidrólise da cultivar UGA 5 utilizando amilases produzidas por *A. niger*.

Após a determinação do pH reacional ótimo, foi observado o efeito da temperatura sobre a hidrólise da cultivar UGA5. Os ensaios foram realizados em pH

4,5 por duas horas, sob temperaturas de incubação entre 40 a 80°C, com variações de 5 °C.

O último parâmetro avaliado foi a cinética de hidrólise do material amiláceo. A partir das melhores condições de hidrólise determinadas nos ensaios anteriores (pH 4,5, 65 °C), o processo de hidrólise da cultivar UGA5 foi conduzido por 48 horas, sendo que amostras foram retiradas nos tempos correspondentes a de 2h, 6h, 12h, 24h e 48h de reação.

4.10.5 Hidrólise das Demais Cultivares Utilizando Enzimas Produzidas por *A. niger* Sob Condições Otimizadas.

Uma vez determinadas as condições ótimas de hidrólise da cultivar UGA5, o processo de hidrólise dos demais clones de batata-doce foi efetuado nas melhores condições previamente estabelecidas (pH 4,5, 65 °C, 6 h). Por meio dos resultados obtidos, foi possível identificar a partir de quais clones poderiam ser obtidos os melhores rendimentos, em termos de açúcares fermentescíveis liberados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *A. niger*

5.1.1 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono Sobre a Produção de Amilases

Ao analisar o efeito de diferentes substratos sobre a produção de amilases (Tabela 3), constata-se que a atividade amilásica variou significativamente em resposta à fonte de carbono utilizada no meio de cultura para o crescimento do micro-organismo. Níveis mais elevados de atividade amilásica foram observados em meios suplementados com farinha de mandioca (6,85 U/ml). Neste caso, a produtividade enzimática esteve correlacionada com o crescimento fúngico, uma vez que este substrato propiciou o melhor crescimento de *A. niger*, revelado pelo teor de proteínas intracelulares (1,15 mg proteína). Este substrato também proporcionou a

obtenção os maiores níveis de atividade específica, correspondendo a 428,12 U/mg.

Tabela 3: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de amilases por *A. niger*.

Fontes de Carbono (1%)	Atividade (U/ ml)	Proteínas Intracel. (mg)	Proteínas Extracel.	Atividade Esp. (U/mg)
Farinha de mandioca	6,85	1,15	0,016	428,12
Farinha de Batata-doce	4,88	0,98	0,014	348,6
Farinha de Milho	2,34	0,25	0,018	130,0
Amido	2,10	0,17	0,022	95,5
Bagaço de maçã	2,15	1,09	0,019	113,2
Farelo de trigo	1,32	0,40	0,057	23,2

Produtos como farinha ou fécula e resíduos como o bagaço tem sido frequentemente utilizados como substrato para a produção de enzimas e outros produtos biotecnológicos (RATTANACHOMSRI et al., 2009; SWAIN et al., 2009; OGBONNA et al., 2010; YUWA-AMORNPITAK, 2010). Cruz et al. (2011), avaliaram a produção de enzimas amilolíticas por *A. niger*, utilizando como substrato o farelo das cascas e entrecasas da mandioca. Silva e colaboradores (2005), ao avaliar a produção de amilases por *Rhizomucor pusillus*, verificaram que a farinha de mandioca demonstrou excelente capacidade em induzir a produção destas enzimas.

Nos estudos conduzidos por Spier (2005), bons níveis de produção de α -amilases e amiloglicosidases foram obtidos quando uma linhagem de *A. niger* foi cultivada na presença concomitante de fécula de mandioca e bagaço de cana de açúcar.

Entretanto, baixos níveis de produção de amilase e de biomassa em presença de farinha de mandioca foram observados por Oliveira et al. (2007), ao avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de amilases por espécies de *Rhizobium*. Segundo estes autores, isto pode ter ocorrido devido a presença de substâncias inibitórias presentes na farinha de mandioca, como anteriormente discutido por Wood (1965) e Haq et al. (2005).

Ray (2004) verificou que os níveis de produção de amilases por *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* crescidos em farelo de mandioca foram similares quando estes fungos foram cultivados na presença de amido solúvel, obtendo-se níveis de produção correspondentes a 3.25 U/ml and 3.8 U/ml, respectivamente. Segundo este mesmo autor, as fibras dos resíduos da mandioca apresentam um elevado teor de carboidratos e de nutrientes orgânicos, servindo como um substrato ideal para a produção de produtos de maior valor agregado como ácidos orgânicos (JYOTHI et al., 2005), etanol e enzimas, como amilases (RAY et al., 2008). Rattanachomsri et al. (2009) ainda afirmam que devido a sua natureza orgânica rica, baixo conteúdo de cinzas, combinado com a fácil hidrólise, baixo custo de cultivo e falta de competição com outros usos industriais, os derivados de mandioca são substratos ideais para a produção microbiana de produtos de valor agregado.

A síntese de amilases e o crescimento fúngico também foram favorecidos quando a farinha de batata-doce foi utilizada como substrato, correspondendo a 4,88 U/mL e 0,98 mg proteína, respectivamente. Bom crescimento fúngico também foi verificado na presença de bagaço de maçã (1,09 mg proteína). Porém, os níveis de produção enzimática não foram tão elevados na presença deste substrato, quando comparados as fontes acima citadas (2,15 U/mL). *A. niger* não foi capaz de se desenvolver bem na presença de amido, apresentando, entre os substratos avaliados, o mais baixo teor de proteínas intracelulares (0,17 mg proteína). Apesar do discreto desenvolvimento fúngico, níveis intermediários de produção amilásica foram verificados na presença desta fonte de carbono, correspondendo a 2,10 U/ml. O mesmo fato pôde ser verificado quando *A. niger* foi crescido na presença de

farinha de milho. Carvalho et al. (2008), ao avaliar o efeito de fontes de carbono sobre a produção de amilases por *Aspergillus tamarri*, verificaram que os menores índices de produtividade foram obtidos na presença do amido, quando comparados a outros substratos. Entretanto, maiores níveis de produção de amilases por *A. niger* JGI foram verificados em meios suplementados com amido e extrato de carne (VARALAKSHMI et al., 2009).

Os menores índices de produtividade foram obtidos quando o farelo de trigo foi utilizado como fonte de carbono (1,32 U/ml). Contrariamente, na maioria dos estudos, o farelo de trigo tem sido o substrato de escolha para a indução de amilases (VIJAYARAGHAVAN et al., 2011).

5.1.2 Cinética da Produção de Amilases por *A. niger*

O tempo de incubação para a produção máxima da enzima depende das taxas de crescimento microbiano e conseqüentemente da produção da enzima na cultura (BAYSAL et al., 2003; KUNAMNENI et al., 2005). A influência do tempo de cultivo sobre a produção de amilases por *A. niger* foi avaliada sob condições estacionárias, a 28°C, em meio líquido de Vogel, pH 6,5, contendo 1% (m/v) de farinha de mandioca, por um período de oito dias, sendo analisadas amostras a partir do 3° até o 8° dia de crescimento.

A produção máxima de enzimas amilásicas foi obtida no 5° dia de crescimento, com níveis de produção de 8,61 U/mL, sendo que neste dia também foram observados os maiores níveis de proteínas intracelulares (0,41 mg de proteínas), correspondendo ao maior crescimento fúngico observado (Tabela 4). A partir deste dia, observa-se que a cultura entrou em fase estacionária. Posteriormente, a partir do 7° dia de crescimento, a cultura entrou em fase de declínio ou morte celular, sendo esta revelada pelos baixos teores de proteínas intracelulares apresentados, com conseqüente diminuição dos níveis de produtividade enzimáticos.

Tabela 4. Cinética da produção de amilases por *A. niger*, em condição estacionária. O cultivo foi realizado em meio líquido de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), a 28°C e pH 6,5.

Tempo de cultivo (dias)	Atividade (U/ml)	Proteínas Intracel. (mg)	Proteínas Ext. (mg/ml)	Atividade Esp. (U/mg)
3	4,11	0,22	0,22	18,68
4	5,04	0,18	0,17	29,64
5	8,61	0,41	0,23	37,43
6	6,25	0,26	0,29	21,55
7	6,25	0,21	0,30	20,83
8	6,08	0,16	0,47	12,93

Os dados apresentados se assemelham aos descritos na literatura para *A. niger* e para outros fungos, nos quais a secreção amilases ocorreu na fase de crescimento logarítmico do micro-organismo (PAPAGIANNI e MOO-YUNG, 2002; STAMFORD et al., 2002; SONI et al., 2003; KAUR e SATYANARAYANA, 2004).

A obtenção de maiores valores de produção de amilases nos primeiros dias de cultivo pode ser decorrente do fato da concentração de amido da farinha de mandioca no meio estar em maior concentração no início do cultivo. De acordo com Cruz et al. (2011), valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares simples (WHITAKER, 1994). Todavia, o decréscimo na atividade da enzima observado em decorrência do aumento do tempo de incubação pode ser devido à produção de co-produtos resultante do metabolismo microbiano, além do esgotamento de nutrientes, os quais inibiram o crescimento fúngico e consequentemente a produção de enzimas (ALVA et al., 2007; SHAFIQUE et al., 2009). Ainda, segundo GANGADHARAN et al. (2006) os baixos níveis de atividade amilásica detectados após um considerável período de incubação podem ser devido à desnaturação da enzima em virtude de sua interação com outros constituintes do meio de cultura ou então devido a ação de proteases (RAMACHANDRAN et al., 2004).

Segundo diversos autores, a síntese de amilases por microorganismos, de modo geral, ocorre de duas maneiras, dependendo das condições do experimento e do micro-organismo utilizado. Na primeira, como observado neste caso, a síntese da

enzima acompanha o crescimento microbiano e diminui a velocidade de síntese à medida que a cultura entra em fase estacionária. Na segunda maneira, a secreção da enzima é lenta durante a fase logarítmica de crescimento, seguida de um aumento da velocidade de síntese na medida em que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária (GUPTA e SONI, 2003; ASGHER et al., 2007).

A maior produção de amilases por *B. theobromae* e *R. oryzae* crescidos em farelo de mandioca foi observada ao final da fase estacionária (RAY, 2004), enquanto que uma linhagem de *A. oryzae* atingiu os mais elevados níveis de produção de amilases após um período de incubação de 48 horas, em presença de bagaço de mandioca (PENGTHAMKEERATI et al., 2012). Nos estudos conduzidos por Pothiraj et al. (2006), *A. niger* e *A. terreus*, cultivados em resíduo de mandioca, apresentaram picos de atividade amilolítica no 6º dia de fermentação. Ao final de 10 dias de cultivo, as atividades amilásicas não foram detectadas.

Desta forma, o quinto dia de crescimento foi selecionado como o tempo de cultivo mais adequado para produção de amilases por *A. niger*, a fim de dar prosseguimento à avaliação da influência dos demais parâmetros fisiológicos sobre sua produção.

5.1.3 Efeito do pH de Cultivo Sobre a Produção de Amilases por *A. niger*

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de cultura desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no micro-organismo e também para a secreção enzimática. Segundo McMahon et al. (1999), a seleção do pH de cultivo apropriado é essencial para a produção de amilases.

A fim de verificar a influência do pH no crescimento fúngico, os meios de cultivo tiveram seus pHs iniciais corrigidos entre valores de 3,5 e 8,0, com intervalos de 0,5 unidades, sob condições ótimas determinadas anteriormente.

O fungo foi capaz de produzir amilases em todos os pHs testados (Tabela 5). Entretanto, maiores níveis de produção de amilases bem como maior crescimento fúngico foram observados quando o pH de cultivo foi ajustado em 5,0, obtendo-se 8,213 U/ml, e 1,361 mg proteína, respectivamente. Estes resultados indicam a natureza acidófila deste fungo e podem estar associado às melhores condições fisiológicas e nutricionais desta linhagem obtidas em meios de cultura ácidos.

Tabela 5. Efeito do pH inicial de cultivo sobre a produção de amilases por *A. niger*. O cultivo foi realizado em meio de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), a 28 °C, por cinco dias.

pH de cultivo	Atividade (U/ml)	Proteínas Intr. (mg)	Proteínas Ext. (mg/ml)	Atividade Esp. (U/mg)
3,5	0,168	0,916	0	0
4,0	2,675	0,618	0	0
4,5	8,176	0,841	0,024	340,7
5,0	8,213	1,361	0,059	139,2
5,5	7,407	1,255	0,061	121,4
6,0	6,932	0,691	0,023	301,4
6,5	5,237	0,397	0,050	104,7
7,0	3,240	0,384	0,028	115,7
7,5	3,217	0,463	0,014	229,8
8,0	1,055	0,417	0,045	23,4

Para outra linhagem do fungo *A. niger*, Spier *et al.* (2006) concluíram que o melhor pH para a produção de α -amilase e glicoamilase foi entre 4,0 e 6,0. Silva e Peralta (2000) obtiveram como 5,0 o valor adequado do pH de cultivo para a produção de amilases pelo fungo *A. fumigatus*. Ray (2004) verificou que a produção máxima de amilases por *B. theobromae* and *R. oryzae*, em presença de farelo de mandioca ocorreu quando os fungos foram crescidos a 30 °C e em pH 6,0, enquanto que a máxima produção de amilases por *A. oryzae* crescendo em bagaço de mandioca foi observada em pH 7,0 (PENGTHAMKEERATI, *et al.*, 2012).

Por meio da otimização da produção de amilases por *A. niger*, foram produzidas enzimas em grande quantidade visando o processo hidrolítico da batata-doce.

5.1.4 Efeito da Temperatura de Cultivo Sobre a Produção das Amilases

A temperatura é um dos parâmetros que determinam as taxas de produção dos microorganismos, podendo afetar significativamente o nível de amilases produzidas. Para o estudo da temperatura sobre a produção das amilases, conídios *A. niger* foram inoculados em meio de vogel suplementados com 1% de farinha de mandioca,

durante cinco dias, pH de 5,0, e crescido em temperaturas que variaram entre 25 a 35 °C, em intervalos de 5 °C.

Através da Tabela 5, verifica-se que as amilases foram produzidas em todas as temperaturas avaliadas. Níveis mais elevados de produção foram obtidos quando *A. niger* foi crescido a 30 °C, correspondendo a 10,5 U/ml. Esta mesma temperatura também foi capaz de propiciar o melhor desenvolvimento fúngico, verificado pelos maiores níveis de proteínas intracelulares observados (1,40 mg proteína), revelando o caráter mesofílico desta linhagem.

Nota-se, ainda, que a produtividade enzimática diminuiu consideravelmente em temperaturas superiores e inferiores a 30°C, correspondendo a 4,92 U/ml e 4,64 U/mL, a 25 °C e 35 °C, respectivamente. Segundo Hasan (2002), o crescimento microbiano é um processo exotérmico, sendo que este calor deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis para o bom desenvolvimento fúngico. Baixas temperaturas também podem comprometer o crescimento microbiano e, por conseqüência, a produção enzimática, uma vez que nessas condições o transporte de substratos por meio das células é reduzido, implicando em menores quantidades de produtos formados (AIBA et al., 1973).

Tabela 6. Efeito da temperatura sobre a produção de amilases por *A. niger*. O cultivo foi realizado em meio de Vogel com farinha de mandioca a 1% (m/v), pH 4,5 por cinco dias.

Temperatura (°C)	Atividade (U/ml)	Proteínas Intracel. (mg)	Proteínas Ext. (mg/ml)	Atividade Esp. (U/mg)
25	4,92	1,19	0,025	196,8
30	10,5	1,40	0,049	214,3
35	4,64	1,24	0,095	48,84

Similarmente a este estudo, PANDEY et. al. (2005), obtiveram maiores níveis de atividade amilásica, especificamente de α -amilases, quando uma linhagem de *A. niger* foi crescida a 30 °C. Rendimentos ótimos de α -amilases foram também obtidos por COSTA (1996), quando este fungo foi cultivado entre 30 °C a 35 °C. Corroborando com os resultados aqui apresentados, não existem relatos na

literatura evidenciando o bom desenvolvimento de *A. niger* em temperaturas inferiores a 25 °C.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA BATATA DOCE UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIAIS

5.2.1 Avaliação de Diferentes Combinações de Enzimas Comerciais Utilizadas no Processo de Hidrólise do Amido do Cultivar UGA5.

A hidrólise se dá por desdobramento total das moléculas de amido, que são transformadas primeiramente em dextrinas pela ação da α -amilase e finalmente em glicose por ação da amiloglicosidase (FRANCO et al. 2001). Nesta etapa, foram testadas quantidades variadas de α -amilase e amiloglicosidase, visando à obtenção de melhores rendimentos hidrolíticos sobre o cultivar UGA5, o qual apresentou maiores índices de produtividade.

As maiores quantidades de açúcares redutores liberados foram obtidas por meio das combinações D3 ($1,0 \pm 0,08$ g), D5 ($1,0 \pm 0,08$ g), E4 ($1,0 \pm 0,05$ g), C5 ($0,99 \pm 1,1$ g) e A3 ($0,96 \pm 0,02$ g) (Figura 11).

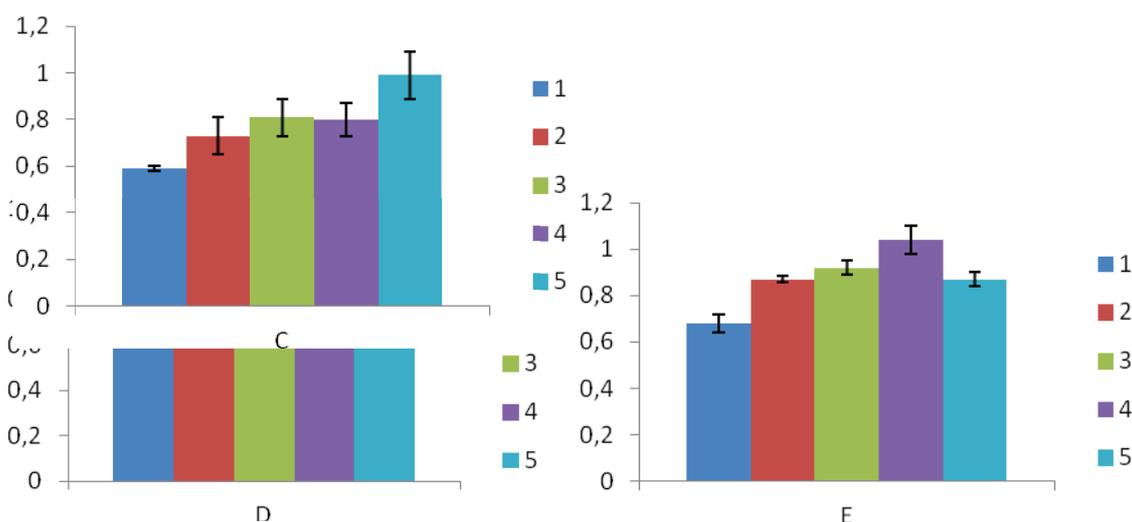
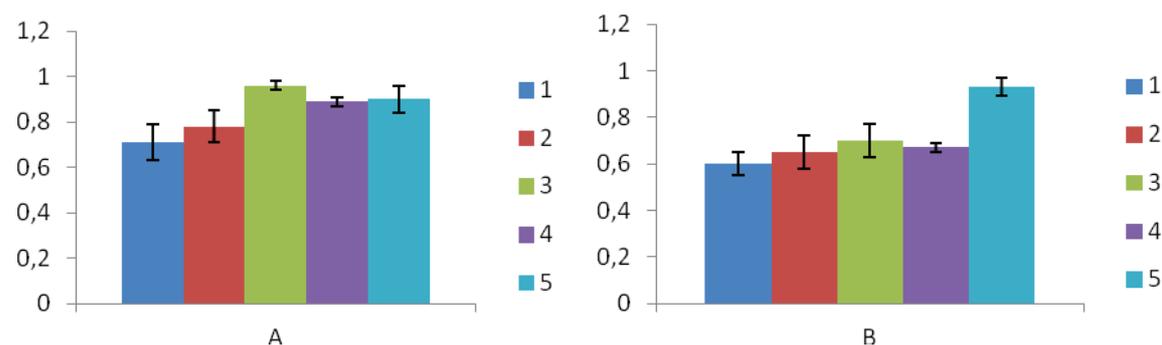


Figura 11: Efeito de diferentes combinações de alfa-amilase e amiloglicosidase comerciais na hidrólise do cultivar UGA5. O processo de hidrólise foi conduzido em pH 5,6, a 60 °C, por duas horas.

Devido ao elevado custo das enzimas e a pequena variação de açúcares redutores obtidos ao final do processo, a combinação A3 foi selecionada (0,5U/g amido de amiloglicosidase e 750 U/g amido de α -amilase), em virtude dos menores volumes de enzimas utilizados, conseqüentemente implicando em uma redução significativa de custos em escalas maiores.

O uso em conjunto das enzimas permitiu a obtenção de altas taxas de hidrólise do material amiláceo. Isso se deve a ação dextrinizante da α -amilase, que desdobra o amido em moléculas menores, de dextrina, enquanto a amiloglicosidase, hidrolisa as moléculas de dextrina e amido pelas extremidades não redutoras, liberando unidades de glicose. É importante ressaltar que esta enzima é a única capaz de hidrolisar ao mesmo tempo as ligações α -1,4 e α -1,6 das moléculas de amido em glicose (CARVALHO et al., 2001).

As melhores concentrações de enzimas estabelecidas para promover a hidrólise da batata doce por Yingling et al. (2011) foram 214 IU/g amido de α -amilase e 398 IU/g de amido da glucoamilase, obtendo-se uma taxa de hidrólise do amido ligeiramente inferiores as encontradas neste trabalho, equivalente a 92,5 %.

Ao empregar α -amilase e amiloglicosidase comerciais na hidrólise do amido de batata-doce, Souza (2005) estabeleceu que as quantidades de enzimas ótimas para a hidrólise deste polissacarídeo corresponderam a 12,71 U/g para α -amilase (Termamyl) e 101,1U/g para amiloglicosidase (AMG-300L), alcançando um rendimento de 122,76 g/L.) realizou a hidrólise do amido de batata-doce empregando as mesmas enzimas, porém os volumes de α -amilase e amiloglicosidase determinados como ideais foram de 2,54 e 101,1U/g amido respectivamente. Infere-se que estas diferenças observadas em relação as

combinações de enzimas estabelecidas como ótimas podem ser devido a natureza das diferentes cultivares analisadas. Cabe ressaltar aqui que as enzimas utilizadas pelos autores acima mencionados diferem das utilizadas neste trabalho e, portanto, estes dados não servem para fins comparativos. Estudos empregando as mesmas enzimas utilizadas neste trabalho para a hidrólise da batata doce são ausentes na literatura.

5.2.2 Estudo Cinético da Reação de Hidrólise Utilizando Enzimas Purificadas

Com o intuito de otimizar o processo, foi avaliada a influência do tempo sobre o processo de hidrólise do material amiláceo presente na cultivar UGA5. Para o ensaio, foi utilizada a combinação de enzimas correspondente a A3, como estabelecida anteriormente. O tempo de reação variou de 0 a 150 minutos. Tanto o teor de açúcares redutores, quanto a quantidade de glicose presentes na amostra foram determinados.

A hidrólise do amido em açúcares redutores foi diretamente proporcional ao tempo de reação (Figura 12). A presença de açúcares redutores desde o início do processo, sendo que seus níveis elevaram-se gradativamente, juntamente com os níveis de glicose, à medida que o tempo de atuação das enzimas aumentava. De acordo com Biliaderis (1991), as moléculas de amido no estado nativo possuem uma quantidade mínima de açúcares redutores, porém quando ocorre a quebra das cadeias pelas enzimas, acontece por sua vez à formação de um maior número correspondente de terminais redutores, ou seja, de açúcares redutores. Percebe-se ainda que, após 120 minutos de reação, o processo hidrolítico foi estabilizado, sendo os rendimentos observados de 0,96 g de açúcares redutores e 0,78 g de glicose, a partir de 1 g de amido.

O melhor tempo de hidrólise estabelecido nesse estudo foi similar aos determinados por outros trabalhos. Ao otimizar o processo de hidrólise do amido de batata doce empregando-se as enzimas α -amilase (Miles Taka-Therm L-170) e glucoamilase (Diazyme L-200), WALISZWESKI et al., (2007) obtiveram os maiores rendimentos após o período de duas horas e meia de hidrólise, enquanto que Yingling et al. (2011) obtiveram os maiores rendimentos após 117 minutos de

hidrólise. Zhonghai (2010) alcançaram os níveis maiores de açúcares fermentescíveis ao utilizar amilases comerciais durante 80 minutos, a 90 °C. Neste último estudo, os rendimentos obtidos corresponderam a 75,33%, nas condições ótimas estabelecidas.

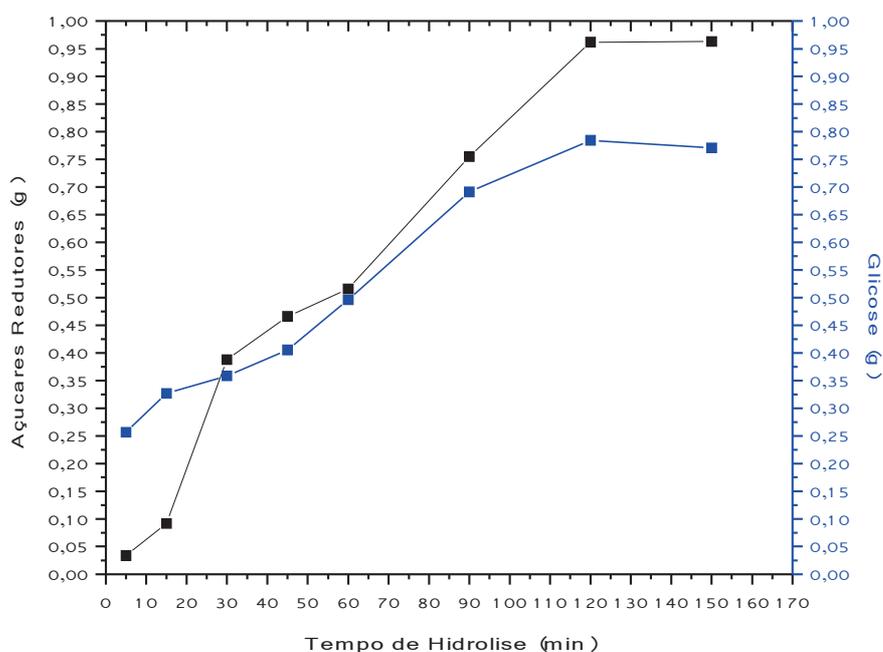


Figura 12: Otimização da cinética de hidrólise da cultivar UGA5 utilizando alfa-amilase e amiloglucosidase comerciais. O processo de hidrólise foi conduzido em pH 6,5, a 60 °C.

5.2.3 Hidrólise das Demais Cultivares Seleccionadas Via Enzimas Purificadas

A partir da otimização do processo de hidrólise via enzimas purificadas, o qual correspondeu à combinação A3 juntamente com tempo de reação de 120 minutos, realizou-se a hidrólise das demais cultivares seleccionadas, a fim de determinar a partir de quais clones seriam obtidos as maiores quantidades de açúcares fermentáveis, visando posteriormente a produção de etanol.

Por meio da Figura 13, verifica-se que os maiores níveis tanto de açúcares redutores quanto de glicose foram liberados a partir da cultivar UAG56, onde obteve-se 1,0 g de açúcares redutores e 0,89 g de glicose, a partir de 1,0 g de amido. No entanto, esta cultivar foi a que apresentou os valores de produtividade (t/ha^{-1}) mais

baixos (Tabela 1). Bons níveis de açúcares redutores também foram alcançados a partir dos cultivares UGA5 e UGA64, correspondendo a 0,96 g e 0,94 g, respectivamente. Após a cultivar UGA56, maiores níveis de glicose foram obtidos a partir da cultivar UGA7, equivalentes a 0,81 g.

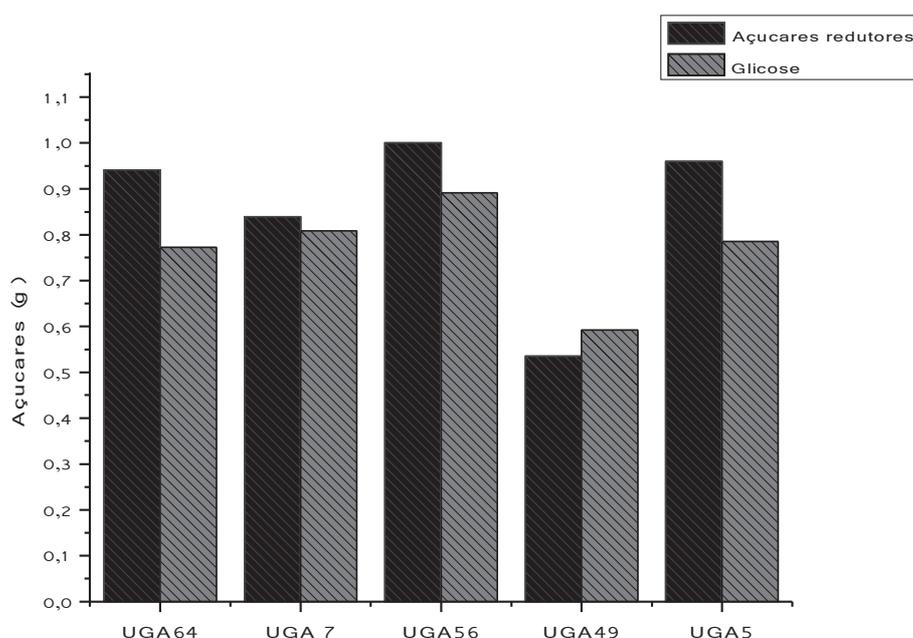
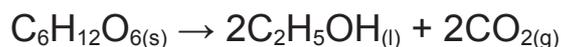


Figura 13: Hidrólise das cultivares selecionadas via α -amilase e amiloglicosidase comerciais. O processo foi conduzido em pH 6,5, a 60 °C, por 120 minutos.

Silveira et. al. (2007) explicam que a quantidade de açúcares gerados no processo hidrolítico é diretamente proporcional ao percentual de amido presente na batata-doce. Estes autores citam ainda que o percentual de amido depende do tempo de cultivo da amilácea. Quanto maior o tempo de cultivo, maiores são os níveis de amido gerados pela planta. Desta forma, infere-se que a cultivar 56 possuía inicialmente teores de amido mais elevados, quando comparados aos das demais cultivares.

A partir da quantificação da glicose presente em 1g de batata-doce hidrolisado, foi possível calcular teoricamente a quantidade de etanol gerado por meio da equação de Gay Lussac, que serve de referência para cálculos de eficiência.



Desta forma, a partir de 0,89 g de glicose, poderia se obter, estequiometricamente, 0,45 g de etanol ou 0,57 ml de etanol. Entretanto, apesar de todo rigor das condições de trabalho, ressalta-se que um decréscimo na quantidade etanol obtido ao final do processo é observado, devido aos erros experimentais envolvidos, tanto no processo hidrolítico quanto na fermentação, bem como por uma parte dos açúcares (em torno de 5%) ser destinada ao crescimento celular e a formação de subprodutos de fermentação, como glicerol, ácido succínico, etc. (MENEZES, 1980).

A estimativa de produção de etanol para as demais cultivares está apresentada na Tabela 7. Apesar de ter apresentado os maiores níveis de produtividade, níveis intermediários de rendimentos de açúcares redutores e, conseqüentemente, de etanol foram obtidos a partir da cultivar UGA5 (48).

Tabela 7: Estimativa de produção de etanol das cultivares hidrolisadas por enzimas comerciais via reação de fermentação de Gay Lussac.

Cultivar	Glicose (g)	Etanol (ml)
UGA64 (Quedas do Iguaçu)	0,77	0,50
UGA7 (Lívia – UFT)	0,80	0,52
UGA56 (Pinhão)	0,89	0,57
UGA49 (L. Do Sul)	0,59	0,38
UGA5 (Júlia – UFT)	0,78	0,51

5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA BATATA DOCE UTILIZANDO ENZIMAS PRODUZIDAS POR *A. niger*

5.3.1 Avaliação da Influência do pH de Reação Sobre a Hidrólise do Cultivar UGA5 Utilizando Amilases Produzidas por *A. niger*.

Com o objetivo de obter os melhores rendimentos de hidrólise utilizando enzimas produzidas por *A. niger*, a influência do pH reacional sobre a taxa de conversão de amido em açúcares fermentescíveis (açúcares redutores e glicose) foi

primeiramente avaliada. Para tal, o pH do meio reacional variou de 3,0 à 8,0, com variações de 0,5 unidades.

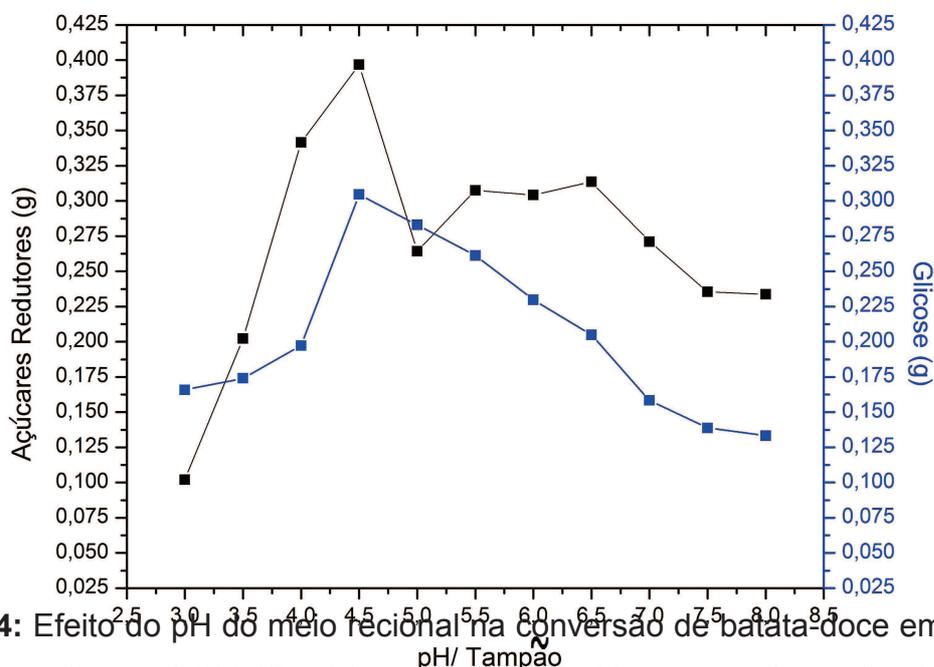


Figura 14: Efeito do pH do meio reacional na conversão de batata-doce em açúcares redutores e glicose. A hidrólise foi conduzida em diferentes valores de pH, a 50 °C, por duas horas, utilizando 10U/g amido.

A glicose pôde ser detectada como um dos produtos de hidrólise por meio do emprego do filtrado bruto de *A. niger*. (Figura 14) Lima et al. (2001) afirmam que não é possível a completa hidrólise do amido somente por α ou β -amilases, pois elas não conseguem quebrar ligações α -1,6 das amilopectinas, polímero de glicose semelhante à amilose, diferenciando desta por suas ramificações. Desta forma, infere-se que *A. niger* tenha produzido além de α e/ou β -amilases, outras enzimas capazes de promover a liberação de glicose, como por exemplo, as amiloglicosidases.

Ainda na Figura 14, observa-se que as enzimas produzidas por *A. niger* converteram com maior eficiência o amido da batata-doce em açúcares fermentescíveis em pHs ligeiramente ácidos, com maiores rendimentos obtidos em pH 4,5, onde os açúcares redutores e glicose corresponderam a 0,39 g e 0,30 g, respectivamente. Estes valores foram aproximados aos obtidos por Curvelo-Santana (2010), ao avaliar o processo de hidrólise do amido de mandioca utilizando amilases produzidos por *A. niger* em pH 4,8, onde os rendimentos alcançados foram de aproximadamente a 40%.

Verifica-se que com o aumento da basicidade do meio reacional, a quantidade de açúcares gerados decaiu gradativamente. Isso ocorre porque cada enzima possui pH ótimo de atuação. Segundo Crispim (2011), a α -amilase rompe as ligações α -1,4 das moléculas de amido com maior eficácia em pHs que variam de 4,5 a 9,2. Já as amiloglicosidasas quebram as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido em glicose em pHs de variam de 3,5 a 5,5.

5.3.2 Efeito da Temperatura Sobre a Taxa de Hidrólise da Cultivar UGA5 Via Enzimas Produzidas por *A. niger*

Para avaliar o efeito da temperatura sobre o processo de hidrólise da cultivar UGA5, foram realizados ensaios onde a temperatura do meio reacional variou de 40 °C a 90 °C, com variações de 5°C, em pH 4,5, por 2 horas. Por meio da Figura 15, observa-se que à medida que a temperatura reacional foi elevada, ocorreu um aumento significativo na quantidade de açúcares redutores fermentescíveis produzidos. Carvalho et al. (2008), ao examinarem o processo de hidrólise empregando amilases produzidas por *Bacillus* sp., constataram que a quantidade de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do amido de milho e de mandioca realizada a 70 °C foi em torno de 10 e 2 vezes maior, respectivamente, que quando realizada a 60 °C. De acordo com Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2004), o aumento da temperatura de hidrólise geralmente provoca uma maior produção de açúcares redutores. Este aumento pode ser devido à maior atividade da enzima a altas temperaturas ou ao intumescimento da região amorfa do grânulo de amido.

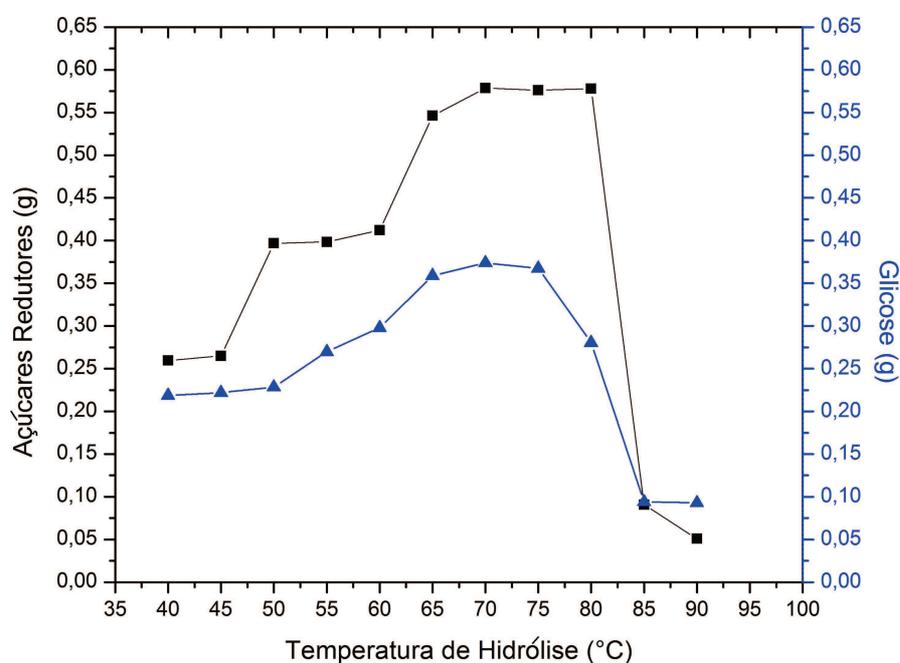


Figura 15: Efeito da temperatura no processo hidrolítico da batata-doce via enzimas produzidas por *A. niger*. A hidrólise foi conduzida em diferentes valores de temperatura, em pH 4,5, a 65 °C, por duas horas, utilizando 10 U/g amido.

Neste estudo, os maiores rendimentos foram observados entre 60 °C e 80 °C. Uma vez que a temperatura empregada está diretamente ligada aos custos do processo e que os rendimentos observados entre 60 °C a 80 °C foram similares, a temperatura de 65°C foi adotada a fim de dar sequência à determinação das melhores condições de hidrólise. Nesta temperatura, a quantidade de açúcares redutores e glicose liberados corresponderam a 0,54 g e 0,36 g, respectivamente.

As amilases produzidas por *A. niger* mostraram ser atuantes em temperaturas mais elevadas que as produzidas por outros microorganismos. De acordo com Quaglia (1991), a atividade das α -amilases fúngicas é reduzida para menos de 10% a 75 °C, fato este não observado neste estudo, visto que os níveis de açúcares redutores liberados, os quais refletem a atuação das enzimas, mantiveram-se praticamente constantes entre as temperaturas de 60 °C e 80 °C. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados, a fim de verificar a estabilidade destas enzimas em temperaturas elevadas.

A condução do processo de hidrólise da batata doce usando enzimas produzidas por *A. niger* torna-se particularmente interessante, uma vez que a elevada temperatura de sua atuação pode reduzir consideravelmente a viscosidade do meio, permitindo a hidrólise enzimática em misturas com altas concentrações de amido (VIELLE e ZEIKUS, 2001). Adicionalmente, a possibilidade de se aplicar estas enzimas sob temperaturas elevadas também diminui o risco de contaminação por microorganismos mesofílicos, que são a maioria na população à temperatura ambiente, além de aumentar a taxa de difusão, solubilidade e reduzir a tensão superficial dos componentes envolvidos no processo (NIEHAUS et al., 1999).

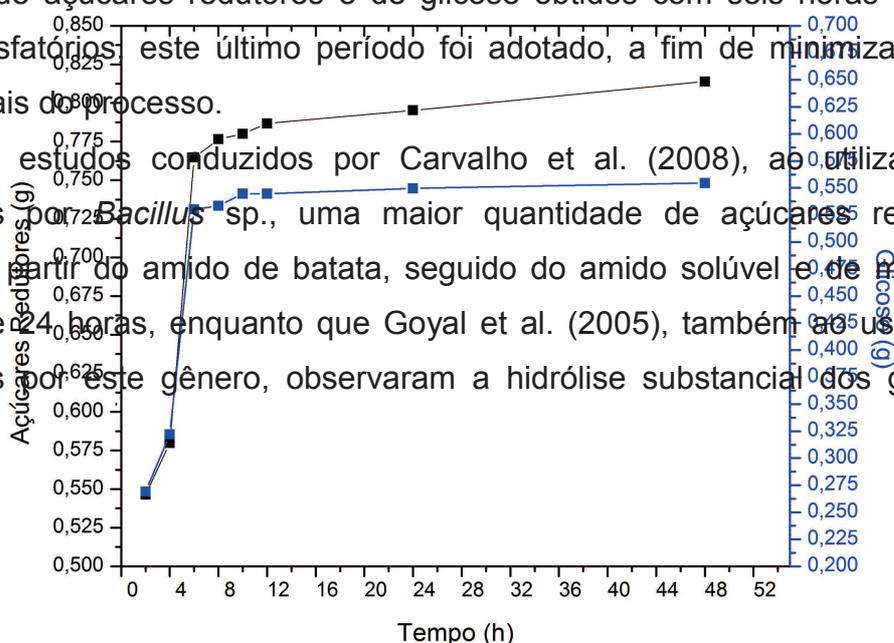
Verifica-se que os rendimentos obtidos por meio da aplicação de amilases de *A. niger* em temperaturas mais elevadas foram semelhantes ou superiores aos

obtidos em outros trabalhos, utilizando enzimas comerciais. Neves et al. (2006) observaram que o rendimento do processo de hidrólise do amido de trigo com amilases fúngicas comerciais foi 27,3%, quando empregou a temperatura de 55 °C e 14,8%, quando elevou a temperatura para 75 °C. Ferreira et al. (2005, 2006) alcançaram um rendimento próximo aos 30% para amido de mandioca por meio da aplicação de amilases a 65 °C. Segundo Konsula et al. (2004), a utilização do sobrenadante livre de células como fonte da enzima, ao invés da aplicação de enzimas purificadas, é altamente vantajosa, especialmente por diminuir o custo da hidrólise.

5.3.3 Influência do Tempo de Hidrólise da Batata-doce Com Enzimas Produzidas por *A. niger*

Finalizando o processo de otimização, avaliou-se a taxa de hidrólise em função do tempo reacional. Os ensaios foram conduzidos em pH 4,5, a 60 °C. Amostras foram retiradas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 horas de reação. A partir de figura 16, um aumento nos níveis de açúcares produzidos pode ser observado, com o aumento do tempo de hidrólise. Verifica-se ainda que o período de 48 horas proporcionou a obtenção das maiores taxas de hidrólise, correspondendo a 0,813 g de açúcares redutores e 0,54 g de glicose. No entanto, percebe-se que a partir de 6 horas de reação não ocorreram variações expressivas na quantidade de açúcares gerados, especialmente com relação a quantidade de glicose liberada (0,76 g de açúcares redutores e 0,53 g de glicose). Visto que o período de 48 horas é consideravelmente superior ao de 6 horas, e que níveis de obtenção de açúcares redutores e de glicose obtidos com seis horas de hidrólise foram satisfatórios, este último período foi adotado, a fim de minimizar os custos operacionais do processo.

Nos estudos conduzidos por Carvalho et al. (2008), ao utilizar amilases produzidas por *Bacillus* sp., uma maior quantidade de açúcares redutores foi liberada a partir do amido de batata, seguido do amido solúvel e de mandioca no período de 24 horas, enquanto que Goyal et al. (2005), também ao usar amilases produzidas por este gênero, observaram a hidrólise substancial dos grânulos de



amido a 70 °C após 3 e 5 horas, com 89% e 90% de conversão à glicose, respectivamente.

Figura 16: Influência do tempo sobre a hidrólise do cultivar UGA5 usando amilases produzidas por *A. niger*. A hidrólise foi conduzida em pH 4,5, a 65 °C, por diferentes períodos, utilizando 10U/g amido.

5.3.4 Hidrólise das Demais Cultivares Via Enzimas Produzidas por *A. niger*

A partir do estabelecimento das melhores condições de hidrólise da cultivar UGA5, as quais corresponderam a pH 4,5, temperatura de 65°C e tempo reacional de 6 horas, as demais cultivares foram submetidas à hidrólise pelas enzimas produzidas por *A. niger*. Na figura 17, o processo de hidrólise, bem como a análise de açúcares redutores e glicose conduzidos podem ser visualizados.

Os maiores níveis de açúcares foram obtidos por meio da hidrólise da cultivar UGA56 (Figura 18), de forma semelhante ao verificado quando a hidrólise foi realizada pelas enzimas purificadas (Figura 13). Elevados níveis também foram alcançados pela hidrólise da cultivar UGA5, a qual correspondeu a 0,76 g de açúcares redutores bem como 0,53 g de glicose. Contudo, a cultivar UAG49 apresentou os piores níveis de rendimento durante o processo hidrolítico, os quais também foram observados durante o emprego de enzimas purificadas.



(a)

(b)

(c)

Figura 17: (a) Hidrólise das cultivares em banho-Maria; (b) Determinação de açúcares redutores (método ADNS) e (c) Quantificação de glicose (Kit Glicose Método Enzimático).

Como já citado anteriormente, quanto mais amido na composição do material a ser hidrolisado, maior a quantidade de açúcares que podem ser gerados. Desta forma, a diferença observada na formação dos açúcares nas cultivares, provavelmente deve-se à diferença nos teores de amido presentes em cultivar avaliada. Ainda, segundo diversos autores, as diferenças observadas nas susceptibilidades enzimáticas dos diferentes clones podem ser atribuídas à interação de diversos fatores como o tamanho dos grânulos, a taxa de amilose e amilopectina e a cristalinidade (OATES, 1997; HOOVER e ZHOU, 2003; TESTER et al., 2004).

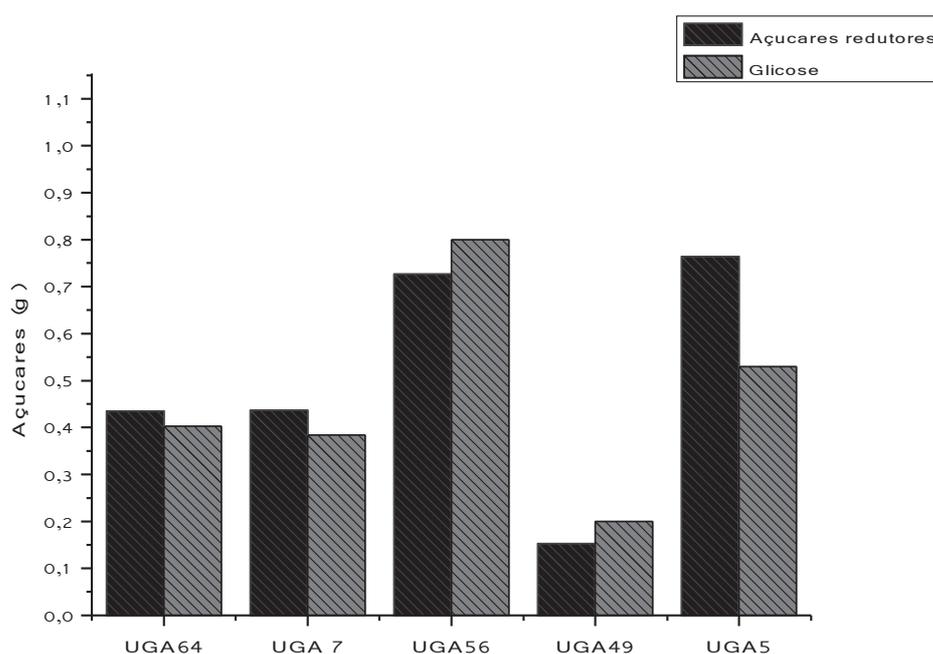


Figura 18: Sacarificação das cultivares selecionadas por amilases produzidas por *A. niger*. A hidrólise foi conduzida em pH 4,5, a 65 °C, por 6 horas, utilizando 10 U/g amido.

A partir dos níveis de glicose liberados, foi possível estimar a quantidade de álcool que seria gerado a partir da fermentação destes açúcares, a partir da equação de Gay Lussac (Tabela 8).

Seguindo a devida estequiometria da reação, a partir de 0,80 g de glicose obtidos a partir da hidrólise da cultivar UGA56 poderiam ser gerados 0,52 ml de etanol, valor muito semelhante ao obtido com as enzimas purificadas, o qual correspondeu a 0,57 ml. No entanto, ao comparar a Tabela 7 com a Tabela 8, verifica-se que as quantidades de etanol que poderiam ser geradas a partir das demais cultivares, por meio do emprego de enzimas produzidas por *A. niger*, são consideravelmente inferiores as quantidades que poderiam ser produzidas a partir do emprego de enzimas comerciais.

Tabela 8. Estimativa de produção de etanol das cultivares hidrolisadas por enzimas fungicas via reação de fermentação de Gay Lussac.

Cultivar	Glicose (g)	Etanol (ml)
UGA64 (Quedas do Iguaçu)	0,40	0,26
UGA7 (Lívia – UFT)	0,38	0,25
UGA56 (Pinhão)	0,80	0,52
UGA49 (L. Do Sul)	0,22	0,14
UGA5 (Júlia – UFT)	0,53	0,34

Por meio dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o fungo *A. niger* produziu as amilases necessárias para a total hidrólise do amido presente na batata doce. Uma vez que os custos de produção de uma enzima dependem de diversos fatores, como a quantidade e o processo de produção e recuperação, assim como o estado de pureza em que esta é vendida, a aplicação direta do filtrado de cultura de *A. niger*, sem necessidade da purificação de enzimas, pode ser uma opção economicamente viável no processo de hidrólise da batata-doce. Adicionalmente, devido ao fato de *A. niger* apresentar bons níveis de produção de amilases, em presença da farinha de mandioca, um substrato em abundância e barato no Brasil,

estes custos podem ser substancialmente reduzidos. Desta forma, a utilização de amilases produzidas por *A. niger* em substituição as enzimas comerciais mostra-se como uma excelente alternativa, a fim de tornar o processo de hidrólise da batata doce economicamente mais competitivo.

6. CONCLUSÕES

A eficiente produção de enzimas amilásicas depende da escolha do substrato, bem como da determinação das melhores condições de cultivo do fungo. Por meio de sua otimização, os níveis de amilases produzidas por *A. niger* foram aumentados. Em cultivo estacionário, a fonte de carbono que melhor induziu a síntese e liberação destas enzimas foi a farinha de mandioca. Maiores níveis de atividade amilásica foram obtidos quando *A. niger* foi cultivado por cinco dias, em pH 5,0, a 30 °C.

Em relação à otimização do processo de hidrólise da batata-doce utilizando enzimas comerciais, os melhores rendimentos em termos de açúcares redutores foram obtidos por meio da associação de amiloglicosidase e α -amilase purificadas, nas concentrações de 0,5 U/g amido e 750 U/g amido, respectivamente, por 120 minutos. Ao se empregar as enzimas produzidas por *A. niger*, as melhores condições de hidrólise estabelecidas para este mesmo cultivar foram seis horas de reação, temperatura de 65 °C e pH 4,5.

A conversão de amido de batata-doce em açúcares fermentáveis foi mais eficiente quando amilases purificadas foram empregadas. No entanto, obteve-se resultados satisfatórios quando utilizou-se as enzimas produzidas por *A. niger*. Desta maneira, as enzimas obtidas a partir do cultivo de *A. niger* apresentaram-se promissoras no processo de sacarificação ou de hidrólise da batata-doce, uma vez que a utilização direta do filtrado bruto, bem como a utilização de um substrato de baixo custo em sua produção podem reduzir, substancialmente, os custos operacionais do processo.

Adicionalmente, verificou-se que a quantidade de açúcares fermentáveis gerados na hidrólise depende do tipo de cultivar envolvido. A cultivar UGA5 apresentou-se como a mais promissora para a produção de etanol, por apresentar maior produtividade e elevados índices de sacarificação quando enzimas comerciais e fúngicas foram empregadas.

Por fim, baseado nos resultados teóricos referentes a produção de etanol a partir de batata-doce, pode-se concluir que esta amilácea apresenta-se como promissora fonte de etanol, a qual pode contribuir para sua produtividade especialmente no Sul do Brasil, devido a sua fácil adaptação ao clima, rusticidade, além dos possíveis co-produtos que podem vir a ser gerados a partir dela.

8. REFERÊNCIAS

ABE, J.; BERGMANN, F. W.; OBATA, K.; HIZUKURI, S. Production of the raw-starch amylase of *Aspergillus k-27*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 447-450, 1988.

ABRAHÃO N. J. Algumas aplicações de enzimas. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Org.). **Biotecnologia industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano**. Consulta Pública nº 93, de 21 de dezembro de 2005. D.O.U de 22/12/2005.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**. Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 18, p. 57-70, 2000.

AIBA, S. A. E. HUMPHREY, N.F.; MILLIS, F. **Biochemical Engineering**. 2nd ed. Academic Press, New York. 1973.

AJAYI, A. O.; FAGADE, O. E. Utilization of corn starch as substrate for α -amylase by *Bacillus* spp. **Afr. J. Biomed. Res.** 2003.

ALTINTAS M. M.; ÜLGEN K. Ö.; KIRDAR B.; ÖNSAN Z. I.; OLIVER S. G. **Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.640-647, 2002.

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI P.; SHRUTI, M. *et al.* Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **Afr J Biotechnol** 2007; 576-81.

ASGHER, M. et al. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 9, p. 950-955, 2007.

ARAÚJO, N. Q. de et. al. **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol**. (S.L), 1978. 11p.

BAYSAL, Z.; UYAR, F.; AYTEKIN, C. Solid-state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water. **Process Biochemistry**, 38, 1665-1668. 2003.

BILIADERIS, C.G. **The structure and interactions of starch with food**. **Can. Physiol. Pharmacol.**, v. 69, p. 60-78, 1991.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. **Anal. Biochem.** v. 72, p 248-254. 1976.

BRAUN, S., LIFSHITZ, S. E. V. Mycelial morphology and metabolite production. **TibTech**, 8, 63-68. 1991.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R.; ALVES, H. S. Mercado de raízes e tubérculos: análise de preços. **Informações Econômicas**, v. 31, n. 2, p. 36-44, 2001.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa: Polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, n. 20, p. 32-41. 2006.

CARVALHO, J. C. M. SATO, S. **Fermentação Descontínua**. Biotecnologia

Industrial: Engenharia Bioquímica, Ed Edgard Blucher, 1° ed. v.2 cap. 9 p. 193-204, 2001.

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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(2): 380-386, abr.-jun. 2008.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA J.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, 239-247, 2000.

CEREDA, M. P. Potencial das tuberosas americanas. Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do Ceará. 2001. **Venda Nova do Imigrante**. Anais. Espírito Santo. 2001.

CHANG, H. T.; OLLIS, D. F. Extracellular microbial polysaccharides: generalized power law for biopolysaccharides solutions. **Biotechnol. Bioeng.**, XXIV, p.2309-2318, 1982.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia Lipolytica* 681. **Bioresource Technology**. V.70. p. 173-180. 1999.

CORNELIS, P. **Microbial amylases**. *Microbiol. Scienc*, p.342-343. 1987.

COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. 203 f. Tesen(Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

CRISPIM, J. E. **Roteiro para produção de destilados a partir de matérias primas amiláceas como arroz, trigo, cevada, batata-doce, batatinha, mandioca e milho**.

2011.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. V.; 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 Cient Ciênc Biol Saúde 2011.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, v.30, n.3, p.613-617, 2010.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, London, 1995.

ELLIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 615-620, 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultura da batata doce**. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares/bat-doce.htm>. Acesso em: 15 de Fevereiro 2011.

ESPOSITO, E. J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Ed. Educs, 2004.

FADEL, M. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Aspergillus niger* F-909 under solid state fermentation. **Egyptian J. Microbiol.** 35: 487-505. 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; NETO, V. B.; COURI, S. **Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida**. Boletim de pesquisa e

desenvolvimento 22 – EMBRAPA. 2008. p.17.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado).

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

FELTRAN; J. C.; VALLE; T. L. **Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam): Matéria-prima alternativa para a produção de etanol.** 2009.

FERREIRA, G. B. et al. **Characterizing of obtaining process of a manioc spirit.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES Y LEVADURAS, 5, 2005.

FERREIRA, G. B. et al. Produção de álcool a partir da hidrólise do amido de mandioca por amilases do malte de milho. **Revista SODEBRAS**, 2006.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F.; TAVARES, D. Q. The structure of waxy cornstarch: effect of granule size. **Starch/Stärke**, v. 50, n. 5, p. 193-198, 1998.

FRANCO, C. M. L.; et al. Propriedades do Amido, In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido.** Campinas: Fundação Cargill, 2001. v.1. 221p.

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. **Food Technology and Biotechnology**, 44, p. 269-274. 2006.

GARCIA, A. C. D. B.; LEONEL, M. **Análises microscópicas de grânulos de amido de mandioca, batata doce, biri e tioba.** IN: Reunião científica em ciências agrárias

do legado, 9, Botucatu, 2002. Anais. Botucatu: Uenesp, 2002. P. 21-25.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.

GHOSH, S. B.; CHANDRA, A. K. Nutritional requirements and cultural characteristics of *Bacillus* sp. CBML-153 for the production of thermostable alpha amylase. **Zbl. Mikrobiol.**, v. 139, p. 293-304, 1984.

GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.49, p.168-174, 1998.

GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J., SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GIRARD; F.; FALLOT, A. Review of existing and emerging technologies for the production of biofuels in developing countries. **Energy for sustainable development**, v 10. p. 92-108. 2006.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas.** 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2006.

GOYAL, N.; GUPTA, J. K.; SONI, S. K. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme Microbial Technology**, v. 37, n. 7, p. 723-734, 2005.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology.** John Willey & Sons Incorporation, 1994. 458 p.

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1-18, 2003.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 35, p. 373-403, 1995.

HAQ, I.; ASHRAF, H.; OMAR, S.; QADEER, M.A. Biosynthesis of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* Using Wheat Bran as Substrate. **Pak. J. Biol. Sci.** 2002.

HAQ, I.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; JAVED, I. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. **Biores.Technol.**, 96, 1201-1204. 2005.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica.** In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HASAN, S. D. M. **Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz.** Rio Grande: Engenharia de Alimentos, Universidade Rio Grande, 1998. Dissertação (Mestrado).

HASAN, S. D. M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium)* monóceras obtida por fermentação em estado sólido.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: what have we learned. **Biotechnol. Prog.**, v.14, p.3-7, 1998.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes - 2006.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2006/pam2006.pdf>> Acesso em: 10/02/20012.

IWASHITA K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 530–535, 2002

JACQUES, K.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. **The alcohol textbook**. 3. ed. Nottingham: Nottingham Press, 1999. 386p.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

JYOTHI, A. N.; SASIKIRAN, K.; NAMBISAN, B.; BALAGOPALAN, C. Optimization of glutamic acid production from starch factory residue using *Brevibacterium divaricatum*. **Process Biochemistry**, 40, 3576-3579. 2005.

LACHMUND, A.; URMANN, U.; MINOL, K.; WIRSEL, S.; RUTTKOWSKI, E., Regulation of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. **Current Microbiology**, 26, 47-51. 1993.

LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. **Química de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1986. 98p.

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, E. Y. C.; WHELAN, W. J. **Glycogen and starch debranching enzymes**. In *The Enzymes*, vol. V, 3rd edn, pp. 192-234. Edited by H. W. Boyer. London: Academic Press. 1971.

LEONEL, M. CEREDA, M. P. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. **Cienc. Technol. Aliment.** V. 36, p. 3-35, 2000.

LEONEL, M.; GARCIA, A. C. D. B.; REIS, M. M. Caracterização físico-química emicroscópica de amidos de batata-doce, biri, mandioca e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. **Brazilian Journal of FoodTechnology**, v. 7, n. 2, p. 129-137. 2004.

LIMA, S. L.; ZERO, V. M. **Manejo e produtividade da cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas*) no município de Presidente Prudente-SP**. Dpto de Recursos Naturais, FCA/UNESP – Presidente Pudente/SP. 2005.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de etanol**. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos v. 3, SP. Ed. Edgard Blucher, 1° Ed., cap 1: 1-43, 2001.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbial Technology**: 7, 258-265, 1985.

MACCHERONI JUNIOR, W. *et al.* Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 298-302, 2004.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

McINTYRE, M., McNEIL, B. Morphogenic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p.291-298, 1998.

McWINNEY, P.H.; KIBBLER, C.C.; HAMON, M.D.; SMITH, O.P. GANDHI, L.; BERGER, L.A.; WALESBY, L.K.; HOFFBRAND, A.V.; PRENTICE, H.G. Progress in the diagnosis and management of aspergilosis in bone marrow transplantation: 13 years's experience. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 17, p. 397-404, 1993.

McMAHON, H.E.M., KELLY, C.T., & FORGARTY, W.M. High maltose-producing amyolytic system of a *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters**, 21, 23–26. 1999.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda., p.141-178. 1980.

METZ, B., KOSSEN, N.W.F. The growth of molds in the form of pellets – a literature review. **Biotechnol bioeng.**, 14, 781-799. 1977.

METZ, B., KOSSEN, N. W. F., van SUIJDAN, J. C. The rheology of moulds suspension. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 11, p.103-156, 1979.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 11, 426-428, 1959.

MINAFRA, C. B. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM203 na dieta de frangos de corte de 21 anos de idade**. 2007. 124. Tese (Doctor Scientiae). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

MIRANDA, J. E. E. **Cultivo de batata-doce (*Ipoema batatas* (L.) Lam.)**. Brasília, DF: Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças, 1995. 18 p. (Instrução técnica, 7).

MITCHELL, D. A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A. **Produção de enzimas em fermentação em estado sólido e a sua recuperação.** In: III Curso Fermentação Semi-sólida na obtenção de bioprodutos (cd), Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, S.P., 2002

MODA, E. M.; HORRI, J.; SPOTO, M. H. F. Edible mushroom *Pleurotus sajor caju* production on washed and supplemented sugar cane bagasse. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 127-132, 2005.

NEVES, M. A. et al. Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 481-490, 2006.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extramophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 711-729, 1999.

OATES, C.G. Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.375-382, 1997.

OGBONI, C. N.; OKOLI, E. C. Conversion of cassava flour to fuel ethanol by sequential solid state and submerged cultures. **Process Biochem.** 2010.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS J. **Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates.** *Braz. J. Microbiol.* v. 38, n.2. 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C, Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 61-66. 2007.

PANACKAL, A. A.; IMHOF, A.; HANLEY, E. W.; MARR, K. A. *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p. 403-408, 2006.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**. 2000.

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation Biochemical. **Engineering Journal**. v.36, p.1-4, 2002.

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

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.

PENGTHAMKEERATI, P.; NUMSOMBOON, S.; SATAPANAJARU, T.; CHAIRATTANAMANOKORN, P. Production of α -Amylase by *Aspergillus oryzae* from Cassava Bagasse and Wastewater Sludge Under Solid-State Fermentation. **Environmental Progress & Sustainable Energy** (Vol.31, No.1), p. 122-129, 2012.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 6, p. 505-513, dez, 2006

PETRUCIOLI, M., FENICE, M. PICCIONI, P., FEDERICI, F. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by

Penicillium variable (P16) in benchtop bioreactor. **Enz. Microbiol. Technol.**,v.17, p.336-339, 1995.

POTHIRAJ, C.; BALAJI, P.; EYINI M.; Raw starch degrading amylase production by various fungal cultures grown on cassava waste. **Mycobiol.** 34: 128-130. 2006.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PRIOR, B.A., PREEZ, J.C.D., REIN, P.W. **Environmental Parameters.** In: ed: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E. Solid Substrate Cultivation. Elsevier Applied Science, London. p. 65-85, 1992.

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnologia de la panificación.** Editora Acribia, Zaragoza, 1991. 485 p.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca.** 2002. 184f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002

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 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RAJOKA, M. I.; YASMIN, A.; LATIF, F. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Appl. Microbiol.** V. 39, p. 13-18, 2004.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut oil cake – a potential raw material for the production of α - amylase. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 169–174, 2004.

RAMESH, B.; REDDY, P.R.M.; SEENAYYA, G.; REDDY, G.. Effect of various flours on the production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. **Biores. Technol.**, 76, 169-171. 2001.

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*. **J Biosci Bioeng.** 2009.

RAY, R. C. Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. **J. Environ. Biol.**, 25: 489-495. 2004.

RAY, R. C. MOHAPATRA, S.; PANDA, S. KAR, S. Solid substrate fermentation of cassava fibrous residue for production of α - amylase, lactic acid and ethanol. **Journal of Environmental Biology**, 29p., 111-115. 2008.

ROBERTSON, G. H.; *et al.* **Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 2, p. 353-365, jan, 2006.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SAKANO, Y., HIRAIWA, S. & FUKUSHIMA, J. Enzymatic properties and action patterns of *Thermoplasma volcanium* α -amylase. **Agricultural and Biological Chemistry**. 1982

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v. 33, p. 835-842, 2003.

SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K.; KRISHNALAH, M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v.27, p.97-107, 1992.

SAVIELLI, R. A.; PADUA, T.S.; DOBRZYCKI, J.H.; CAL-VIDAL, J. Análise textuométricas e microestruturais de pães franceses, contendo farinha de batata-doce. **Pesq. agropec. brás.**, Brasília, v.30, n.3, mar. 1995. P: 395-400.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial** – vol.2. São Paulo. Edgard Blücher LTDA, 2001.

SEDMAK, J. J.; GROSSEBERG, S.E. A rapid sensitive and versalite assay for protein using Coomassie Brilliant G250. **Anal. Biochem.** v. 79. p. 544-552.1977.

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.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pak J Bot.** 2009.

SILVA, C. M.; CARREIRO, S. C. Avaliação da atividade enzimática de leveduras isoladas de polpas de frutas e substratos vegetais. In: Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia de Alimentos, 11, 2007, Salvador. **Anais do ENEEALI.** Salvador. 2007.

SILVA, D. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas, São José do Rio Preto**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE) UNESP, Universidade Estadual Paulista. 2003. 198p.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. **Cultura de batata doce**. In: CEREDA, M. P. (Coord.). Agricultura: tuberosas amiláceas latino Americano. São Paulo: Fundação Cargill, v. 2, cap. 22 p. 448-504, 2002.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C.A.; MIRANDA, J. E. C. **Batata Doce: Instruções técnicas do CNPHortaliças**, EMBRAPA/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 3 ed, 1995, 18 p.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E. M.; ASQUEIRI, E.R. **Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais de mel**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. V.23. n°3. Campinas-SP. Setembro 2003.

SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A.F.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of sacharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. The **Journal of Microbiology Korea**, v. 43, p. 561-568, 2005.

SILVA, W. B. DA.; PERALTA, R. M. Caracterização bioquímica de uma enzima extracelular de um fungo termo tolerante. *Revista Publicatio*, 6: 7-19. 2000.

SILVEIRA; M. A. Álcool Combustível - Série Indústria em Perspectiva. **Batata-doce: Uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol**. v. 1. p. 109-122. Brasília 2008.

SILVEIRA M. A.; ANDRÉ C. M.; ALVIM T. C.; DIAS L. E; TAVARES I. B; SANTANA W. R.; SOUZA F. R. **A cultura da batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol**. Palmas:UFT, 45 p. 2007.

SILVEIRA, M. A. **Batata-Doce: A Bionergia da Agricultura Familiar**. 2008 19p.

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., 2005. p. 221-230.

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

SOUZA; A. F. C. **Avaliação do processo de hidrólise de biomassa de batata doce (*Ipomoea batatas (L) Lam*) por meio de células imobilizadas para produção de etanol**. Palmas – TO, 2005.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos. Curitiba 2005.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.; SOCCOL, C. R. 2006. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. **Int. J. Food Eng.**, 2: 6-1-19.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p.105-109, 2002.

SWAIN M. R.; KAR, S.; RAY R. C. Exo-polygalacturonase production by *Bacillus subtilis* CM5 in solid state fermentation using cassava bagasse. **Braz J Microbiol** 2009; 40:636-48.

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.

TUNGA, R.; TUNGA, B.S. Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae*

Under Solid State Fermentation. **International Center for Biotechnology. Japan:** Osaka University, 2003. 12p.

UEDA, S.; OHBA, R.; KANO, S. Fractionation of the glucoamylase system from blach-koji mold and the effects of adding isoamylase and alpha-amylase on amylolysis by the glucoamylase. **Stärke**, v. 26, n. 11, p. 374-378, 1974.

UNDERKLOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of microbial enzymes and their applications. **Appl Microbiol.** v. 6, p. 212-221, 1958.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p.137 – 155, 2002.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS H, DIJKHUIZEN L. Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family. **J. Biotechnol.** p. 137-155. 2002.

VARALAKSHMI, K.N.; KUMUDINI, B.S.; NANDINI, B.N.; SOLOMON, J.; SUHAS, R.; MAHESH, B.; KAVITHA, A.P. Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI24 isolated in Bangalore. **Pol. J. Microbiol.**, v. 58, p. 29-36, 2009.

VARGA, J.; JUHÁSZ, A.; KEVEI, F.; KOZAKIEVICZ, Z. Molecular diversity of agricultural important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 627-640, 2004.

VIEILLE, C. e ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic Enzyme: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol 65, p. 1-43, 2001.

VIJAYARAGHAVAN, P.; DEVI, V.S.L.; VINCENT, S.G.P. Bio-Processing of Banana Peel for Amylase Production By *Penicillium* sp. **Asian j. Exp. Biol. Sci. Vol 2. 2011.**

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1-11, 2002.

VITAL, N. Batatálcool. **Revista Dinheiro Rural**, n. 38, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/revistadinheirorural/edicoes/38/artigo73088-1.htm>>. Acesso em 17 dez 2011.

ZHONGHAI, L.; JIANJUN, L.; HAIYAN, Z.; HAIBO, L.; YUNLI, S. Optimization of Enzyme Hydrolysis Conditions of Sweet Potato Starch by Response Surface Methodology. **Journal of the Chinese cereals and oils association**. V. 10, 2009.

ZHOU, W., HOLZHAUER-RIEGER, K., DORS, M., SCHÜGERL, K. Influence of dissolved oxygen on the biosynthesis of cephalosporin. **Curr. Enz. Microb. Tech.**, v.14, p. 848-854, 1992.

ZIMMER, K, et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137. 2009.

YINGLING, B.; LI, C.; HONGLIN, W.; XIWEN Y.; ZONGCHENG, Y. Multi-objective optimization of bioethanol production during cold enzyme starch hydrolysis in very high gravity cassava mash. **Bioresource Technology Volume: 102, Issue: 17, P: 8077-8084. 2011.**

YUWA-AMORNPITAK, T. Ethanol production from cassava starch by selected fungi from tn-koji and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology** 2010.

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

WALISZWESKI, K.N.; ALVARADO, M.G.; MEDINA, J.C. **International Journal of Food Science & Technology**. Volume 27, Issue 4, Article first published online: 1 JUL 2007.

WANG, B. D.; D. C.; CHEN T. T. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with oversecretion phenotype. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2001.

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

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food Sciences**. New York: Marcel Dekker; 1994.

WOOD, T. The cyanogenic glucosides content of cassavaproducts. **J. Science Food Agric.**1965.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities and functions**. University of Groningen, 2007. Dissertação (mestrado).

KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Production and starch saccharification by a thermostable and neutral glucoamylase of a thermophilic mould *Thermomucor indicae-seudaticae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.419-425, 2004.

KHANAHMADI, M.; MITCHEL, D. A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SÁNCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation affected by substrate flow pattern. **Chem. Eng. Science**, v.61, i.8, p.2675-2687, 2006.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphys. **New Soth Vales: North Ryde**, 1988. 116 p.

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 1745-1749, 2004.

KUMAR, R. K.; VENKATESH, S. K.; KUMAR, U. S. Evidence that cleavage of the precursor enzyme by autocatalysis caused secretion of multiple amylases by *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 557, p. 239-242, 2004.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.2, p.168-171, 2005.