UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

# Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido

CHRISTIANE PEREIRA ROCHA

Orientadores: Prof[a]. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho

UBERLÂNDIA
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

# Otimização da Produção de Enzimas por A*spergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido

**Christiane Pereira Rocha**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.**

**UBERLÂNDIA**
**2010**

**A um ser superior, Deus, que nos conduz passo a passo com sabedoria e que me deu coragem para enfrentar tantas barreiras e estar aqui hoje apresentando este trabalho.**
**Aos meus pais e irmãos pelo carinho e amor que muito contribuíram na minha formação, por todo incentivo que sempre me deram e pela confiança depositada em todos os meus sonhos.**
**A duas grandes pessoas do saber: Professora Vicelma Luiz Cardoso e Professor Ubirajara Coutinho Filho, pela parceria oferecida, compreensão, dedicação, conselhos e por proporcionar-me a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.**

**DEDICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 28 DE JANEIRO DE 2010.**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof[a] Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (FEQUI/UFU)

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Co-orientador (FEQUI/UFU)

Prof[a]. Dra. Miriam Maria de Resende
Professora (FEQUI/UFU)

Prof[a]. Dra. Patrícia Angélica Vieira
Professora (FEQUI/UFU)

Prof[a]. Dra. Gizella Maria Zanim
Professora (UEM/Maringá)

## AGRADECIMENTOS

É excelente passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer e querer a tantos homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes, do nosso lado. Por isso meus sinceros agradecimentos...

...a Deus por todos os fatos e por todas as pessoas que passaram pela minha vida durante essa jornada e por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa de minha caminhada com saúde e sucesso.

...aos meus pais, Pedro Paulo e Rita, pelo imenso amor, constante incentivo, enorme compreensão, confortável força, infinita sabedoria e paciência, eterno exemplo.

...aos meus maravilhosos irmãos, Maria Teresa e Antonio Neto, e ao meu lindo sobrinho Aguillar Jr, por serem sempre fontes de estímulo e porto seguro, me amparando nas dificuldades e dando suporte para que eu continuasse em frente, onde várias vezes recarreguei minhas forças.

...à minha orientadora, Prof[a.] Dra. Vicelma Luiz Cardozo, pela orientação, profissionalismo, conduta, apoio, confiança e amizade. Grande mentora e amiga.

...ao meu co-orientador Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pelos ensinamentos durante o mestrado, tanto tecnicamente como profissionalmente. Agradeço também pela paciência na elaboração desse trabalho e pelos exemplos e conversas sobre problemas rotineiros da vida, sendo para mim pessoa que tenho como exemplo.

... a todos os professores e funcionários da FEQUI pela solicitude apresentada, por compartilhar seus conhecimento e experiências e pela amizade.

...aos alunos da graduação que me auxiliaram, Ana Beatriz, Carlos Alberto e Luana, pela ajuda, apoio e convivência durante todo o período experimental.

...aos amigos e colegas da pós-graduação e do laboratório de bioquímica, Ju, Thályta, Flavinha, Mauri, Carla, Jana, Sandra, Diego, Paula, Elizangela, Rafael, Dani e a todos que por ali passaram, pela troca de experiência, apoio e companheirismo durante minha trajetória.

...ao CNPq pela concessão da bolsa.

... ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

...a todos que contribuíram para a realização deste trabalho MUITÍSSIMO OBRIGADA!!!.

**SUMÁRIO**


Lista de figuras..... i

Lista de tabelas..... v

Lista de símbolos..... vii

Resumo..... ix

"Abstract"..... x

**CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO..... 1**

**CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 5**

2.1 Fermentação em estado sólido..... 5

2.1.1 Fatores que influenciam a FES..... 9

2.1.1.1 Umidade e atividade de água (Aw)..... 10

2.1.1.2 Temperatura e transferência de calor..... 11

2.1.1.3 pH..... 11

2.1.1.4 Aeração e transferência de oxigênio..... 12

2.2 Fungos..... 13

2.2.1 O gênero do *Aspergillus*..... 14

2.3 Substratos..... 18

2.3.1 Arroz..... 20

2.3.2 Maracujá..... 23

2.4 Enzimas..... 27

2.4.1 Obtenção de enzimas..... 28

2.4.2 Invertases..... 29

2.4.3 Proteases..... 32

2.4.4 Pectinases..... 35

2.4.5 Amilases..... 38

2.4.6 Celulases..... 41

2.5 Crescimento celular e geração de produtos na FES..... 45

**CAPITULO 3 MATERIAL E MÉTODOS..... 50**

3.1 Preparo do resíduo..... 50

3.2 Cepas de *Aspergillus niger* a serem empregadas nos experimentos..... 51

3.3 Meio de cultura e manutenção do fungo..... 52

3.4 Processo de fermentação..... 53
3.5 Extração das enzimas..... 53
3.6 Quantificação do crescimento celular..... 54
3.7 Testes Preliminares para seleção da cepa de *Aspergillus niger* a ser utilizada e do melhor tempo de fermentação..... 56
3.8 Planejamento Experimental..... 56
3.9 Cinética da fermentação..... 58
3.10 Determinação de açúcares redutores..... 58
3.11 Determinação das atividades invertásica, pectinásica, amilásica e celulásica..... 60
3.12 Determinação da atividade proteolítica..... 61
**CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 63**
4.1 Caracterização dos resíduos secos..... 63
4.2 Estudos Preliminares para seleção da cepa de *Aspergillus niger*. 63
4.3 Otimização da produção das enzimas: invertase, amilase, celulase, pectinase e protease..... 68
4.4 Cinéticas de fermentação para a condição otimizada..... 97
**CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 110**
5.1 Conclusões..... 110
5.2 Sugestões..... 112
**CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113**
**ANEXO 1 134**

## LISTA DE FIGURAS


**Figura 2.1** Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos..... **7**

**Figura 2.2** Fenômenos microscópicos e macroscópicos envolvidos em um processo de FES..... **13**

**Figura 2.3** Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*..... **15**

**Figura 2.4** Esquema dos constituintes do arroz..... **22**

**Figura 2.5** Distribuição percentual da produção de arroz (em casca) por regiões brasileiras no ano de 2004, com destaque para os cinco principais estados produtores..... **24**

**Figura 2.6** Classificação para o maracujá..... **26**

**Figura 2.7** Mecanismo de reação catalisada pela invertase..... **30**

**Figura 2.8** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease..... **32**

**Figura 2.9** Estrutura primária das substâncias pécticas..... **35**

**Figura 2.10** Classificação das enzimas amilolíticas..... **39**

**Figura 2.11** Estrutura química da celulose..... **41**

**Figura 2.12** Parâmetros de ajuste dos Modelos Logístico e de Gompertz..... **47**

**Figura 2.13** Parâmetros de ajuste do Modelo de Dalsenter e colaboradores (2005).... **49**

**Figura 3.1** Resíduo de arroz..... **50**

**Figura 3.2** Resíduo de maracujá após secagem..... **51**

**Figura 3.3** Cepas de *Aspergillus niger*..... **52**

**Figura 3.4** Meio de cultura e cepas de *Aspergillus niger* a serem manuseados na capela de fluxo laminar..... **52**

**Figura 3.5** Substrato (metade casca de maracujá e metade resíduo de arroz) autoclavado..... **53**

**Figura 3.6** Câmara de NeuBauer (Barga, 2007)..... **54**

**Figura 3.7** Leitura em câmara de Neubauer de *Aspergillus niger*..... **54**

**Figura 3.8** Esquema das determinações realizadas no meio fermentado..... **58**

**Figura 3.9** Microrreator de mistura com camisa acoplado a agitador magnético..... **60**

**Figura 3.10** Banho termostatizado empregado..... **60**

**Figura 3.11** Foto unidade experimental (a) e esquema da unidade experimental (b): (1) microrreator com camisa externa, (2) agitador magnético, (3) tubos de Folin-Wu, (4) banho de água fervente, (5) banho de água fria (6) espectofotômetro, (7) cubeta, (8) tubo de Folin-Wu com solução de reação diluída e (9) banho termostático..... **61**

**Figura 4.1** Atividade das enzimas invertase (a), amilase (b) e celulase (c), em função do tempo, empregando três linhagens de *Aspergillus níger* ATCC 16404, 10577 e 9029..... **64**

**Figura 4.2** Produtividade das enzimas invertase, amilase e celulase em função do tempo, empregando três linhagens de *Aspergillus níger* ATCC 16404 (a), 10577 (b) e 9029 (c)..... **65**

**Figura 4.3** Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 16404 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais..... **67**

**Figura 4.4** Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 1057 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais..... **67**

**Figura 4.5** Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 9029 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais..... **67**

**Figura 4.6** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade invertásica..... **71**

**Figura 4.7** Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade invertásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade invertásica. (b)..... **71**

**Figura 4.8** Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da invertase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de

inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c)..... **73**

**Figura 4.9** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade amilásica..... **76**

**Figura 4.10** Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade amilásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade amilásica. (b)..... **77**

**Figura 4.11** Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da amilase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c)..... **78**

**Figura 4.12** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de resíduo de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade celulásica..... **81**

**Figura 4.13** Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade celulásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade celulásica. (b)..... **82**

**Figura 4.14** Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da celulase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c)..... **83**

**Figura 4.15** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de resíduo de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade pectinásica..... **87**

**Figura 4.16** Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade pectinásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade pectinásica. (b)..... **87**

**Figura 4.17** Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da pectinase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c)..... **88**

**Figura 4.18** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de

resíduo de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade proteásica..... **92**

**Figura 4.19** Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade proteásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade pectinásica. (b)..... **93**

**Figura 4.20** Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da protease em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c)..... **94**

**Figura 4.21** (a) Cinética de crescimento celular do *Aspegillus niger* ATCC 16404 (biomassa) e (b) Cinética de crescimento celular (número de esporos formados), nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo do cultivo de 12 dias..... **97**

**Figura 4.22** Curva de crescimento do *Aspergillus níger* ATCC 16404, em g de células por 100 g de substrato em função do tempo, nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo do cultivo de 12 dias. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Dalsenter aos dados experimentais..... **98**

**Figura 4.23** Cinética da atividade invertásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias..... **100**

**Figura 4.24** Cinética da atividade amilásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias..... **101**

**Figura 4.25** Cinética da atividade celulásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias..... **103**

**Figura 4.26** Cinética da atividade pectinásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias..... **104**

**Figura 4.27** Cinética da atividade proteásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias..... **105**

## LISTA DE TABELAS


**Tabela 2.1** Alimentos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos..... **8**

**Tabela 2.2** Classificação e principais características do *Aspergilluas niger*..... **16**

**Tabela 2.3** Algumas enzimas produzidas por *Aspergillus niger* com relevância comercial e suas aplicações..... **17**

**Tabela 2.4** Composição média do arroz..... **21**

**Tabela 2.5** Composição química habitual da casca de arroz..... **22**

**Tabela 2.6** Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura permanente de maracujá no ano de 2005..... **25**

**Tabela 2.7** Resumo de trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas, utilizando tipos diferentes de fermentação, substratos e micro-organismos..... **44**

**Tabela 2.8** Parâmetros dos modelos logístico e de Gompertz associados ao tempo da fase lag ($t_l$) e a velocidade máxima de crescimento celular (B)..... **46**

**Tabela 3.1** Componentes e devidas proporções do ágar bacteriológico..... **51**

**Tabela 3.2** Matriz do DCC utilizada para avaliar a influência conjunta das variáveis concentração de inóculo, relação massa de resíduo de arroz/ (massa total = massa de resíduo de arroz + massa de casca de maracujá) e umidade..... **57**

**Tabela 4.1** Caracterização química da misturas dos substratos (metade casca de maracujá e metade resíduo de arroz)..... **63**

**Tabela 4.2** Produtividade das enzimas invertase, amilase e celulase em função do tempo, empregando as linhagens de *Aspergillus níger* ATCC 16404, 1057 e 9029..... **66**

**Tabela 4.3** Parâmetros de ajuste do crescimento ao modelo Logístico..... **68**

**Tabela 4.4** Matriz do DCC para a atividade invertásica..... **69**

**Tabela 4.5** Coeficientes de regressão para a resposta Invertase..... **70**

**Tabela 4.6** Matriz do DCC para a atividade amilásica..... **74**

**Tabela 4.7** Coeficientes de regressão para a resposta amilase..... **75**

**Tabela 4.8** Matriz do DCC para a atividade celulásica..... **79**

**Tabela 4.9** Coeficientes de regressão para a resposta celulase..... **80**

**Tabela 4.10** Matriz do DCC para a atividade pectinásica..... **85**

**Tabela 4.11** Coeficientes de regressão para a resposta pectinase..... **86**
**Tabela 4.12** Matriz do DCC para a atividade proteásica..... **90**
**Tabela 4.13** Coeficientes de regressão para a resposta protease..... **91**
**Tabela 4.14** Resumo dos resultados obtidos para as enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease..... **96**
**Tabela 4.15** Parâmetros de ajuste do crescimento ao modelo de Dalsenter..... **98**
**Tabela 4.16** Resultados do estudo cinético para a atividade invertásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30g e Inóculo = 0,25 g/100g)..... **99**
**Tabela 4.17** Resultados do estudo cinético para a atividade amilásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30g e Inóculo = 0,25 g/100g)..... **101**
**Tabela 4.18** Resultados do estudo cinético para a atividade celulásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30g e Inóculo = 0,25 g/100g)..... **102**
**Tabela 4.19** Resultados do estudo cinético para a atividade péctinásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30g e Inóculo = 0,25 g/100g)..... **103**
**Tabela 4.20** Resultados do estudo cinético para a atividade proteásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30g e Inóculo = 0,25 g/100g)..... **105**
**Tabela 4.21** Resultados para quatro dias de fermentação à temperatura ambiente (28 ± 2ºC) e no ponto de otimização experimental do DCC..... **106**
**Tabela 4.22** Modelo descrito da produção enzimática ..... **108**
**Tabela 4.23** Comparação de Energia de ativação (Ea) de trabalhos encontrados na literatura com o presente trabalho..... **109**

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| A | Atividade em U/g |
| A/T | Relação massa de resíduo de arroz/massa total do substrato |
| $A_A$ | Aumento logarítmico da população |
| Abs | Resultado da análise em absorbância |
| $A_d$ | Fator de freqüência da equação de Arrhenius |
| $A_s$ | Fator de freqüência da equação de Arrhenius |
| Aw | Atividade de água |
| B | Velocidade relativa máxima de crescimento |
| C | Tempo necessário para atingir esta velocidade máxima |
| CI | Concentração de inóculo |
| Coef.angular | Coeficiente angular da reta de DNS |
| D | Parâmetro associado ao crescimento celular |
| DCC | Delineamento Composto Central |
| Dil | Diluição do extrato bruto |
| $Dil_1$ | Diluição para leitura |
| $Dil_2$ | Diluição para correção do volume adicionado de reagente |
| DSMZ | Centro de Pesquisas de material biológico da alemanha |
| E | Parâmetro adimensional |
| e | Base de logaritmo neperiano (e=2,718281) |
| $E_d$ | Energia de ativação das reações de degradação |
| $E_s$ | Energia de ativação das reações de síntese |
| $E_u$ | Energia de ativação |
| Ext | volume de extrato do fermentado (volume de diluição do sólido fermentado) |
| F | Componente intracelular |
| FD | Fator de diluição |
| FES | Fermentação em estado sólido |
| FOS | Frutooligossacarídeos |
| FPase | Atividade de hidrólise em papel filtro |
| FS | Fermentação submersa |
| $k_d$ | Constante direta de decomposição do produto do modelo de ordem n |

| | |
|---|---|
| $k_S$ | Constante direta de síntese do produto do modelo de ordem n |
| $K_u$ | Constante direta de decomposição do produto do modelo de ordem n |
| L | Parâmetros lineares |
| MM | Massa molecular do açúcar |
| Ms | Massa de substrato em g |
| Mss | Massa seca |
| Mssi | Massa seca do inóculo |
| $m_x$ | Consumo de substrato para manutenção da vida das células |
| n | Expoente da equação logística |
| NE | Valor médio em 5 quadrados |
| P | Concentração de produto de interesse |
| Q | Termos quadráticos |
| S | Substrato |
| t | Tempo de reação |
| T | Temperatura em Kelvin |
| $t_l$ | Tempo da fase lag |
| U1 | 0,01 unidade de absorbância |
| v/v | Volume/volume |
| Vext | Volume de extrato fermentativo diluído colocado no reator |
| Vino | Volume de inóculo |
| Vol | Volume da amostra em mL |
| Volr | Volume no reator |
| X | Quantidade de células em g / 100 g de substrato |
| $X_1$ | Massa de resíduo de arroz/massa total |
| $X_2$ | Umidade |
| $X_3$ | Concentração de inóculo |
| $X_m$ | Máxima concentração celular prevista pelo crescimento |
| $X_o$ | Quantidade de células iniciais em g / 100 g de substrato |
| $Y_{x/s}$ | Coeficiente estequiométrico |
| $Z_1$ | Geração de produto associada ao crescimento de biomassa |
| $Z_1$ | Parâmetro que representa a geração de produto associada ao crescimento de biomassa |

| | |
|---|---|
| $Z_2$ | Velocidade específica de geração de produto associada à manutenção da vida celular |
| $Z_2$ | Velocidade específica de geração de produto associada a manutenção da vida celular |
| $\mu_m$ | Velocidade máxima de crescimento celular |

**RESUMO**

O Brasil é um dos principais produtores mundial de arroz e maracujá. A produção destes alimentos gera uma grande quantidade de resíduos que representa um sério problema de disposição final e perda econômica associada ao não aproveitamento deste material. A perda do valor econômico desta biomassa pode ser reduzida pelo uso das mesmas em fermentações em estado sólido (FES) destinadas à geração de enzimas. Esta prática de redução de desperdício condiz com processos modernos que buscam utilizar os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos que são cada vez mais necessários para melhor sustentabilidade da cadeia produtiva na agro-indústria. Pensando nesta situação foi proposto o presente trabalho que tem como objetivo avaliar o uso destes resíduos na produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease em fermentação no estado sólido com *Aspergillus niger* empregando como substrato resíduos das indústrias de processamento de arroz e de maracujá. Foram feitos testes preliminares visando selecionar a melhor linhagem de *Aspergillus niger* entre as cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029 e determinar as condições otimizadas de produção destas enzimas. Os resultados obtidos mostraram que o *Aspergillus niger* ATCC 16404 proporcionou maior atividade para as enzimas estudadas e o tempo de fermentação selecionado para a produção das mesmas foi de quatro dias. Avaliou-se a otimização da produção das enzimas citadas por meio da realização de um delineamento composto central (DCC) com três variáveis: relação de massa de resíduo de arroz/massa total (A/T), adição de umidade e concentração de inóculo (CI). A relação A/T utilizada variou de 0 a 1, a umidade variou de 0,323 a 1,676 mL/ g de substrato e a concentração de inóculo de 0,5 a 4,5 mg/ g de substrato. O DCC mostrou-se um método eficaz, fornecendo como os melhores resultados para superfície de resposta A/T de 0,5, umidade de 30 mL/30 g de substrato e CI de 0,25 g/100 g de substrato. Nestas condições foram de 108,82 ± 3,1 U/g a atividade invertásica, 10,56 ± 2,0 U/g a atividade amilásica, 5,98 ± 0,8 U/g a atividade celulásica, 5,24 ± 0,6 U/g a atividade pectinásica e 5.201,00 ± 3,8 U/g a atividade proteásica. Para obter um modelo estruturado capaz de prever o comportamento cinético em diferentes temperaturas e avaliar o efeito da temperatura no crescimento celular e produção enzimática foi realizado um novo estudo cinético do processo nas temperaturas 28 ± 2ºC, 35 ± 0,5ºC, 40 ± 0,5ºC e 45 ± 0,5ºC que utilizou as condições otimizadas descritas anteriormente. Os resultados experimentais e os resultados previstos pelo modelo mostraram que o maior crescimento celular, expresso em termos de biomassa e maior número de esporos, ocorreu nas temperaturas de 35ºC e 45ºC. Os resultados experimentais mostraram que a maior atividade invertásica foi de (155,80 ± 3,28 U/g) à temperatura de 35ºC no 11º dia de fermentação, os maiores valores de atividades amilásica e proteásica foram de (14,00 ± 2,42 U/g e 5.809,00 ± 4,20 U /g, respectivamente), à temperatura de 28ºC e para as atividades celulásica (14,10 ± 2,25 U/g) e pectinásica (10,80 ± 1,5 U/g), os maiores valores foram obtidos à temperatura de 45ºC no 12º dia de fermentação. A comparação entre a energia de ativação do modelo estruturado que descreve a inativação térmica da enzima com os valores da literatura e a comparação dos valores previstos pelo modelo com os pontos experimentais do crescimento celular e atividades enzimáticas mostram a boa aplicabilidade do modelo estudado.

Palavras-chave: *Aspergillus niger,* resíduos agro-industriais, produção enzimática, fermentação em estado sólido.

**ABSTRACT**

Brazil is one of the main producer countries of rice and passion fruit. The production of these foods have generated a large amount of wastes which could represent serious *p*roblems with the f*inal* disposal and cause economic losses from misuse of biomass. The enviroment pollution and loss of economic value from this biomass can be reduced by using this material in the production of enzymes by solid state fermentation (SSF).This reduction of waste generation fit neatly into the conceptual framework of by-products utilization, waste minimization and waste prevention which have been accepted as part of the environmental and economic interaction in the food supply chain. For this reason, the present work has, as objective, to evaluate the production of the enzymes invertase, amylase, cellulase, pectinase, and proteinase using *Aspergillus niger* in solid state fermentation (SSF) on rice and passion fruit by-products. In order to choose a strain and optimize the fermentation conditions *t*he production of these enzymes using *Aspergillus niger* strains ATCC 16404, 1057 and 9029 were preliminary evaluated and the fermentation with the best strain was investigated. According to the results obtained, the best strain for all five enzymes were *Aspergillus niger* ATCC 16404 and four days was found to be the best time for the fermentation. Central composite design (CCD) was used to investigate the dependence of solid medium concentrations (SMC), water addition (WA) and inoculum size (IS) on the production of enzymes during the SSF. The variable levels used in the design were: 0 to 1.0 g rice by-product/ total g, 0.323 to 1.676 mL/ total g , and 0.5 a 4.5 mg inoculum/ total g . According to the results the variable levels used in CCD was satisfactory to describe the optimization. Based on response surface methodology (RSM), optimum conditions were: SMC 0.5 g rice by-product/ total g, WA 1.0 mL/ total g, , IS 2.5 mg/ total g, invertase 108.82 ± 3.1 U/total g , amylase 10.56 ± 2.0 U/ total g , cellulase 5.98 ± 0.8 U/g , pectinase 5.24 ± 0.6 U/g, and proteinase 5201.00 ± 3.8 U/g. To obtain a structured model that describe the nonisothermal cellular behaviour and to evaluate the kinetics of cell growth and enzyme production a new set of experiments were carried out at the temperatures of 28 ± 2ºC, 35 ± 0.5ºC, 40 ± 0.5ºC e 45 ± 0.5ºC under the same optimum conditions described above. The results and model predictions implied that the largest cellular growth, expressed in terms of biomass and spores, occured in the medium with temperature between 35°C and 45ºC. The experimental results showed that the maximum enzymes activities and conditions related to this production were: invertase (155.80 ± 3.28 U/g) , 35ºC , 11 days of fermentation; amylase (14.00 ± 2.42 U/g) and proteinase (5809.00 ± 4.20 U/g), 28ºC, and 11 days of fermentation; cellulase (14.10 ± 2.25 U/g) and pectinase (10.80 ± 1.5 U/g), 45ºC, 12 days of fermentation. The comparisons between the activation energy of enzyme desactivation provided by model with published values and the comparison of model predictions with experimental results of cellular growth and enzyme activity demonstrate the applicability of the proposed model.

Key-words: *Aspergillus niger*, agro-industrial waste, enzyme production, solid state fermentation.

# Capítulo 1

# Introdução

# 1 – INTRODUÇÃO

Hoje é realidade constatável que a geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. Com o aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do Século XX, ficou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental.

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

De uma forma particular, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado.

A fermentação em estado sólido (FES) consiste em uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes (PALMA, 2003).

Generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, sabendo-se que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes é uma tarefa muito difícil. A seguir são citadas algumas características da FES quando comparada à fermentação submersa (FS).

- Menores riscos de contaminação, devido à reduzida umidade do meio;
- Simplicidade no preparo do meio de fermentação, pois necessita-se normalmente apenas do ingrediente principal e de água para umedecer;
- Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima, especialmente em países como o Brasil;
- Menor necessidade de espaço;
- O crescimento celular ocorre em condições mais próximas aos dos ambientes naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo;
- Maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado;
- Reduzido consumo de água.

O processo em estado sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Neste contexto, destaca-se a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano. Além disto, a heterogeneidade da mistura na FES dificulta o controle do crescimento celular e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos, o que torna complicado controlar e automatizar o processo (PALMA, 2003).

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

Diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (AIDOO et al., 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003).

Os substratos para FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agro-indústria (PANDEY, 2003). Farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação. São recursos naturais renováveis e produzidos em grandes quantidades, o que, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental. Uma das maiores vantagens deste

método é que, ao invés de produzir apenas uma enzima, permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas, específico para os substratos encontrados nos alimentos (RUTZ et al., 2008 ).

A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

A FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (PINTO et al., 2005). Na indústria, a técnica de FES é aplicada em alguns segmentos como:

- Indústria alimentícia: produção de enzimas, ácidos orgânicos, aromas e outras substâncias de interesse;
- Indústria Farmacêutica: um número pequeno de antibióticos é produzido por FES;
- Agro-indústria: produção de biopesticidas. A FES é preferida para a produção de biopesticidas, pois o rendimento dos esporos fúngicos é maior quando comparado com a FS;
- Desintoxicação biológica: Alguns resíduos agro-industriais são tóxicos, como a casca de mandioca, e a FES tem sido utilizada para desintoxicar estes resíduos.

Dentre os resíduos mais utilizados industrialmente pode-se citar os resíduos da polpa de café (OROZCO et al., 2008), abacaxi (IMANDI et al., 2008), trigo (CHENYU et al., 2008), azeite (VASSILEV et al., 2007) e farelo de trigo e casca de arroz (NIZAMUDDIN et al., 2008).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes micro-organismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO et al., 2000).

Considerando-se o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agro-industriais. Nesse sentido, a fermentação em estado sólido se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, de agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros, e com isso contribuir para uma maior diversificação do agro-negócio nacional.

Dentro desse contexto o objetivo geral do trabalho foi avaliar o aproveitamento de resíduos agro-industriais para produção de enzimas por fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger* e os objetivos específicos foram:

- avaliar o efeito da suplementação de água e inóculo na produção das enzimas;
- avaliar qual cepa utilizar de *Aspergillus niger* com base na capacidade de produção enzimática e no melhor tempo de fermentação;
- estudar as características cinéticas do crescimento celular em função da temperatura;
- avaliar as diferentes proporções dos resíduos do processamento de arroz e de maracujá.

# Capítulo 2

# Revisão Bibliográfica

# 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 - Fermentação em Estado Sólido

O termo fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos com reduzida quantidade de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas.

A fermentação em meio semi-sólido vem sendo utilizada desde a antiguidade. O uso do molho de soja na China é reportado desde 3000 a.C e no Japão e sudoeste da Ásia desde 1000a.C. (ARAÚJO, 2004).

No final do século XIX, Takamine produziu uma enzima digestiva (takadiastase) por FES utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* e farelo de trigo como substrato. Este fato despertou o interesse da indústria para a busca de outras aplicações deste tipo de fermentação (SATO e SUDO, 1999).

A partir de 1940, com o desenvolvimento da fermentação submersa para produzir a penicilina e a enorme importância deste antibiótico durante a Segunda Guerra Mundial, os processos de FES foram praticamente abandonados nos países ocidentais (LONSANE et al., 1985; PANDEY, 2003). Contudo, entre 1960-1970 a descoberta das micotoxinas, produzidas por fermentação em estado sólido, fez ressurgir o interesse neste tipo de processo (PANDEY, 2003).

As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido. Murthy e colaboradores (1993) descreveram que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se à utilização, na FES, do substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FS, em que se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Gervais e Molin (2003) relataram que a principal diferença entre a FS e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As FS são reações de mistura perfeita nas quais, em teoria, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em meio sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar à homogeneidade, seria necessária excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular (PALMA, 2003).

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

Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água, na qual as condições de crescimento aproximam-se do habitat natural de fungos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agro-industriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano.

A maior diferença conhecida entre FES e FS é a esporulação do fungo. É muito fácil de obter esporos de fungo por FES. A cultura de superfície sólida é o ambiente natural dos fungos, o que torna mais fácil de conservar e controlar o ciclo morfológico deles por FES, que por FS. Uma aplicação prática deste fato é o uso de FES como um procedimento apropriado de produzir esporos para vários tipos de aplicações industriais. Por exemplo, produção de inóculo de *Penicillium roquefortii* para queijos azuis e Camembert, produção de *Beauveria bassiana* para uso como biopesticida e a produção de inóculo fresco para começar um novo processo de FES ou FS (SANTOS, 2007).

Na FES, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (MITCHELL e LONSANE, 1992). A Figura 2.1 ilustra o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

Há 4000 anos, os chineses enfrentaram problemas de limitação de proteína e baixa digestibilidade das matérias-primas, frente a isso, eles desenvolveram um processo chamado “koji” - ou fermentação em estado sólido – no qual o próprio micro-organismo faz a “digestão”. Este processo incluiu também uma série de processos microbianos bem conhecidos, como a compostagem, a produção de silagem e o cultivo de cogumelos. Além disso, muitos alimentos consumidos nos EUA, como alguns tipos de queijos e pães, e na Ásia, como missô, tempê e shoyu, são produzidos por fermentação em estado sólido (ver Tabela 2.1) (RUTZ et al., 2008).

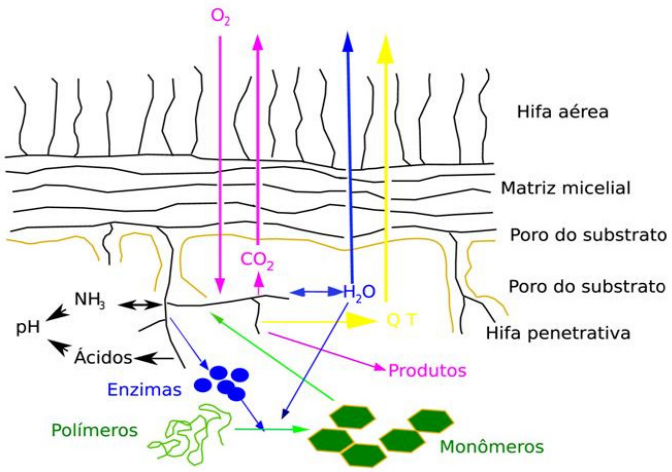


Figura 2.1 – Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos (HÖLKER e LENZ, 2005).

No processo Koji, o fungo selecionado é inicialmente propagado em meio líquido para produzir um grande volume de inóculo, o qual é misturado a um meio contendo substrato sólido pré-esterilizado (fibra) para produzir a mistura conhecida como "koji". Sob condições estritamente assépticas, o "koji" é então distribuído em bandejas e mantido em câmaras de fermentação ambientalmente controladas. Durante este período, o fungo cresce rapidamente e secreta enzimas que quebram as fibras e liberam os nutrientes necessários para que possa continuar a crescer. Com a variação das matérias primas, o fungo varia sua resposta com relação ao produto desejado (RUTZ et al., 2008). A Tabela 2.1 apresenta alguns alimentos produzidos industrialmente empregando FES.

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS e MOLIN, 2003).

Tabela 2.1 – Alimentos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.

| Produto/Processo | Micro-organismos principais | Substratos |
|---|---|---|
| Enzimas | | |
| Pectinases | *Lentinus enodes* | Resíduos de frutas |
| | *Aspergillus carbonarius* | Farelo de trigo |
| | *Aspergillus niger* | Polpa de café |
| Hemicelulases | *Trichoderma longibrachiatum* | Farelo de trigo |
| | *Aspergillus tamarii* | Farelo de trigo/sabugo de milho/Bagaço de cana |
| Celulases | *Trichoderma reesei* | Palha de trigo |
| | *Aspergillus niger* | Casca de maracujá |
| Amilases | *Aspergillus niger* | Farelo de trigo |
| | *Aspergillus niger* | Resíduos de chá |
| | *Aspergillus niger* | Farelo de arroz |
| Proteases | *Rhizopus oryzae* | Farelo de trigo |
| | *Aspergillus niger* | Casca de maracujá |
| Lípases | *Penicillium restrictum* | Torta de babaçu |
| Fitase | *Aspergillus niger* | Farelo de trigo/Farinha de soja |
| Tanase | *Aspergillus niger* | Farelo de trigo |
| Invertases | *Aspergillus niger* | Farelo de arroz |
| Substâncias orgânicas | | |
| Ácido cítrico | *Aspergillus niger* | Resíduos de maçã |
| | *Aspergillus niger* | Bagaço de cana |
| | *Aspergillus niger* | Resíduos de goiaba |
| | *Aspergillus niger* | Resíduos de abacaxi |
| Ácido Giberélico | *Gibberella fujikoroi* | Farelo de trigo |
| Pigmentos | *Monascus purpureus* | Arroz |
| Carotenóides | *Penicillium sp.* | Sabugo de milho |
| Enriquecimento proteico | *Penicillium decumbens* | Palha de milho |
| | *Rhizopus oligosporus* | Farinha de colza |
| Biorremediação | *Pleurotus ostreatos* | Materiais lignocelulósicos |
| Biopolpação | *Pleurotus sp.* | Farelo de trigo |

Fonte: Adaptado de PINTO (2003).

Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água (Aw), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Para o entendimento da FES, a umidade tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois esta última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2005).

Assim, os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto. A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas a variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes, que podem variar de acordo com a espécie e o tecido vegetal. Dessa forma, cada substrato, com potencial de uso em FES, deve ser cuidadosamente avaliado (PINTO et al., 2005, PALMA, 2003).

### 2.1.1 - Fatores que influenciam a FES

Há diversos fatores que influenciam a FES. A seguir são citados os mais mencionados por estudiosos e considerados como mais importantes.

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. O baixo conteúdo de umidade na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato usado quando comparado com a FS e, também, simplifica a separação do produto. No entanto, existem sérios problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos como conseqüência da heterogeneidade do sistema (DOELLE et al., 1992).

Segundo Gutierrez Rojas e colaboradores (1998) todos os processos de fermentação em estado sólido, necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos.

Segundo Del Bianchi e colaboradores, (2001) e Pandey (2002) o controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

Dessa forma se pode afirmar que a observação desses fatores e o trato correto em relação a cada um deles com certeza trará um melhor resultado ao processo de fermentação em estado sólido.

**2.1.1.1 - Umidade e atividade de água (Aw)**

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

A água apresenta um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

Para cada espécie de micro-organismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzimas. Esta constatação foi feita por Narahara et al., (1982) que estudaram o efeito da umidade do substrato sobre a atividade de proteases e amilases produzidas por *Aspergillues oryzae*. Os autores observaram, que as atividades específicas diminuíram nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto, foi favorável ao crescimento celular. Os autores concluiram que há um valor de umidade ótimo para a produção de enzimas em substratos sólidos o qual, não necessariamente coincide com o valor correspondente para a obtenção da máxima concentração celular. Assim, o controle da umidade do sistema pode aumentar as produtividades enzimáticas nas FES's. Han, Gallagher e Wilfred (1987) confirmam esta conclusão mostrando, em seu trabalho que, a mínima umidade necessária para o crescimento de *Aspergillus ficuum* não é a mesma para produção de fitase, no cultivo em estado sólido, a partir de grãos de cereais e sementes de leguminosas (PALMA, 2003).

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

**2.1.1.2 - Temperatura e transferência de calor**

Os processos fermentativos em estado sólido caracterizam-se por serem exotérmicos. Durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2003).

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

Del Bianchi e colaboradores (2001) apresentam a taxa de produção de proteínas por *Aspergillus niger* em relação à temperatura empregada no processo. Estes autores observaram que a temperatura de 40ºC apresentou menor tempo na fase lag, mas a 35ºC obteve maiores valores de produção de proteína. Para a temperatura equivalente a 45ºC houve uma perda sensível na eficiência do processo.

**2.1.1.3 – pH**

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as FES's, não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003).

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui

um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos micro ambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003).

Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI et al., 2001).

#### 2.1.1.4 - Aeração e transferência de oxigênio

Correia (2004) citou que a aeração cumpre funções básicas como: manter condições aeróbicas; eliminar o dióxido de carbono formado; regular a temperatura do substrato; ajustar o nível de umidade.

Os sistemas de FES têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais. A transferência de oxigênio acontece, fundamentalmente, em duas instâncias: transferência interpartículas e transferência intrapartículas.

Del Bianchi e colaboradores., (2001) relataram que há diferentes maneiras para se obter uma movimentação do ar por entre o substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio, quer seja pela utilização do material poroso medianamente granulado ou fibroso, pelo uso de pequena espessura da camada de substrato, pela utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo de tela de arame, pela agitação do substrato ou ainda pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator.

A Figura 2.2 apresenta um diagrama esquemático dos fenômenos microscópicos e macroscópicos envolvidos em um processo de FES.

A passagem de ar pelo leito permite elevadas taxas de crescimento e produtividade, mas, pode levar ao desenvolvimento do fenômeno de secagem que faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos sejam lentas ou nulas, que a pressão osmótica do meio aumente e acelere o processo de esporulação. Para controlar ou minimizar este problema, o ar deve ser saturado em vapor de água ou próximo da saturação (SANTOS, 2007).

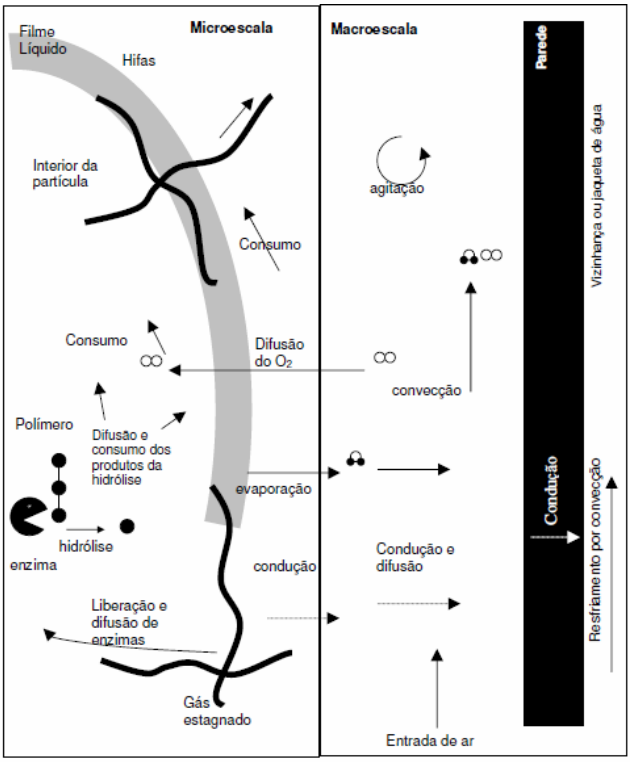


Figura 2.2 – Fenômenos microscópicos e macroscópicos envolvidos em um processo de FES (DALSENTER, 2005)

.

## 2.2 – Fungos

Os fungos constituem um grupo de micro-organismo que tem grande interesse prático e científico para os microbiologistas. Suas manifestações são familiares: todos já viram os crescimentos azuis e verdes em laranjas, limões e queijos, as colônias cotonosas, brancas ou acinzentadas, no pão e no presunto, os cogumelos dos campos ou nas prateleiras e os chapéus-de-cobra nas matas. Todas representam vários organismos fúngicos, morfologicamente muito diversificados. De um modo geral, os fungos incluem os bolores e as leveduras. A palavra bolor tem emprego pouco nítido, sendo usada para designar os mofos, as ferrugens e o carvão (doenças de gramíneas) (TEIXEIRA et al., 1999).

Os fungos se apresentam em grande variedade de formas e tamanhos. Os cogumelos, o fermento biológico usado na culinária, a infecção bucal conhecida como “sapinho”, a “ferrugem” que ataca as folhas do cafeeiro e o bolor de pão são alguns fungos bem conhecidos do nosso cotidiano. Estima-se que existam em torno de 1,5 milhões de espécies de fungos, mas apenas cerca de 72 mil já foram descritas. Os fungos vivem em praticamente todos os ambientes, mas principalmente onde há matéria orgânica em abundância, já que, diferentemente das plantas,

precisam de uma fonte externa de alimento. Nas florestas tropicais, uma simples folha está sujeita à invasão de milhares de esporos de fungos, e estes podem se desenvolver na superfície dos órgãos das plantas ou penetrar nos tecidos (OKI e FERNANDES., 2008).

Os fungos são organismos eucariontes, uni ou pluricelulares, heterotróficos, quimiorganotróficos, aeróbios ou microaerófilos, alguns possuem parede celular constituída de quitina ou quitina e celulose. Com relação à nutrição, os fungos fazem absorção do alimento, acumulam glicogênio como substâncias de reserva e têm forma de vida diversificada indo desde saprobiontes, comensal, simbiontes e parasitas (TEIXEIRA, 1999).

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

Conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos, os fungos filamentosos elaboram numerosos produtos metabólicos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, álcoois, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastantes complexas como a ergotinina (CARVALHO, 1999).

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

O Brasil é o país mais rico em biodiversidade de todo o Planeta. Em seu território encontram-se 20% do conjunto de plantas, animais e micro-organismos existentes na face da terra. A enorme e variada biodiversidade brasileira, dividida em seus principais biomas (Amazônia, Pantanal, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Campos e Florestas Meridionais), acolhe a maior riqueza do planeta em genes tropicais (DINIZ e FERREIRA, 2000).

### 2.2.1 – O gênero do *Aspergillus*

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõe este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem

associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e atualmente facilmente distinguíveis (ROSA et al., 2002).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídeos (SANTOS, 2007).

As estruturas morfológicas são características importantes para a sua classificação. As espécies pertencentes a este grupo produzem tipicamente o "aspergillum" ou "cabeça aspergillar", que consiste de uma haste (estipede) asseptado que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem as células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídeos com diferentes pigmentações e ornamentações. Uma cabeça aspergillar simples (uniseriada) é formada por uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídeos. Quando se diz que a cabeça aspergillar é bisseriada, é porque, antes da camada de fiálides, esta apresenta uma camada de células que as geraram, chamadas de métulas. A anatomia da cabeça aspergillar, forma da estrutura anamórfica que caracteriza o gênero esta apresentada na Figura 2.3. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estipede) e a célula pé, é chamada de conidióforo (SANTOS, 2007).

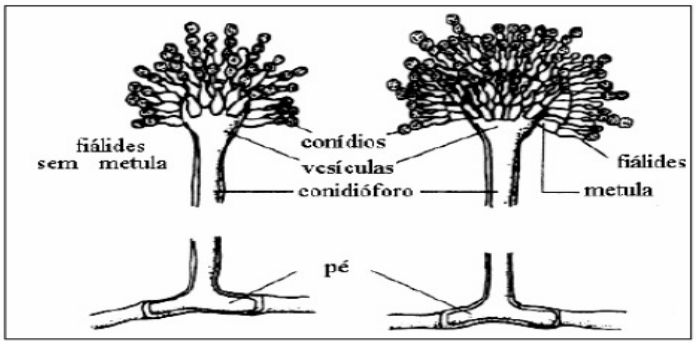


Figura 2.3 - Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus* (ROSA et al., 2002).

A classificação e principais características do *Aspergillus niger* são apresentadas na Tabela 2.2 a seguir.

Tabela 2.2 - Classificação e principais características do *Aspergilluas niger.*

| **Classificação** | | **Principais características** |
|---|---|---|
| Reino | Fungi | |
| Divisão | Eumycota | Tipicamente micelial, algumas vezes unicelular |
| Subdivisão | Deuteromycotina | Talo micelial e septado ou unicelular; reprodução sexual ausente, mas a parasexual pode ocorrer. |
| Classe | Hyphomycetes | Formas miceliais estéreis ou produzindo conídios em hifas separadas ou agregadas na ausência de conidiomata |
| Ordem | Moniliales | Micélio hialino, contendo conidióforos livres, que se projetam do micélio de forma irregular. |
| Família | Moniliaceae | Os conidióforos são solitários livres, que se projetam do micélio de forma irregular. |
| Gênero | *Asperillus* | Micélio septado. Conidióforo erecto com terminais globosos dos quais emergem fiálides com conídios arredondados unicelulares e de coloração negra, esverdeada ou amarela. |
| Espécie | *níger* | Conídios globulosos de aspecto rugoso, com equinulações verdadeiras, coloração negra, medindo em torno de 4 a 5 μm de diâmetro. |

Fonte: COURI, 1993.

A Tabela 2.3 apresenta a produção de diversas enzimas por *Aspergillus niger* com aplicação comercial, demonstrando a alta eficiência da espécie.

Tabela 2.3 - Algumas enzimas produzidas por *Aspergillus niger* com relevância comercial e suas aplicações.

| **Classe da Enzima** | **Setor da indústria** | **Aplicação** | **Referência** |
|---|---|---|---|
| Poligalacturo-nase | Alimentação<br>Alimentação | Clarificação de sucos de fruta<br>Extração de óleo de azeitona | Santos e Macedo, 2008. |
| Celulase | Detergentes<br>Têxtil | Limpesa, clarificação<br>Amaciamento de tecidos de algodão | Cardoso et al., 2008. |
| Celulase | Detergentes<br>Têxtil<br>Papel e celulose | Limpeza, descoloração<br>Amaciamento de tecidos de algodão<br>Remoção de tintas, modificação das fibras | Aguiar et al., 2008. |
| Lactase | Farmacêutica<br>Bebidas | Fabricação de cápsulas de lactase<br>Deslactosação do leite, produção de doces | Cardoso et al., 2008. |
| Invertase | Panificação<br>Saúde | Produção de açúcar invertido<br>Higiene bucal | Cardoso et al., 2008. |
| Pectinases | Papel<br>Alimentação | Degomagem de fibras<br>Clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas. | Patil e Dayanand, 2006. |
| Naringinase | Bebidas | Remoção do amargor do suco cítrico | Bram e Solomons, 1965 |
| Protease | Detergentes<br>Papel e celulose<br>Couro | Remoção de manchas de proteínas<br>Remoção de biofilmes<br>Purga do couro | Paranthaman et al., 2009. |
| Amilase | Detergentes<br>Panificação<br>Bebidas | Remoção de manchas de amido<br>Aumenta maciez e volume do pão<br>Tratamento de suvoas, cerveja light | Gupta et al., 2008. |

Fica nítido após o descrito anteriormente a importância do papel dos fungos no processo de FES.

## 2.3 – Substratos

Mais de 90% das enzimas comerciais são produzidas por sistemas de fermentação líquida em tanques profundos. Em um meio de cultura, são introduzidos nutrientes específicos para estimular a produção de uma determinada enzima. O material final é posteriormente purificado por diferentes procedimentos, resultando em um produto em que predomina apenas uma atividade enzimática. Então, adiciona-se um veículo para produzir a forma pó em uma dose adequada e compatível para uso em dietas animais. Esses produtos são usados como enzimas puras ou como parte de coquetéis enzimáticos (combinações de enzimas puras produzidas independentemente e depois misturadas) (CORREIA, 2004).

Outro método de produção de enzimas comerciais, diferente do tradicional, é a FES. Neste processo, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre.

Os resíduos agro-industriais são os substratos mais pesquisados. Em geral são baratos e abundantes. Além do mais, têm estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúvel em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. Normalmente são materiais particulados, e a água presente no meio encontra-se complexada na matriz sólida, a qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura miceliar de fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de subprodutos agro-industriais como substrato, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Os grupos de pesquisa existente ao redor do mundo tiram proveito de substratos naturalmente abundantes em sua região. Vários resíduos agro-industriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, etc (CORREIA, 2004).

Na FES o substrato sólido não apenas fornece os nutrientes para os micro-organismos, mas também serve de suporte para o crescimento destes (PANDEY, 2002). Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio.

Geralmente substratos sólidos naturais precisam de algum tipo de pré-tratamento para deixar seus componentes químicos mais acessíveis e sua estrutura física mais suscetível para penetração de micélios. Pré-tratamentos físicos envolvem a trituração ou moagem para reduzir o tamanho das partículas, tornando-as mais acessíveis. O pré-tratamento químico com ácido ou álcali em temperaturas altas pode romper barreiras de dentro da partícula para difusão, e também pode ser importante na hidrólise de macromoléculas, produzindo nutrientes solúveis (MITCHELL et al., 2000).

Pode-se também incorporar soluções de nutrientes ao substrato sólido, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do micro-organismo para a fermentação desejada, como no caso de enriquecimento protéico, quando são utilizadas fontes de nitrogênio tais como amônia, uréia ou soluções sintéticas como o sulfato de amônia.

O tamanho da partícula e forma é extremamente importante. Eles afetam a relação área superficial e o volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas (MITCHELL et al., 2000).

Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana e pode resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, limitam a superfície para ataque microbiano. Isto necessita um tamanho de partícula para um processo particular (PANDEY et al., 1999). Segundo Mitchell et al. (2000), o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho menores que 1 mm a 1 cm tem sido freqüentemente usadas em FES.

Menezes et al. (2005), utilizaram resíduos de maracujá como suplemento, e farelo de trigo como suporte e fonte de carbono para produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*. Os autores estudaram diferentes proporções de resíduos de maracujá e farelo de trigo. O resíduo de maracujá apresentou potencial de aplicação na produção de poligalacturonase por aumentar a atividade de 4,08 U/mL para 5,77 U/mL quando presente no meio em proporção de 25% para 75% de farelo de trigo.

Zúñiga et al. (2009), avaliaram a produção de celulases pelo fungo *Aspegillus niger* quando cultivado em fermentação semi-sólida com bagaço de cana suplementado com três diferentes meios nutricionais complexos. Os maiores valores registrados de produtividade foram para o meio

denominado Mandels e são descritos a seguir: 0,59 U/g de celulase, 43U/g de xilanase e 41 U/g de endoglicanase.

Castro et al. (a, 2009), estudaram a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* CCT 0916 em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola como substrato. Para isso, testaram os parâmetros de cultivo, adição de água a torta, temperatura de incubação e inóculo inicial. As condições de cultivo que favoreceram a síntese de poligalacturonase foram: adição de 100 mL de água para cada 100 g de torta de canola, temperatura de incubação de 30ºC e inóculo inicial de $10^7$ esporos.$g^{-1}$ com produção máxima de 19,7 U.$g^{-1}$ em 72h de fermentação.

Aguiar et al. (2008), verificaram o efeito total do pH e da temperatura na hidrólise enzimática de bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados utilizando as celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* cultivado em caldo sintético sobre bagaço de cana pré - tratado. O bagaço de cana pré-tratado apresentou-se bom indutor da atividade enzimática. A palha de milho apresentou-se mais suscetível à hidrólise enzimática comparada com palha de trigo e bagaço de cana, submetidas às mesmas condições de pré-tratamento alcalino.

Panarotto et al. (2003), fizeram uso de casca de limão para produção de exo-poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*. Os autores compararam o papel indutor do resíduo casca de limão com pectinas cítricas comerciais, utilizando farelo de trigo como suporte e principal fonte de carbono na fermentação em estado sólido. A casca de limão mostrou melhores atividades (70,5 U/g de matéria seca) do que as pectinas comerciais ( 34,7 e 35,3 U/g de matéria seca).

### 2.3.1 – Arroz

O arroz representa a base alimentar de mais da metade da população mundial. Os escritos mais antigos mencionando a sua existência foram encontrados na China e na Índia. Supõe-se que tenha começado a ser cultivado por volta de 500 a.C. O cultivo do arroz começou a espalhar-se a partir do Sudoeste Asiático, primeiro até o Japão e a Pérsia; posteriormente por volta de 1000 d.C., até as costas da África, e mais tarde até a Europa. Na Planície do Pó, o arroz é cultivado desde o século XV. Os espanhóis e os portugueses levaram-no para as Américas Central e do Sul após as descobertas, possivelmente no princípio do século XVI. Na América do Norte, este cereal é conhecido desde o século XVII (PEREIRA, 2002).

Com referência ao Brasil, foi trazido por colonos portugueses que o semearam no Estado do Maranhão, onde se desenvolveu de maneira bastante satisfatória. No Rio Grande do Sul, Estado que dispõe de modernas técnicas produtivas, somente foi introduzido em 1892 (SOUZA, 2008).

O arroz (*Oryza sativa L.*) está incluído no gênero *Oryza,* importante família das gramíneas. O grão de arroz é a semente contida nos seus terminais. A planta pode ter entre 40 cm e 1 m de altura e o seu crescimento varia entre 3 e 6 meses, dependendo da variedade e das condições do cultivo.

Segundo Valadares Filho e colaboradores (2006), o arroz possui as características listadas a a seguir e a composição demonstrada na Tabela 2.4.

- rico em carboidratos;
- rico em proteínas;
- com aminoácidos considerados indispensáveis, existentes nas proteínas e que lhe conferem um importante valor biológico;
- com porcentagem de sais minerais que, à exceção de algumas frutas, é o menos mineralizado de todos os alimentos;
- O amido do arroz é um dos mais fáceis de digerir;
- vitamínico;
- pobre em sódio, o que parecendo incoveniente, torna-se muitas vezes uma vantagem;
- pobre em gorduras;
- fraquíssimo teor de celulose.

Tabela 2.4 - Composição média do arroz.

| **Proteínas (%)** | **Gorduras (%)** | **Fibras (%)** | **Cinza (%)** | **Carboidratos (%)** |
|---|---|---|---|---|
| 2,70 | 0,67 | 42,08 | 14,25 | 83,63 |

Fonte: VALADARES FILHO et al., 2006.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento classifica o arroz em dois grupos gerais: arroz em casca e arroz beneficiado. A produção e beneficiamento do arroz é uma das atividades mais tecnificadas do setor agrícola brasileiro. O beneficiamento após colheita do arroz consiste em: secagem, limpeza, descasque, brunição (polimento), classificação, seleção,

empacotamento e expedição. Alguns engenhos fazem ainda a parboilização[1] dos grãos de arroz (SOUZA, 2008).

A partir do beneficiamento do arroz derivam, além do arroz polido, três subprodutos: grãos quebrados, farelo e casca de arroz. A casca de arroz, que consiste no principal subproduto da indústria arrozeira, responde por cerca de 20% do total de arroz. É um material abrasivo, de baixo valor nutritivo e, dada a sua reduzida densidade, seu simples armazenamento e eliminação constituem um grave e dispendioso problema. Atualmente, as indústrias beneficiadoras de arroz empregam praticamente todo montante de casca em processos de co-geração de energia (DELLA et al, 2001).

Um grão de arroz pode ser dividido em três partes principais: casca, película (farelo) e grão (Figura 2.4). Segundo Hwang e Chandra (1997) a composição química da casca de arroz é similar às fibras orgânicas (Tabela 2.5), mas varia conforme a espécie cultivada, tipo de solo, fatores climáticos e fertilizantes empregados.

Tabela 2.5 - Composição química habitual da casca de arroz.

| **Celulose (%)** | **Lignina (%)** | **Sílica (%)** |
|---|---|---|
| 50 | 30 | 20 |

Fonte: KAWABATA, 2008.

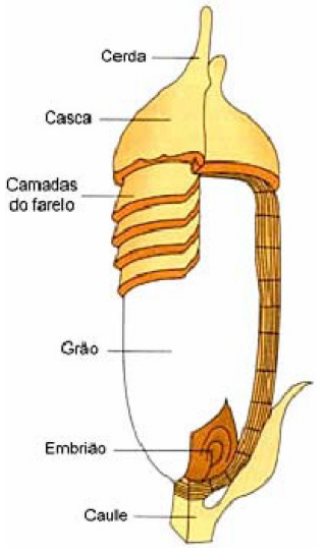


Figura 2.4. Esquema dos constituintes do arroz (KAWABATA, 2008).

[1] A parboilização é um tratamento hidrotérmico que cozinha parcialmente os grãos ainda em casca. Este processo faz com que parte das vitaminas e sais minerais passe do farelo para o interior do grão, aumentando seu valor nutricional (LUDWIG, 2004).

Em termos mundiais, o Brasil está entre os 10 principais produtores, sendo superado pelos seguintes países, dentre outros: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Tailândia e Japão. Aproximadamente 70% desta produção é proveniente das regiões centrais, envolvendo grande parte dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e região sul, destacando-se o Rio Grande do Sul (FAGUERIA e BARBOSA FILHO, 1980).

Segundo o Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (IBGE (a), 2009) a produção de arroz no Brasil em 2008 foi superior a 12 milhões e 100 mil toneladas (em casca), e estima-se que em 2009 a produção aumente para 12 milhões e 600 mil toneladas.

No Brasil, o arroz é cultivado praticamente em todo território nacional (Figura 2.5). Dois sistemas tradicionais de cultivo são adotados na maioria das lavouras no Brasil: de sequeiro e irrigado. O arroz de sequeiro tem uma plantação anual, de acordo com o período chuvoso, já o arroz irrigado, diferentemente do arroz de sequeiro, não sofre o problema de sazonalidade da cultura. Nos últimos cinco anos, Roraima tem apresentado um melhor desempenho, aumentando sua participação na produção da Região Norte. Esse aumento significativo coloca o Estado como o terceiro maior produtor da Amazônia Ocidental (SEPLAN/RR, 2006).

Desta forma, acredita-se, que não faltará matéria-prima para a continuidade dos trabalhos de pesquisa e posterior uso em escala industrial, uma vez que o consumo de arroz pela população mundial é um hábito inquestionável e dificilmente será substituído.

### 2.3.2 – Maracujá

Originário de regiões tropicais, o maracujá encontra no Brasil condições excelentes para seu cultivo. Maracujá e maracujazeiro são designações de diferentes espécies da família Passifloraceae, todas do gênero *Passiflora* (EMBRAPA, 2004).

Cerca de 150 espécies de *Passiflora* são nativas do Brasil, das quais 60 produzem frutos que podem ser aproveitados direta ou indiretamente como alimento (IBGE (b), 2002).

O maracujá é uma cultura com longo período de safra, de 8 meses no Sudeste, de 10 no Nordeste e 12 meses no Norte do País. A espécie mais cultivada é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), por ser mais vigorosa, se adapta melhor aos dias quentes e apresenta frutos de maior tamanho (EMBRAPA, 2004).

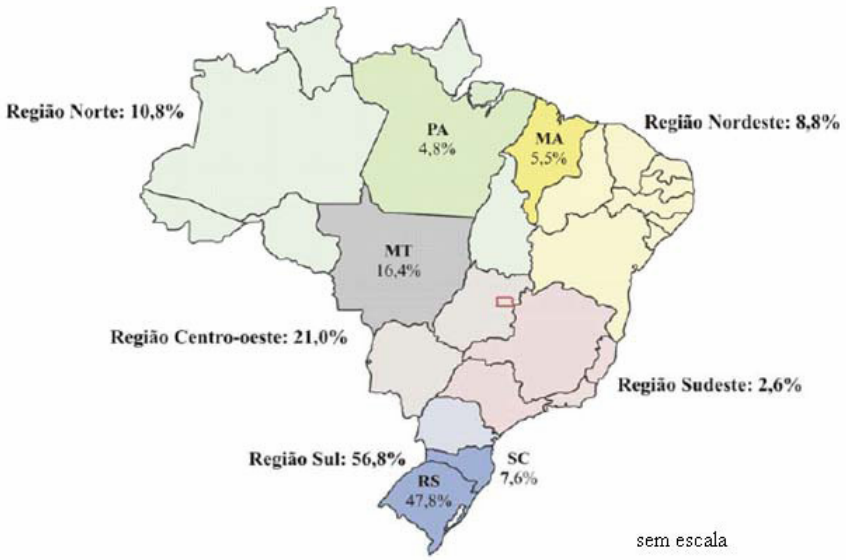


Figura 2.5 – Distribuição percentual da produção de arroz (em casca) por regiões brasileiras no ano de 2004, com destaque para os cinco principais estados produtores. Fonte: (IBGE, 2006).

A produção brasileira de maracujá supera a de manga, goiaba e mamão papaia, sendo o Brasil o maior exportador mundial de suco de maracujá (CHAN, 1993; SILVA e MERCADANTE, 2002). A Tabela 2.6 apresenta quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura permanente de maracujá no ano de 2005.

O maracujá amarelo apresenta resistência às moléstias e grande produtividade em vários países de clima tropical. Adapta-se facilmente ao meio ambiente, produzindo fruta com maior tamanho e, conseqüentemente, maior rendimento de polpa para fabricação de sucos, além de elevada acidez que permite flexibilidade na adição de açúcar (ITAL, 1980).

Tabela 2.6 - Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura permanente de maracujá no ano de 2005.

| Brasil, Região Geográfica e Unidade da Federação | Quantidade produzida (Toneladas) | Valor da produção (Mil reais) | Área plantada (Hectare) | Área colhida (Hectare) |
|---|---|---|---|---|
| **Brasil** | **479.813** | **309.939** | **35.856** | **35.820** |
| **Norte** | **51.077** | **21.000** | **5.118** | **5.104** |
| **Nordeste** | **244.343** | **161.373** | **19.553** | **19.553** |
| **Sudeste** | **151.096** | **107.291** | **8.593** | **8.586** |
| Minas Gerais | 44.025 | 26.554 | 3.063 | 3.063 |
| Espírito Santo | 51.070 | 44.038 | 2.097 | 2.097 |
| Rio de Janeiro | 15.012 | 10.095 | 1.052 | 1.052 |
| São Paulo | 40.989 | 26.603 | 2.381 | 2.374 |
| **Sul** | **13.714** | **9.384** | **1.021** | **1.021** |
| **Centro-Oeste** | **19.583** | **10.891** | **1.571** | **1.556** |

Fonte: Modificada de IBGE (2005).

A casca do maracujá não deve mais ser considerada como resíduo industrial, uma vez que suas características e propriedades funcionais podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos (MEDINA, 1980). Esta casca constitui cerca de 53% do peso total do fruto, apresentando, em sua constituição química, razoáveis teores de nutrientes. As sementes e o suco representam 21% e 26%, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2002).

Quanto à composição de fibras, a casca do maracujá constitui produto vegetal rico em fibra do tipo solúvel (pectinas e mucilagens), benéfica ao ser humano. Ao contrário da fibra insolúvel (contida no farelo dos cereais) que pode interferir na absorção do ferro, a fibra solúvel pode auxiliar na prevenção de doenças (ROCCO, 1993; BINA, 2004).

A Figura 2.6 apresenta grupos, escalas, classe, defeitos graves e defeitos leves das diferentes espécies de maracujá.

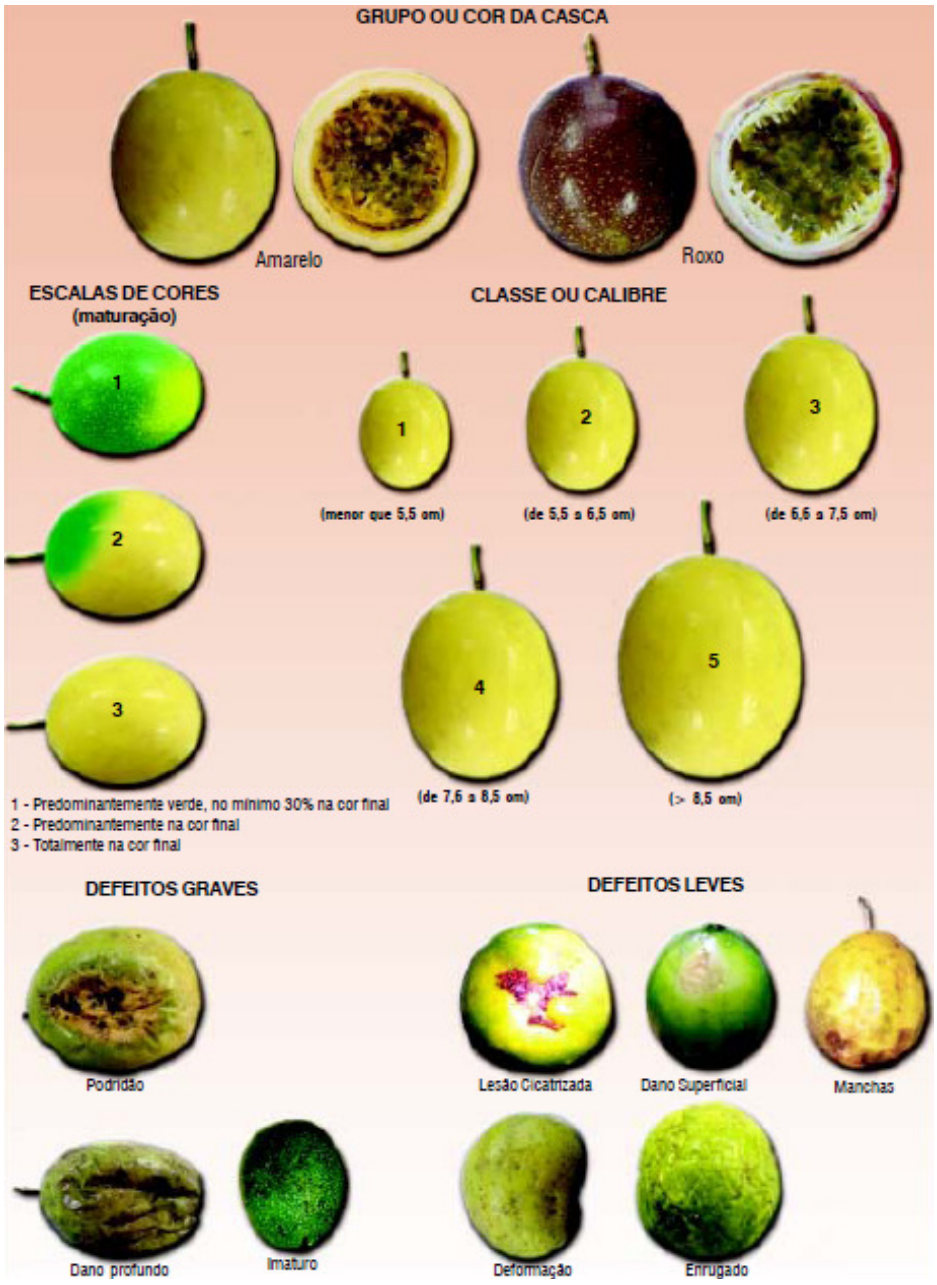


Figura 2.6 - Classificação para o maracujá (Frutisséries, 2002).

Otagaki e Matsumoto (1958), analisaram a composição da casca de maracujá amarelo desidratada (16,8% de umidade) e encontraram valores de 4,6% de proteínas, 0,3% de extrato etéreo, 25,70% de fibra bruta e 20,00% de pectina (CÓRDOVA et al. 2005).

Também determinaram a composição da casca, encontrando em base seca, 8,68% de cinzas, 26,41% de fibra bruta, 1,5% de proteína. Matsuura (2005), caracterizou o albedo do maracujá

amarelo, os valores encontrados por este autor em base seca foram de 6,8% de proteínas, 1,3% de lipídeos, 7,7% de cinzas, 67,5% de fibra e elevado teor de pectina (27,8%), com baixo grau de esterificação. Abud et al. (2007), visando produzir enzimas pectinases, caracterizou o resíduo desidratado do processamento do maracujá (casca, albedo e sementes), e obtiveram 9,01% de pectina, 4,41% de cinzas, 47% de fibra, 0,41% de proteína bruta. Oliveira (2007), também caracterizou a casca do maracujá, obtendo em base úmida, aproximadamente 92% de umidade, 0,66% de cinzas, um teor de 1,09% em açúcares redutores e 3,1% de pectina.

## 2.4 – Enzimas

Atualmente, o uso de complexos enzimáticos produzidos naturalmente pelo processo de FES está revolucionando o aproveitamento e disponibilidade do alimento balanceado na indústria de alimentação animal. Cada vez mais fica comprovado que o uso destes complexos é fundamental para seguir o conceito evolutivo da indústria, que envolve a redução de custos e a melhora dos parâmetros produtivos dos animais (SANTOS, 2007).

Uma das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos são a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas de reação e menores problemas ambientais e toxicológicos. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. As seis classes representativas das enzimas industriais são: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

As enzimas são componentes de todos os tipos de células, animal, vegetal e microbiana. Os organismos superiores foram os primeiros utilizados como fontes de enzimas. O efeito do amaciamento da carne por mamão (papaína) levou a um expressivo cultivo da planta com propósito de produzir a enzima papaína da família das proteases. Outras enzimas são extraídas de órgãos animais, como, tripsina e quimotripsina do pâncreas de porco. Essas fontes apresentam algumas desvantagens tais como: o tecido utilizado na extração da enzima pode sofrer limitações de suprimento quando a demanda aumenta, requer cultivos de grandes áreas e estão sujeitas a intempéries (COURI, 1993).

Reconhecidamente, as células microbianas são importantes produtoras de enzimas, oferecendo uma série de vantagens: a produção pode ser aumentada facilmente, apresenta natureza diversa permitindo a produção de várias enzimas, são relativamente fáceis de serem cultivadas em

ambiente controlado e são altamente sensíveis à alterações genéticas, o que permite obtenção de linhagens melhoradas quanto à produção e qualidade da enzima. O processo fermentativo permite também a produção de enzimas com consistente produtividade e menor custo (NOSB, 1999).

Os micro-organismos que produzem enzimas comerciais são, na maioria das vezes, fungos como *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor meihei* e leveduras como *Candida* spp e *Saccharomyces* spp. Várias pesquisas têm sido conduzidas com fungos geneticamente modificados e outros micro-organismos com finalidade de se obter um aumento no rendimento e na estabilidade das enzimas (NOSB, 1999).

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agridem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais. Muitos tratamentos químicos são realizados em altas temperaturas e pressões, utilizando ácidos fortes ou álcalis que significam perigo ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente (BON, 2002; MITIDIERI et al., 2002).

O desenvolvimento do processo de produção de enzimas, em escala industrial, de qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem, o meio de produção, o processo de fermentação, os métodos de recuperação e a demanda de mercado.

### 2.4.1 - Obtenção de enzimas

O processo de produção industrial de enzimas de origem microbiana pode ser dividido em duas etapas: processo fermentativo e processo de separação e recuperação das enzimas a partir da fermentação (RODARTE, 2005).

O processo fermentativo utilizado industrialmente é realizado baseado em condições otimizadas. A linhagem microbiana deve ser cuidadosamente mantida e estocada e o meio de cultura utilizado é de grande importância para a produção de enzimas. De modo geral, o meio contém fontes de carbono, fontes de nitrogênio, fatores de crescimento e micronutrientes podendo utilizar também indutores enzimáticos. A fermentação industrial é realizada em fermentadores

operados de modo descontínuo, mecanicamente agitados com sistemas de aquecimento e refrigeração, além de sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e espuma (SANT ANNA JR., 2001).

O processo de separação e recuperação das enzimas depende inicialmente do tipo de enzima de interesse, intracelular ou extracelular. Para as enzimas extracelulares, o processo de recuperação tem início no líquido fermentado ou, no caso de fermentações em meio sólido, no líquido de extração do substrato. Para as enzimas intracelulares é necessário aplicar algum método prévio de ruptura celular a fim de liberar as enzimas. Em todas as etapas de separação e recuperação das enzimas é necessário manter condições não desnaturantes, isto é, condições nas quais as enzimas não perderão atividade. O custo da produção de enzimas intracelulares é maior que o de enzimas extracelulares e, como conseqüência, as intracelulares geralmente são utilizadas imobilizadas para que possa realizar a recuperação após o processo. O custo de produção de enzimas está associado não só ao tipo de excreção celular, mas também ao grau de pureza requerido no processo (PASTORE, 2002).

As enzimas produzidas e secretadas pela célula, ou seja, as exoenzimas, possuem grande interesse comercial, pois sua extração e purificação são menos onerosas (MARQUART et al., 2002).

As enzimas microbianas apresentam várias vantagens sobre as enzimas de origem animal ou de plantas, tais como custos de produção relativamente baixos, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, características físico-quimicas diferentes, geralmente relacionadas ao hábitat e fisiologia do micro-organismo produtor (por exemplo organismos termofílicos produtores de enzimas termorresistentes), possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável. Enzimas com a mesma forma de atuação sob o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a seleção de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas (PASTORE, 2002).

### 2.4.2 – Invertases

Uma das primeiras carboidrases a ser estudada na história de enzimonologia foi a invertase. Em 1828, identificou–se pela primeira vez sua atividade observando-se que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso. A partir daí, a grande quantidade de experimentos realizados sobre a invertase favoreceu seu uso como enzima modelo para estudos de

catálise enzimática. No século XX teve início a sua comercialização, sendo uma enzima versátil que pode ser utilizada em diversos processos industriais (VITOLO et al., 2004).

Também conhecida como β–D frutofuranosidase, a invertase hidrolisa a ligação osídica (tipo α-β) de carboidratos possuidores de um radical β-fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose o substrato preferencial. O mecanismo de reação é baseado no esquema mostrado na Figura 2.7.

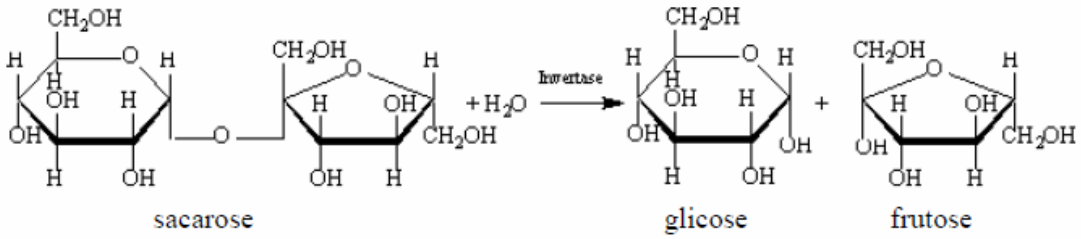


Figura 2.7 - Mecanismo de reação catalisada pela invertase (RUSTIGUEL, 2009).

Esta reação catalítica, geralmente ocorre em pH entre 4,6 e 5,0 e temperatura entre 35ºC e 50ºC, com concentração de substrato da ordem de 120 g/L. Acima desta concentração a solução de sacarose tem a viscosidade aumentada reduzindo a atividade enzimática na presença de água (VITOLO et al., 2004).

O produto final da hidrólise da sacarose são os monossacarídeos glicose e frutose, em que a frutose pode ser utilizada como adoçante para diabéticos, além da sua constituição líquida não cristalizável muito importante para confeitarias (ALBERTO et al., 2004).

Existem diferentes isoformas de invertases que diferem quanto ao seu pH ótimo de atividade, podendo ser ácidas, neutras e alcalinas. As formas ácidas têm sido encontradas no vacúolo, ao passo que as neutras e alcalinas no citoplasma. Estas diferenças não estão esclarecidas, mas parecem estar relacionadas com a entrada da sacarose em diferentes vias de utilização (STURM e TANG 1999).

Atualmente as invertases estão incluídas na família GH32 das glicosidases, na qual são encontrados 370 membros de origem vegetal, fúngica e bacteriana. Resíduos como aspartato localizado na região N-terminal têm sido responsabilizados pelo mecanismo de reconhecimento específico das glicosidases (ALBERTO et al., 2004).

Entre os vegetais as invertases têm sido encontradas em diversos representantes atuando em diversos processos metabólicos podendo estar presente algumas isoformas. Sturm e Tang (1999) conseguiram identificar três tipos de invertases: invertase ácida solúvel, invertase I e invertase II

A invertase também influência no transporte do floema (conduz carboidrato e outras moléculas orgânicas das folhas para as outras partes da planta), pois ele transporta grande quantidade de sacarose que é um ótimo substrato para invertase. Em órgãos com descarregamento apoplástico, é necessário que a sacarose seja mantida em baixas concentrações para que ocorra uma chegada contínua desses nutrientes às células receptoras. As invertases e os carreadores de açúcares também podem funcionar como mecanismos de recuperação de açúcares que se perdem para o apoplasto (PATRICK, 1997).

O descarregamento apoplástico é o acúmulo de açúcares solúveis reservado para situações especiais, sendo comum em monocotiledôneas, órgãos de reserva que acumulam mono e dissacarídeos ao invés de polímeros, frutos e em sementes em desenvolvimento (PERES, 2006).

Desde sua descoberta em 1828, as invertases vêm sendo alvo de intensas investigações principalmente aquelas obtidas a partir de micro-organismos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SHAFIQ et al., 2002), que é o micro-organismo mais bem caracterizado quanto à produção de invertase. Para esta levedura em especial, a invertase apresentou pH ótimo de atividade entre 3,5 e 6,0, dependendo da concentração do substrato e dos tampões utilizados (SIMIONESCU et al., 1987; WISEMAN e WOODWARD, 1975).

Entre os micro-organismos os fungos filamentosos têm se destacado quanto à produção de enzimas de interesse industrial. Enzimas que possuam alta especificidade e que possam ser usadas em pequenas quantidades são extremamente interessantes sob o ponto de vista biotecnológico. Desta forma, a produção de invertases por fungos filamentosos também tem sido investigada como, por exemplo, em *Aspergillus niger* (RASHID e SIDDIQUI, 1998), *Aspergillus japonicus* (CHENG et al., 2005), *Aspergillus ochraceus* (GUIMARÃES et al., 2007), *Rhodotorula glutinis* (RUBIO et al., 2002) e *Thermomyces lanuginosus* (CHAUDHURI et al., 1999).

Industrialmente as invertases podem ter várias aplicações como, por exemplo, em grandes confeitarias para hidrolisar a sacarose produzindo moléculas de glicose e frutose (MONTIEL-GONZALES et al., 2002).

A frutose é muito mais atrativa para propósitos industriais que a sacarose, destacando-se sua constituição líquida e não cristalizável. Também tem sido empregada no processo de fermentação do melaço da cana para produção de etanol (SHAFIQ et al., 2002; ALBERTO et al., 2004).

As invertases podem ainda ser utilizadas para a produção de frutooligossacarídeos (FOS) que são açúcares não metabolizados pelo organismo humano, não apresentando valor calórico (MOLIS et al., 1996). São considerados prebióticos (ingredientes ou grupo de ingredientes

alimentares que não são digeridos pelas enzimas digestivas normais, mas que atuam estimulando seletivamente o crescimento e (ou) a atividade de bactérias benéficas no intestino, cuja ação final é melhorar a saúde do hospedeiro) promovendo vários benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer. Os FOS, principalmente de origem microbiana da fermentação de sacarose, têm atraído atenção especial e são importantes principalmente por suas propriedades funcionais, mais do que pela sua doçura (FERNÁNDEZ et al., 2004).

### 2.4.3 – Proteases

São enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (RAO et al., 1998). As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A seqüência destes aminoácidos pode conferir às proteínas atividades metabólicas específicas. A seqüência de aminoácidos é determinada pelo genoma da célula. Segundo Campbell (2000), quanto maior forem as forças que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas, mais difícil será a ação das proteases.

Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carbonil peptídico e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida conforme demonstrado na Figura 2.8.

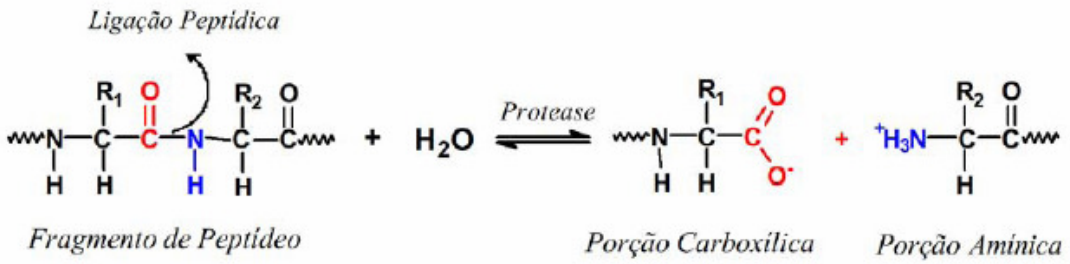


Figura 2.8 - Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (ADRIANO, 2008).

As proteases têm importante papel em todos os processos fisiológicos, indo da quebra geral de proteína para nutriente à regulação da morte celular programada (POZA et al., 2001).

Encontram-se em todos os organismos vivos, uma vez que conduzem funções metabólicas e essenciais. De maneira geral, as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de várias proteínas

para moléculas menores e serão subseqüentemente absorvidas pelas células, enquanto as proteases intracelulares têm importante papel na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998).

A maior aplicação de proteases ocorre na indústria de detergentes, processamento de carne e queijo, recuperação de prata em filme fotográfico, produção de medicamentos, processamento de resíduos proteináceos, síntese de peptídeos (ANDRADE et al., 2002; BARTHIAR et al., 2002; GERMANO et al., 2003; GHORBEL et al., 2003; LONGO et al., 1999).

As proteases vegetais mais conhecidas são a papaína e a bromelina, das quais a papaína tem longa história de uso. São ativas em pH 5,0 a 9,0 e estáveis às temperaturas de 80ºC a 90ºC. A performance da enzima depende da fonte da planta, das condições climáticas para o crescimento e os métodos usados para sua extração e purificação (RAO et al., 1998).

As proteases de origem animal podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, as mais empregadas são a tripsina e a quimotripsina (NETO, 2001; SAID, 2002) e também na indústria alimentícia (RAO et al., 1998). As de origem microbiana são preferidas às de origem animal ou de plantas por possuir todas as características desejadas para aplicação em biotecnologia (RAO et al., 1998).

As proteases produzidas por determinado organismo podem inibir a ação de outras enzimas, uma vez que estas são proteínas (AZEREDO et al., 2001; RAJMOHAN et al., 2002). Dividem-se em três grupos: proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas possuem atividade em pH 2, 0 a 5,0 e as neutras possuem atividade em pH 6,0 a 9,0. O terceiro grupo, é formado pelas proteases alcalinas que tem atividade em pH 9,0 a 11,0 (GUERRA, 1991).

A nomenclatura das peptidases é difícil, sua especificidade dificulta a definição, que é dependente da natureza de vários resíduos de aminoácidos ao redor da ligação peptídica serem hidrolisados e também da conformação da cadeia polipeptídica do substrato. Em conseqüência disso, a classificação envolvendo critérios adicionais do mecanismo de catálise é utilizada. Os termos protease e proteinase ainda são empregados para a capacidade da enzima hidrolisar peptídeos, mas sugere-se que sejam substituídos, respectivamente, por exopeptidases e endopeptidases, ou simplesmente peptidases (NC-IUBMB, 2005).

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir proteases por processos de fermentação devido ao seu crescimento rápido. Micro-organismos também são preferidos em relação a plantas e animais, devido à sua facilidade de manipulação genética, gerando novas enzimas com uma característica específica ou simplesmente para superprodução da enzima (LUNA et al., 2002; POZA et al., 2001; RAO et al., 1998).

As proteases microbianas são importantes porque elas atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia (BARATA et al., 2002). As alcalinas comerciais de micro-organismos geralmente têm atividade máxima em pH variando de 8,0 a 12,0 (GUPTA et al., 2002; RAO et al., 1998).

As proteases de origem bacteriana são muito usadas na indústria, porém requerem custo intensivo na metodologia de filtração para obter a preparação enzimática livre do micro-organismo, enquanto que, nas proteases de origem fúngica, o micélio é facilmente removido por filtração (PHADATARE et al., 1993).

As proteases possuem grande aplicação em formulações para uso hospitalar, devido à sua capacidade de digerir e dissolver resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, suor e outros). As formulações são empregadas para higienizar as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruírem canais com resíduos coagulados, eliminar resíduos fecais dos canais e superfícies de fibroscópios, remover contaminantes da rouparia hospitalar (MITIDIERI et al., 2002).

A proteólise tem grande influência no desenvolvimento do sabor e aroma e na textura de muitas variedades de queijos. Os aminoácidos livres contribuem diretamente, ou como substrato para outros compostos, que também contribuem para o desenvolvimento do sabor e aroma durante o processo de maturação de queijos (FOX e WALLACE, 1997; KILCAWLEY et al., 2002).

As proteases são também empregadas na produção industrial de biscoitos como condicionadores de massa que irão enfraquecer o glúten, tornando a massa adequada às etapas de laminação, formação e cozimento, podendo ser usadas para substituir o bissulfito de sódio (BRUNO, 1989).

Na panificação, também são utilizadas para hidrolisar o glúten para a obtenção de massa macia. As características da massa dependem do estado das proteínas presentes.

Na indústria de carne, as proteases são utilizadas no processo de amaciamento (GERMANO et al., 2003). As enzimas proteolíticas degradam a estrutura das proteínas, sendo obtidas a partir de plantas ou micro-organismos (BELITZ e GROSCH, 1999).

As proteases derivadas de plantas, como a bromelina (abacaxi) e a ficina (figo) são usadas na tenderização de carnes. Entretanto, essas enzimas degradam a textura da carne devido à sua ampla especificidade pelos substratos, conduzindo a um gosto desagradável devido ao excesso de tenderização (CRONLUND e WOYCHIK, 1986).

As proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de micro-organismos patogênicos. Esses fatores tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (CAMPBELL, 2000; KOELSCH et al., 2000; VERMELHO et al., 1996; VERMELHO et al., 2002). Como exemplo, podem ser citadas as pesquisas de inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que esta enzima é essencial para a produção de novas partículas virais nas células infectadas (CAMPBELL, 2000).

### 2.4.4 - Pectinases

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são os catalisadores responsáveis pela pectólise, um fenômeno associado a muitos processos biológicos que envolvem os vegetais superiores (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

As pectinases têm como substratos naturais as substâncias pécticas, que são polissacarídeos muito difundidos na natureza e que, juntamente com outros componentes como amido, celulose, hemicelulose e lignina, formam o material estrutural da parede celular das plantas (REXOVÁ-BENKOVÁ e MARKOVIC, 1976; WHITAKER, 1984).

Quimicamente, as substâncias pécticas são heteropolissacarídeos ramificados, cuja cadeia principal é constituída por resíduos de ácido D-galacturônico, parcialmente esterificados com grupos metila, e polimerizados pelas ligações glicosídicas α-1,4 (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

A estrutura química das substâncias pécticas está ilustrada na Figura 2.9.

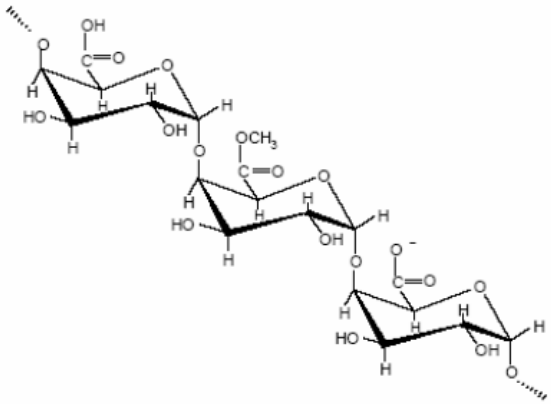


Figura 2.9 – Estrutura primária das substâncias pécticas (HOUDERT e MULLER, 1991).

Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das substâncias pécticas, proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e traços de 2-O-metilfucose também podem ser encontrados (JARVIS, 1984; LEITÃO *et al*., 1995).

As pectinas contribuem para a adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular. Além de seu papel importante no crescimento das células, elas estão envolvidas em interações com agentes patogênicos, e a sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais em geral, durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (BRANDÃO e ANDRADE, 1999).

Segundo Alkorta e colaboradores (1998), a Sociedade Americana de Química classificou as substâncias pécticas em quatro grupos principais:

- Protopectinas: são altamente esterificadas, insolúveis em água e por aquecimento, em presença de ácidos diluídos formam ácidos pectínicos ou ácidos pécticos;
- Ácidos pécticos: cadeias de ácidos D-galacturônicos livres de metoxilas, em presença de água formam soluções coloidais. Os sais de ácidos pécticos são conhecidos como pectatos;
- Ácidos pectínicos: substâncias coloidais, não necessariamente solúveis em água, constituídas por ácidos poligalacturônicos com número significativo de metoxilas na forma de ésteres. Os sais de ácidos pectínicos são chamados de pectinatos;
- Pectinas: ácidos pectínicos solúveis em água, com grau de esterificação e grau de neutralização variável.

De acordo com Rosenbohm e colaboradores (2003), pectinas com alto grau de metoxilação (maior que 7%) formam gel em meio ácido com adição de açúcares, constituindo a base de geléias e conservas de frutas; enquanto as pectinas com baixo grau de metoxilação (menor que 7%) formam gel na presença de cátions divalentes ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$), e são utilizadas na produção de geléias especiais para fins dietéticos.

A pectina é um componente da fração fibra alimentar, classificada como fibra solúvel devido à sua solubilidade em água (TRUSWELL, 1997).

Altos teores de pectina são encontrados principalmente nos frutos cítricos, em especial no albedo (BELITZ e GROSCH, 1988).

Nos processos industriais, as diferentes formas de ação das enzimas pectinolíticas sobre as substâncias pécticas são um parâmetro importante para conduzir ao aproveitamento total da capacidade catalítica destas enzimas.

As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BRAVO *et al*., 2000; TEIXEIRA *et al*., 2000).

Durante meados da década de 30, quando as indústrias de frutas começaram a produzir suco, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se atingir uma clarificação aceitável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases, celulases e hemicelulases de micro-organismos (*Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp.), juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, ajudaram a superar estas dificuldades (BHAT, 2000).

Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas, a principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração (MARTIN, 2006).

As vantagens do uso de pectinases em sucos incluem, por exemplo, utilização em sucos clarificados, não clarificados, concentrados, polpas e purês; redução do tempo total para extração do suco auxilia na produção de sucos e concentrados estáveis com redução de resíduos da polpa; custos de produção reduzidos e possibilidade de processamento de diferentes frutas (UENOJO e PASTORE, 2007; KASHYAP et al., 2001).

Na produção de suco de maracujá as enzimas têm sido adicionadas em uma etapa precedente à filtração, quando há a hidrólise enzimática da estrutura vegetal resultando na degradação dos sólidos em suspensão e diminuição da viscosidade, assim agiliza-se todo o processo (PAULA et al., 2004).

A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco e reduz o tempo de clarificação. Preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina esterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (BHAT, 2000).

Óleos de canola, de coco, semente de girassol e oliva são tradicionalmente produzidos por extração com solventes orgânicos, mais comumente o hexano. A pectinase pode ser usada para extrair óleo vegetal em um processo aquoso, liquefazendo os componentes estruturais da parede celular das sementes que contém o óleo (KASHYSP et al., 2001).

Na indústria têxtil, pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami (BRAVO et al., 2000).

### 2.4.5 – Amilases

As amilases começaram a ser produzidas no começo do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. O pesquisador Takamine desenvolveu o primeiro método para a produção microbiológica, em grande escala, da enzima α-amilase fúngica, denominada Takadiastase, citado por Soccol et al. (2005). Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados. Dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α-amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo.

As enzimas amilolíticas compreendem as hidrolases, que hidrolisam as moléculas de amido em produtos, como dextrinas, e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003).

Conforme o seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α-1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (GUPTA et al., 2003).

Para a conversão eficiente do amido em compostos de baixa massa molecular, é necessária uma ação coordenada das enzimas citadas anteriormente na Figura 2.10. Algumas dessas enzimas são descritas a seguir em relação a sua especificidade:

A Figura 2.10 apresenta um resumo das enzimas que degradam o amido.

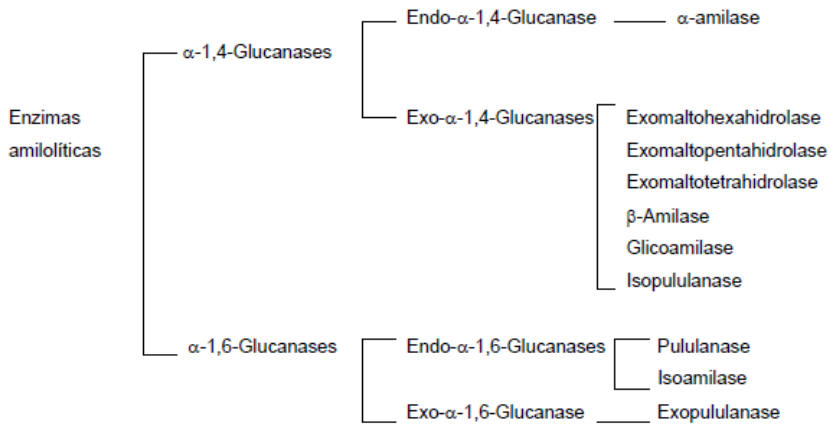


Figura 2.10 - Classificação das enzimas amilolíticas (NIGHAM e SINGH, 1995).

As α-amilases (EC 3.2.1.1, α-1,4-D-glicano glicanoidrolase) correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α-1,4 e liberando maltoligossacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α-amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do amido produzindo glicose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato produzindo, predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis pela rápida redução da viscosidade do amido em comparação com as primeiras (DECLERCK et al., 2000).

As β-amilases (EC 3.2.1.2, α-1,4-D-glicano-maltoidrolase) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α-1,4, a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, separando-a em duas unidades de glicose, por inversão, na forma de β-maltose (HARGER, 1982).

Esse tipo de amilase está distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em β-maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação.

As glicoamilases (EC 3.2.1.3, α-1,4-D-glicano-glicoidrolase) são enzimas extracelulares que rompem as ligações α-1,4 e α-1,6 do amido; esta última em menor velocidade, a partir da extremidade não redutora, levando à produção de glicose (LIN et al, 1998; PANDEY et al., 2005).

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

períodos. Ocorrem em muitos micro-organismos, principalmente em alguns fungos (*Aspergillus*, *Rhizopus*), bactérias e trato digestivo de mamíferos (CRUZ e CIACCO, 1980).

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases, conforme mencionado por Cherry e colaboradores (2004) e Saxena et al. (2007), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim (HAQ et al., 2003; KUNAMNENI et al., 2005; DJEKRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006; KONSOULA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007).

A indução e a repressão catabólicas são os dois fatores principais que controlam a síntese da amilase em micro-organismos. De acordo com Gancedo (1992), a utilização de glicose e outras fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprime a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono.

O maior mercado para a aplicação das α-amilases está na produção de amido hidrolisado na forma de glicose e frutose. O amido é convertido em xarope de milho com alto teor de frutose. Devido a sua alta propriedade adoçante, a glicose e a frutose são usadas como adoçantes na indústria de refrigerantes. O processo de liquefação do amido requer o uso de α-amilase juntamente com a glicoamilase que necessariamente devem apresentar elevada termoestabilidade. O uso destas enzimas na liquefação do amido tem sido amplamente estudado e comentado (PANDEY et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura do miolo de pães. O emprego dessas enzimas na preparação do pão pode retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão "fresco" por mais tempo. A α-amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglicosidase confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração (NOVOZYMES, 2005).

Durante a germinação da cevada para a produção de malte, que constitui um dos ingredientes para a produção de cerveja, são produzidas enzimas amilolíticas, que são importantes durante a fermentação. As amilases degradam as frações de amilose e amilopectina do amido em uma mistura de maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e dextrinas, importantes para a fermentação da cerveja pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (REED, 1975; WAINWRIGHT, 1995).

As amilases fúngicas, na indústria cervejeira, convertem substratos amiláceos a açúcares antes da fermentação alcoólica, além de controlarem a turbidez devido ao amido presente e são utilizadas na produção de cervejas livres de dextrinas (REED, 1975; WAINWRIGHT, 1995).

### 2.4.6 – Celulases

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante do globo terrestre e possui importância mundial como matéria-prima industrial e fonte de energia renovável (TEERI, 1997; JOSHI e MANSFIELD, 2007).

A celulose é um polímero linear formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β – 1,4 (Figura 2.11). As cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias (IGARASHI et al.,2007). A celobiose, um dímero de glicose, é a unidade repetitiva do polímero (ARISTIDOU e PENTILLÄ, 2000).

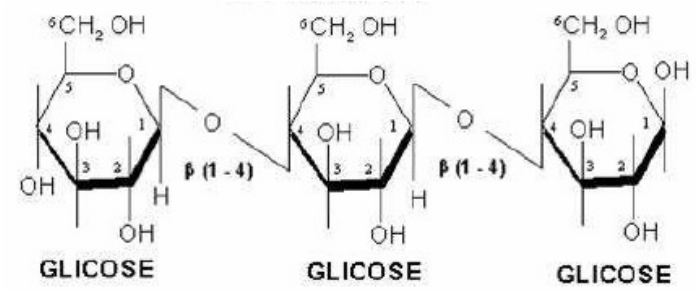


Figura 2.11 – Estrutura química da celulose (FRANCO, 2009).

As microfibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo. Estas regiões são denominadas regiões cristalinas. A celulose apresenta também regiões com menor grau de ordenação, denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência à hidrólise ácida ou enzimática (BON et al., 2008).

Diferentemente do amido, um polímero de reserva, a celulose possui papel estrutural, protegendo a célula vegetal contra a ação da pressão osmótica e estresses mecânicos (BÉGUIN e ALBERT, 1994).

Nos ambientes naturais a celulose é digerida exclusivamente por micro-organismos, distribuídos entre o grupo das bactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é

realizada pela atuação de um complexo enzimático, as celulases (Figura 2.11). Essas enzimas fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações β – 1,4 entre as moléculas de glicose (HAICHAR *et al.,* 2007).

O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4- β-D-glucanglucanohidrolase), exoglucanases (exo 1,4-β-D-glucan-celobiohidrolase) e β-Dglucosidases ou celobiases (JUHÁSZ *et al*., 2005).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações β – 1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004).

A carboximetilcelulose é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO e TAN, 2002).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β – glucosidases (BON et al., 2008).

As β – glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002).

O uso de resíduos e biomassa celulósica de baixo custo na produção de celulases, além de reduzir bastante o valor gasto com a produção dessas enzimas, pode também resultar em uma produtividade equivalente àquela obtida em outras fontes de carbono como a lactose (ADSUL *et al*., 2004).

Carboidratos ou seus derivados são indutores de grande parte das enzimas celulolíticas, por isso, a fonte de carbono utilizada é de grande importância na produção de enzimas. Altos rendimentos de celulases têm sido obtidos pela utilização de fontes de carbono contendo celulose (JUHÁSZ *et al*., 2005).

Muitos micro-organismos podem ser cultivados em bagaço de cana de açúcar para a produção de celulases. O cultivo pode ser realizado por processos de fermentação líquida ou

fermentação sólida. Outro exemplo de resíduo que tem sido utilizado na produção de celulases por micro-organismos é o farelo de trigo. Este resíduo é constituído principalmente de amido, glucuronoarabinoxilanas, celuloses, β-glucanas, proteína e lignina. (PALMAROLA-ADRADOS *et al*., 2005).

As celulases possuem ainda grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulases e pectinases, na extração e clarificação de sucos de fruta. Após o esmagamento das frutas, essas enzimas são utilizadas para aumentar a liquefação por meio da degradação da fase sólida. As celulases têm sido utilizadas também no processamento de ração animal. O tratamento de silagem com essas enzimas é benéfico, pois aumenta a sua digestibilidade (BÉGUIN e AUBERT, 1994).

A utilização de celulases na ração animal melhora a sua qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos (BHAT, 2000).

A utilização de celulases na indústria têxtil vem aumentando nos últimos anos e atualmente estas enzimas correspondem ao terceiro grupo mais utilizado. A principal vantagem do seu uso é a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade (FRANCO, 2009).

As celulases têm sido utilizadas também na fabricação de detergentes, pois são capazes de alterar a estrutura das fibras de celulose. A adição dessas enzimas nos detergentes facilita a remoção da sujeira e contribui para a manutenção da maciez, brilho e cor dos tecidos (BHAT, 2000).

Na Tabela 2.7 são apresentados os resultados de alguns trabalhos desenvolvidos na produção de invertase, protease, pectinase, amilase e celulase, enfocando o tipo de substrato, o tipo de fermentação, o micro-organismo e a máxima atividade enzimática obtida.

Tabela 2.7 - Resumo de trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas, utilizando tipos diferentes de fermentação, substratos e microrganismos.

| **Enzima** | **Substrato** | **Tipo de fermentação** | **Microrganismo** | **Atividade enzimática** | **Referência** |
|---|---|---|---|---|---|
| α-amilase | Amido | Submersa | leveduras | 1,14 U/mL | Scariot et al., 2009 |
| Amilase | Bagaço de laranja e farelo de arroz | Estado sólido | *Aspergillus awamori* | 31,78 U/mL | Hermann et al., 2003 |
| Pectinases | Pectina | Submersa | leveduras | 4,104 U/mL | Albuquerque et al., 2009 |
| Poligalacturo-nases | Pedunculo do caju | Semi-sólida | *Aspergillus niger mutante* CCT 0916 | 16,0 U/g | Santos, 2007 |
| Proteases | Resíduos industriais de couro | Submersa | *Bacilus sp* | 0,388 U/mL | Santos et al., 2009 |
| Proteases | Amido solúvel e gelatina | Submersa | *Lentinus citrinus* DPUA 1535 | 32,3 U/mL | Kirsch et al, 2009 |
| Invertases | Farelo de trigo | Semi-sólida | *Alternaria sp.* | 20 U/mL | Sangaletti et al, 2003. |
| Celulases | Soro de leite | Submersa | *Aspergillus niger* | 408,20 U/mL | Cardoso et al., 2008 |
| Invertases | | | | 512,36 U/mL | |
| Celulases | Bagaço de cana | Submersa | *Aspergillus niger* | 0,322 U/mL | Aguiar et al., 2008 |
| | Palha de milho | | | 0,536 U/mL | |
| | Palha de trigo | | | 0,469 U/mL | |
| Celulases | Serragem de eucalipto | Estado sólido | *Tricoderma sp.* E-13 | 1,38 U/g | Seguenka et al, 2009 |
| Pectinases | Resíduos de maracujá | Semi-sólida | *Aspergillus niger mutante* CCT 0916 | 253,75 U/g | Souza et al., 2009 |

O processo de FES permite a produção de complexos enzimáticos únicos que podem ser utilizados na indústria de alimentação animal para melhorar o desempenho e reduzir os custos de produção. Este processo pode ser também a chave para a conversão de fibras em proteínas, uma vez

que diferentes materiais fibrosos podem ser utilizados como ingredientes de ração sendo possível melhorar sua digestibilidade. A partir deste conceito, as matérias-primas podem ser usadas como ingredientes de ração, assim como substratos para o processo de fermentação em estado sólido.

Trabalhos rescentes mostram a viabilidade do uso de várias matérias-primas testadas, de forma a maximizar a síntese desejada. Vários tipos de resíduos agro-industriais após despolpação, também, podem ser utilizados na fementação em estado sólido (FES). Outras enzimas e substâncias, de interesse de diferentes segmentos industriais, podem ser obtidas por esse tipo de processo, em fábricas de menor porte, porém de elevado nível tecnológico, com matérias-primas regionais.

Esse fator pode se tornar uma vantagem competitiva, em comparação com empresas que utilizam a fermentação submersa.

O estudo da FES se torna de extrema importância do ponto de vista social, econômico e ambiental, visto que o processo consiste em degradar substâncias tóxicas perigosas liberadas no ambiente em substâncias menos ou não tóxicas (PINTO et al., 2005).

## 2.5 – Crescimento celular e geração de produtos na FES

Uma das grandes dificuldades que se tem na FES é a mudança de escala, ou seja, a reprodução de resultados obtidos em laboratório em processos que envolvam reatores de dimensões capazes de gerar uma quantidade de produto satisfatória para produção industrial. Parte desta dificuldade pode ser explicada por fatores como (MITCHELL et al., 1991):

- Complexidade geométrica e não distribuição homogênea do meio sólido no reator;
- Limitações associadas à transferência de massa entre a superfície do meio e as células microbianas;
- Limitações associadas à quantificação dos gradientes de concentração ligado à distribuição não homogênea do material;
- Heterogeneidade estrutural e nutricional dos sub-produtos agro-industriais utilizados como meio para FES.

Parte desta dificuldade é minimizada pela quantificação da fermentação por modelos empíricos e pelo desenvolvimento de modelos fenomenológicos, representativos da FES em termos de parâmetros termodinâmicos, equações descritivas de fenômenos intraparticulas e transformações que ocorrem no interior das próprias células.

Entre os modelos empíricos de uso comum estão os modelos de Gompertz e o Logístico, que descrevem o crescimento não associado ao consumo de substrato. O modelo de Gompertz define o crescimento em termos de quatro parâmetros que descrevem o aumento logarítmico da população (parâmetro $A_A$), a velocidade relativa máxima de crescimento (parâmetro B) e o tempo necessário para atingir esta velocidade máxima (parâmetro C), conforme mostra a Equação (2.1) (NAKASHIMA et al., 2000).

$$\ln\left(\frac{X}{Xo}\right) = A_A \exp\left\{-\exp\left[-B*(t-C)\right]\right\} \qquad (2.1)$$

Outro modelo que também descreve um crescimento celular assintótico com fase lag e fase de estabilização da massa celular é o modelo logístico. A Equação (2.2) representa este modelo (MARQUES et al., 1981; HAMIDI-ESFAHANI et al., 2007):

$$\ln\left(\frac{X}{Xo}\right) = \frac{A_A}{1+\exp(D-B*t)} \qquad (2.2)$$

Sendo $A_A$ o parâmetro que descreve o aumento logarítmico da população, D o parâmetro associado ao crescimento celular e B parâmetro adimensional.

Tanto os parâmetros dos modelos logístico, como os parâmetros do modelo de Gompertz estão associados ao tempo da fase lag ($t_l$) e a velocidade máxima de crescimento celular ($\mu_m$) conforme mostra a Tabela 2.8 e a Figura 2.12, sendo e a base de logaritmo.

Tabela 2.8 – Parâmetros dos modelos logístico e de Gompertz associados ao tempo da fase lag ($t_l$) e a velocidade máxima de crescimento celular (B).

| Logístico | Gompertz |
|---|---|
| $\mu_m = \frac{A_A * B}{4}$ | $\mu_m = \frac{A_A * B}{e}$ |
| $t_l = \frac{D-2}{B}$ | $t_l = \left(M - \frac{1}{B}\right)$ |

Fonte: (TONG-JIANG et al., 2009; NAKASHIMA et al., 2000)

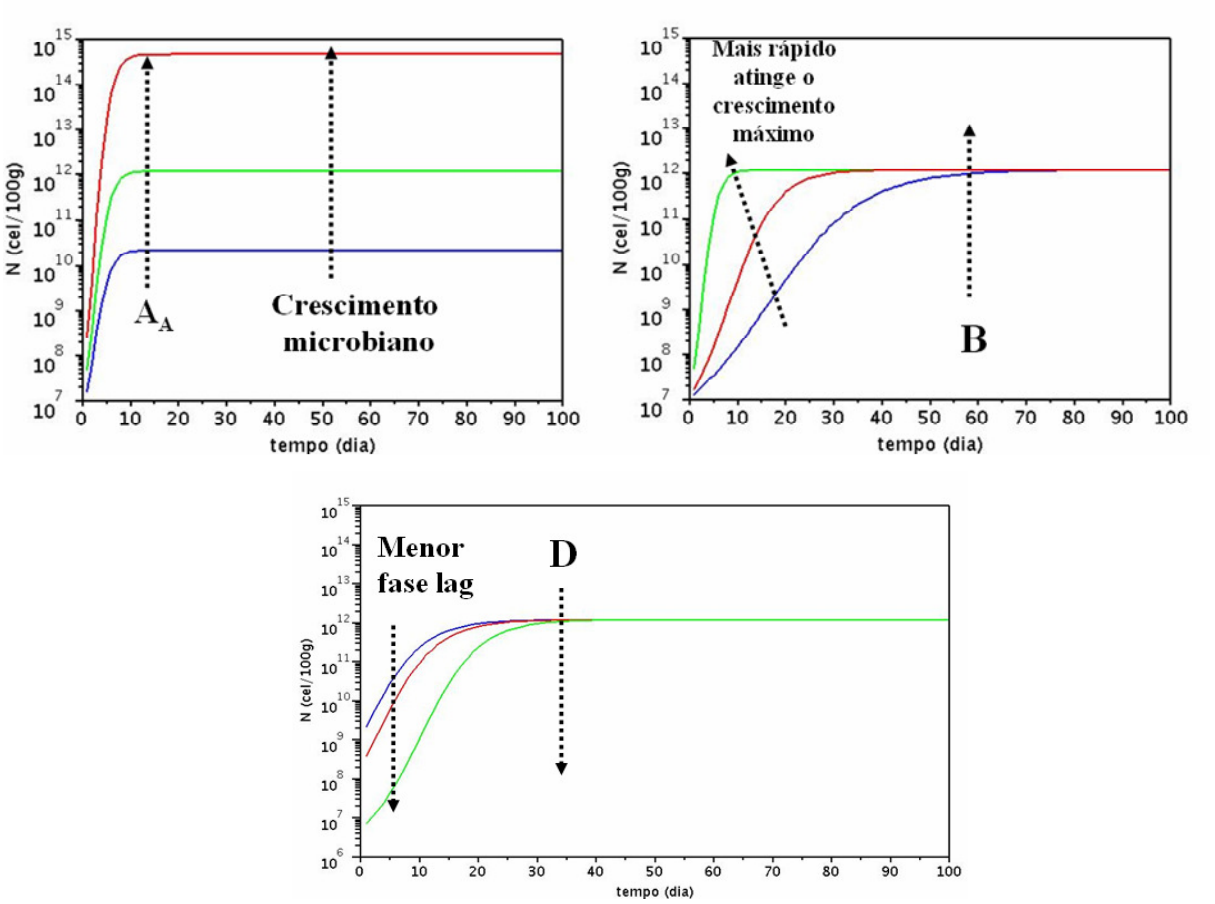


Figura 2.12 – Parâmetros de ajuste dos Modelos Logístico e de Gompertz

O modelo de Okasaki, representado pela Equação (2.3), é outra forma logística de descrição do crescimento celular com comportamento assintóptico. Neste modelo o parâmetro $\mu_m$ é o mesmo descrito anteriormente e o parâmetro $X_m$ representa a máxima concentração celular prevista pelo crescimento, pois o termo que contém este parâmetro representa a competição entre as células durante o crescimento (TONG et al., 2009; NAKASHIMA et al., 2000).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_M}\right) \tag{2.3}$$

O modelo logístico da Equação (2.3) pode ser associado ao consumo de substrato pelo coeficiente estequiométrico de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), como mostra a Equação (2.4), que representa o balanço de substrato associado ao crescimento celular.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}}.\frac{dx}{dt} - m_x.X \tag{2.4}$$

Nesta equação $Y_{x/s}$ é o coeficiente estequiométrico e $m_x$ representa o consumo de substrato para manutenção da vida das células.

A Equação (2.5) representa a associação da geração de produtos ao crescimento celular, sendo P a concentração de produto de interesse, $Z_1$ o parâmetro que representa a geração de produto associada ao crescimento de biomassa e $Z_2$ a velocidade específica de geração de produto associada a manutenção da vida celular, $K_u$ (Equação 2.6) a constante direta de decomposição do produto do modelo de ordem n.

$$\frac{dP}{dt} = Z_1.\frac{dx}{dt} + Z_2.X - Ku * P^n \tag{2.5}$$

$$k_u = A_u.\exp\left(\frac{-E_u}{RT}\right) \tag{2.6}$$

O modelo da Equação (2.3), tamb\ém conhecido como Okasaki e colaboradores (1980), pode ser modificado de forma a se tornar um modelo estruturado que descreve fenomenologicamente a transformação de componentes no interior das células. Uma das diferentes formas que ele pode ser transformado é o modelo de Dalsenter e colaboradores (2005), descrito pelas equações (2.7), (2.8), (2.9) e (2.10) e pela Figura 2.13, que faz este tipo de associação. Neste modelo F representa um componente intracelular que é degradado e sintetizado com velocidades $K_d$ e $K_s$, respectivamente, descritos pela equação de Arrhenius (Equações 2.9 e 2.10).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m * X * F\left(1 - \frac{X}{Xm}\right) \tag{2.7}$$

$$\frac{dF}{dt} = ks * F * \left(1 - F^n\right) - kdF \tag{2.8}$$

$$ks = As * \exp\left(\frac{-Es}{R * T}\right) \tag{2.9}$$

$$kd = Ad * \exp\left(\frac{-Ed}{R*T}\right) \tag{2.10}$$

A integração do modelo de Dalsenter foi realizada de forma simultânea a determinação dos parâmetros de forma não isotérmica com a consideração das quatro temperaturas. Foram implementados dois programas distintos no software Scilab 5.0.1. Um dos programas utilizou a função genérica de otimização que avalia os gradientes por diferenças finitas (Ndcost, scilab-5.1.0 , Copyright © 1989-2008. INRIA ENPC.) e o outro programa utilizou o método de Monte Carlo com $1x10^6$ simulações seguido de refino do intervalo de escolha dos parâmetros (Taha, 2009). Para que os resultados das diferentes enzimas representassem um conjunto que descreve o mesmo fenômeno foi feito um ajuste único dos parâmetros do modelo de crescimento celular sem considerar a otimização dos parâmetros de crescimento do modelo logístico e os parâmetros estruturados para cada enzima individual.

Sendo X concentração celular, $\mu_m$ velocidade máxima de crescimento celular, F concentração adimensional de um componente intracelular, $A_s$ e $A_d$ fatores de freqüência da equação de Arrhenius, $E_s$ e $E_d$ energia de ativação das reações de síntese e degradação de F e T a temperatura em Kelvin.

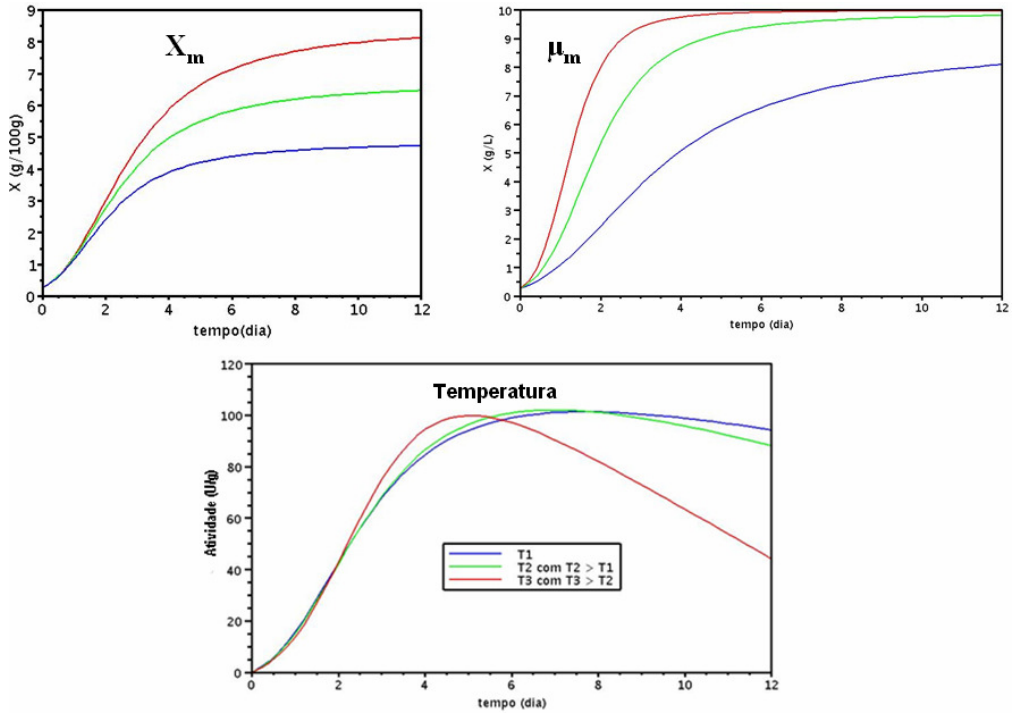


Figura 2.13 – Parâmetros de ajuste do Modelo de Dalsenter e colaboradores (2005).

# Capítulo 3

# Material e Métodos

# 3 - MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 - Preparo do resíduo

Como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido para obtenção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease, foram utilizados dois resíduos, sendo um deles resíduo de arroz (casca e farelo de arroz misturados na proporção de 1 x 1 em v/v) e o outro casca de maracujá.

O resíduo do arroz (Figura 3.1) foi gentilmente cedido pelo Comercial Alvorada da cidade de Formiga-MG. O farelo e a casca de arroz foram obtidos para todos os experimentos e armazenados em sacos plásticos embalados a vacuo, separadamente, sob refrigeração e misturados no preparo das análises.

Figura 3.1 – Resíduo de arroz.

As cascas de maracujá (Figura 3.2) foram gentilmente cedidas pela Trevo Agaricus Produtos Naturais (Cidade de Formiga-MG). As cascas foram picadas em pedaços de aproximadamente 3 cm e secas ao sol por 5 dias sob temperatura de 35 ± 3ºC e em seguida foram trituradas em processador. O resíduo seco foi armazenado em sacos plásticos fechados à vacuo sob refrigeração.

Figura 3.2 – Resíduo de maracujá após secagem.

### 3.2 - Cepas de *Aspergillus niger* a serem empregadas nos experimentos

Nesta etapa da pesquisa utilizou-se, as cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029 adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil. Os esporos das linhagens foram preservados em tubos de ensaio com tampas de algodão envolto em gaze tampados com papel grosso (Figura 3.3). Estas linhagens foram renovadas por cultivo a cada 15 dias em agar batata glicose (PDA) formado por ágar, glicose e batata nas proporções indicadas na Tabela 3.1. No preparo deste meio a infusão de batata destinada ao meio foi gerada pela fervura de 200g de batata fatiada em um litro de água destilada por uma hora. Estas proporções e forma de preparo são indicações correspondentes ao meio 129 do Centro de Pesquisas de material biológico da Alemanha (DSMZ) que é um banco de micro-organismos (DSMZ, 2009). Este meio foi conservado sob refrigeração a 5 ± 1$^{o}$C.

Tabela 3.1 – Componentes e devidas proporções do agar batata glicose (PDA)

| | |
|---|---|
| Infusão de batatas | 1000 mL |
| Glicose | 20 g |
| Agar bacteriológico | 15 g |

Fonte: DSMZ, 2009

Figura 3.3 – Cepas de *Aspergillus niger*

**3.3 - Meio de cultura e manutenção do fungo**

Para o preparo do inóculo foram utilizados como meio de cultura uma solução de água de batata e glicose 20 g/L. A batata foi cozida por uma hora e descartada, à água do cozimento foi adicionado glicose e homogeneizado, o pH foi ajustado para 5 com tampão acetato. O meio foi colocado em erlenmeyers de 250 mL de volume (Figura 3.4). Este foi tampado com tampão de algodão envolto em gaze e autoclavados a 1,0 atm durante 20 min. Esporos de *A. niger*, obtidos por raspagem do meio de manutenção, foram inoculados. O meio inoculado foi deixado em repouso por 48h em temperatura ambiente de 28 ± 2ºC. O fungo foi manuseado na capela de fluxo laminar.

Figura 3.4 – Meio de cultura e cepas de *Aspergillus niger* a serem manuseados na capela de fluxo laminar

### 3.4 - Processo de fermentação

Nos testes preliminares as fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL de volume contendo 30 g de material composto por metade de casca de maracujá e a outra metade de resíduo de arroz e autoclavados a 1,0 atm (121ºC) durante 20 min (Figura 3.5). Estes resíduos foram hidratados com 30 mL de inóculo a temperatura ambiente de 28 ± 2ºC e este foi fermentado por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h, sendo que a cada 24h um erlenmeyer foi sacrificado. Testes subsequentes, também em duplicata, foram realizados à temperatura ambiente de 28 ± 2ºC, por 96 h, variando a relação de massa de resíduo de arroz/massa total (A/T), a umidade consistia no próprio meio de inóculo e concentração de inóculo (CI) conforme o Delineamento Composto Central (DCC), descrito no item 3.8.

As amostras foram analisadas determinando-se as atividades de invertase, amilase e celulase e também o crescimento da biomassa.

Figura 3.5 – Substrato (metade casca de maracujá e metade resíduo de arroz) após autoclavação.

### 3.5 - Extração das enzimas

Com a finalidade de extrair as enzimas, ao final da fermentação foi adicionado em cada erlenmeyer 200 mL de água destilada e 4 mL de *twen* 80 e agitou-se manualmente com um bastão de vidro durante 5 min. A extração de células e enzimas foi realizada por filtração com papel de filtro qualitativo, marca Quanty, Cinza-007, diâmetro de 11 cm.

### 3.6 – Quantificação do crescimento celular

Para determinação da concentração da suspensão de esporos das amostras utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Nikon). Considerou-se para contagem 16 quadrados que possuem 25 quadrículas com uma área de 0,0025 $mm^2$ e profundidade de 0,1 mm para cada quadrícula. Com isso temos um volume total de 0,1 $mm^3$ = 0,1 µL (Figura 3.6). A Figura 3.7 apresenta uma foto feita pela leitura em câmara de Neubauer de *Aspergillus niger.*

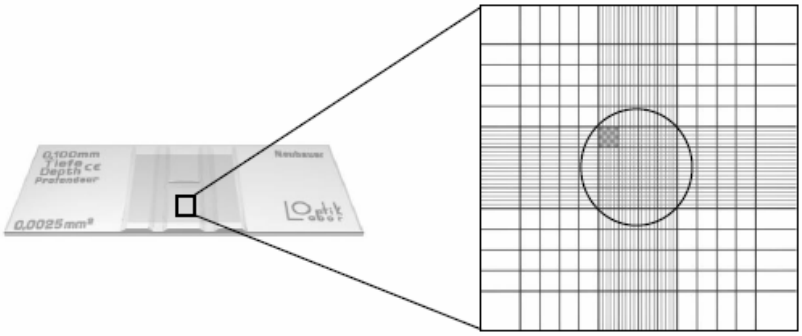


Figura 3.6 - Câmara de NeuBauer (BARGA, 2007).

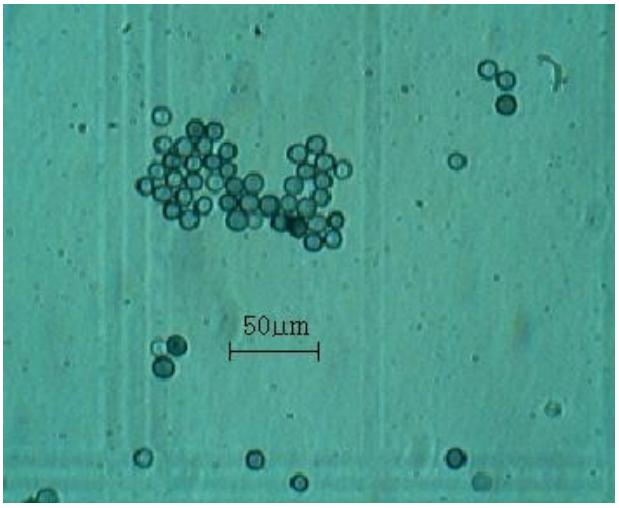


Figura 3.7 - Leitura em câmara de Neubauer de *Aspergillus niger* (foto da autora, 2009).

Para a contagem de esporos, diluiu-se a suspensão do inóculo e promoveu-se a homogenização com uma vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma micropipeta estéril, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. Realizou-se a contagem dos esporos em microscópio óptico utilizando-se um aumento de 400 vezes

(objetiva de 100 vezes e ocular de 10 vezes) para leitura de 8 campos uniformemente distribuidos por um dos reticulados da câmara e depois repetida para o segundo reticulado. O cálculo da concentração de esporos na suspensão foi realizado de acordo com a Eq. (3.1), sendo NE o valor médio em 5 quadrados e FD o fator de diluição (MADIGAN et al 2004).

$$\left[\frac{esporos}{mL}\right] = \frac{NE}{10^{-4}mL} \times FD \times 16 \tag{3.1}$$

O crescimento celular também foi determinado pelo método de análise da massa seca (AOAC 1990). Para tal, 10 mL do caldo extraído da fermentação foi centrifugado por 10 min à temperatura ambiente de 28 ± 2ºC e 4.000 rpm. A massa foi separada do sobrenadante e colocada para secagem em estufa a temperatura de 90 ± 1$^{o}$C até peso constante. O cálculo da concentração de biomassa na solução por massa seca foi determinado pela Equação (3.2) para a concentração de esporos no extrato fermentado e pela Equação (3.3) para a concentração inicial.

$$X = \left(\frac{Mss}{Vol}\right) * Ext * \left(\frac{100}{Ms}\right) \tag{3.2}$$

Sendo:

X - quantidade de células em g / 100 g de substrato

Mss - massa seca em g

Vol - volume da amostra em mL

Ext - volume de extrato do fermentado (volume de diluição do sólido fermentado) em mL

Ms - Massa de substrato em g

$$X_o = \left(\frac{Mssi}{Vol}\right) * Vino * \left(\frac{100}{Ms}\right) \tag{3.3}$$

Sendo:

$X_o$ - quantidade de células iniciais em g / 100 g de substrato

Mssi - Massa seca do inóculo em g

Vol - volume da amostra em mL

Vino - volume de inoculo em mL

Ms - Massa de substrato em g

## 3.7 –Testes Preliminares para seleção da cepa de *Aspergillus niger* a ser utlizada e do melhor tempo de fermentação

Testes foram realizados visando selecionar qual o melhor tempo de fermentação e a melhor linhagem de *Aspergillus niger* para a produção das enzimas invertase, amilase e celulase. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados em duplicata.

As fermentações foram realizadas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h para as três linhagens de *Aspergillus niger* ATCC 16404, ATCC 1057 e ATCC 9029, visando determinar o crescimento da biomassa e as produtividades (atividade enzimática/massa de substrato.dia – U/g.dia) e atividades de invertase, amilase e celulase. Vale ressaltar que a cada 24h um reator foi sacrificado.

## 3.8 - Planejamento Experimental

Em processos fermentativos, em que cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis, é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais. Em qualquer análise experimental devem-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última sendo dependente do tipo de planejamento realizado.

Foi realizado um delineamento composto central (DCC) para cada uma das respostas estudadas, com o intuito de avaliar a influência conjunta das variáveis: relação de massa de resíduo de arroz/massa total de substrato (A/T), umidade e concentração de inóculo. As respostas estudadas foram: atividade invertásica, amilásica, celulásica, pectinásica e proteásica. Esse tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada em 5 diferentes níveis (-α, -1, 0, 1, +α), cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de 1,35313 de modo a se obter um planejamento, no qual a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX et al., 1978). As equações de codificação para A/T ($X_1$), a umidade ($X_2$) e a concentração de inóculo ($X_3$) são mostradas, respectivamente, nas Equações (3.4), (3.5) e (3.6).

$$X_1 = \frac{(X_0 - 0,5)}{0,37} \tag{3.4}$$

$$X_2 = \frac{(X_0 - 30)}{15} \tag{3.5}$$

$$X_3 = \frac{(X_0 - 0,25)}{0,15} \tag{3.6}$$

O planejamento experimental foi realizado com o intuito de se estabelecer as condições mais adequadas à síntese da enzima pelo micro-organismo, em meio sólido, tendo como matérias-primas resíduo de maracujá e resíduo de arroz.

Na Tabela 3.2 é apresentada a matriz do delineamento composto central, totalizando 34 experimentos em duplicata. Todos os experimentos foram feitos em duplicata, à temperatura ambiente de 28 ± 2ºC por 96h.

Tabela 3.2 – Matriz do DCC utilizada para avaliar a influência conjunta das variáveis concentração de inóculo, relação massa de resíduo de arroz/ (massa total = massa de resíduo de arroz + massa de casca de maracujá) e umidade.

| **Ensaios** | **Massa de resíduo de arroz (g)/ Massa total (g) (valor codificado)** | **Umidade (mL/30 g) (valor codificado)** | **Inóculo (g/100 g) (valor codificado)** |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) |
| 3 | 0,13(-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69 (-α) | 0,25 (0) |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45 (α) |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

O planejamento fatorial foi analisado utilizando-se *software Statistica* versão 7.0 para obtenção da regressão dos dados experimentais e os pontos de maximização foram encontrados pela implementação de um algoritmo no software Scilab 5.0.1.

### 3.9 - Cinética da fermentação

Tendo em vista as condições estabelecidas nas fermentações preliminares, realizadas de acordo com o planejamento experimental, foi acompanhada a cinética de produção enzimática por um período de 12 dias à temperatura ambiente de 28 ± 2ºC, e nas temperaturas de 35 ± 0,5ºC, 40 ± 0,5ºC e 45 ± 0,5ºC, sendo realizadas amostragens a cada 24h.

As amostras foram analisadas determinando-se as atividades de invertase, protease, pectinase, amilase e celulase e também o crescimento da biomassa.

A Figura 3.8 mostra a sequência das análises de determinação do meio fermentado para os testes realizados em erlenmeyers.

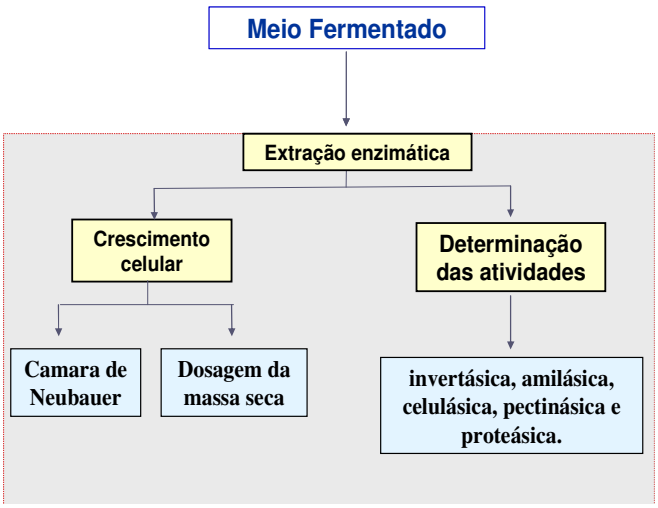


Figura 3.8 - Esquema das determinações realizadas no meio fermentado.

### 3.10 - Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). O método de DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom intenso.

O método de DNS utiliza os reagentes ácido dinitrosalicílico, sal de Rochelle e hidróxido de sódio, cada uma com uma função específica.

A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita adicionando 1 mL da amostra diluída a 2 mL do reagente DNS em Tubos de Folin-Wu e levada para um banho em água fervente por 5 minutos. Após este tempo, resfriava-se os tubos em banho com água em temperatura ambiente e completava-se o volume a 25 mL com água destilada, os quais eram homogeneizados e a seguir realizada a leitura da absorbância.

A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 1 mL de água destilada substituía a amostra, seguindo o mesmo procedimento.

O método foi previamente padronizado por uma curva de calibração de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL com intervalos de 0,1 g/L). As leituras foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV, utilizando cubetas de vidro.

Uma unidade de atividade (U) foi definida pela hidrólise de 1 μmol/min de substrato. A atividade específica foi expressa em U /g, determinada pela Equação (3.7).

$$A = \left( \frac{Coef.angular * 1 * 10^6}{MM} \right) * Volr * \frac{Ext * Dil}{Vext} * \left( \frac{100}{Ms} \right) \tag{3.7}$$

Em que:

A - atividade em U/g;

Coef.angular - coeficiente angular da reta de DNS

MM - Massa molecular do açúcar em g/L

Volr - volume no reator em mL

Vext - volume de extrato fermentativo diluído colocado no reator em mL

Dil - diluição do extrato bruto

Ext - volume de extrato do fermentado em mL

Ms - Massa total de substrato em g

**3.11 - Determinação das atividades invertásica, pectinásica, amilásica e celulásica**.

A determinação da atividade enzimática sobre sacarose, ácido poligalacturônico, amido solúvel e carboximetil celulose foi realizada pela quantificação dos açúcares redutores formados durante a incubação do extrato fermentativo (caldo fermentado) com o substrato (sacarose a 1%, ácido poligalacturônico 0,1%, amido solúvel 1% e carboximetil celulose a 0,5%, respectivamente).

Nos experimentos foi utilizado um microrreator de mistura, com volume total de 200 mL, com camisa externa para circulação de água (Figura 3.9) proveniente de um banho termostatizado da marca Solab (Figura 3.10) para controle de temperatura e acoplado a agitador magnético Ika labortechnik RCT basic foi utilizado nos experimentos. O volume reacional foi de 25 mL.

A Figura (3.11) ilustra a unidade experimental empregada.

Figura 3.9 - Microrreator de mistura com camisa acoplado a agitador magnético.

A mistura da reação, constituída de 20 mL de solução do substrato em questão e 5 mL de extrato da fermentação diluído, foi incubada a 35ºC e agitado por 15 min. Alíquotas de 1 mL foram tiradas nos tempos 0, 5, 10 e 15 min.

Figura 3.10 - Banho termostatizado empregado.

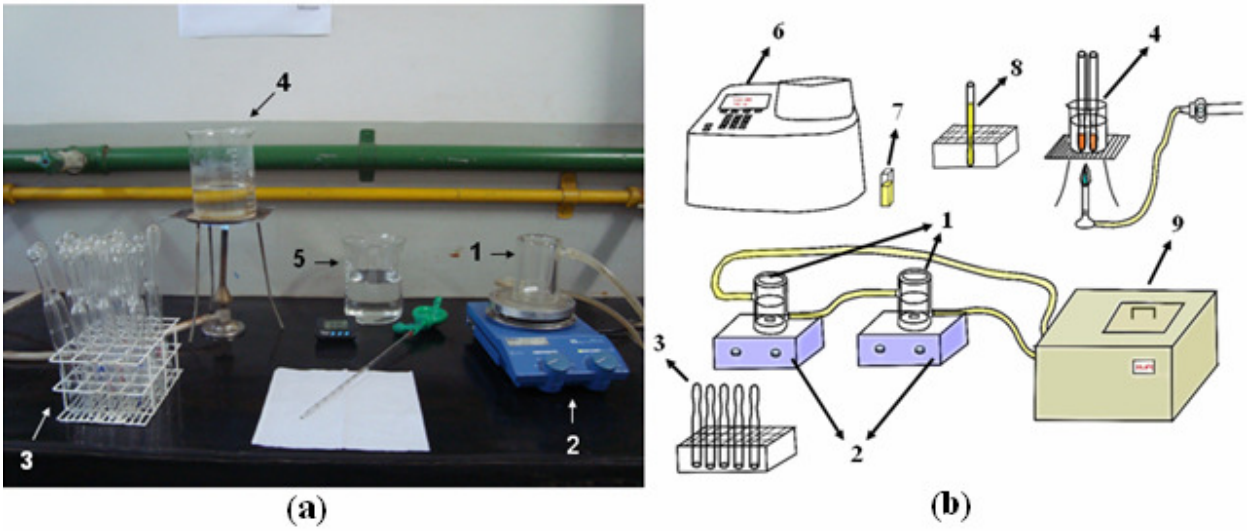


Figura 3.11 – Foto unidade experimental (a), esquema da unidade experimental (b): (1) microrreator com camisa externa, (2) agitador magnético, (3) tubos de Folin-Wu, (4) banho de água fervente, (5) banho de água fria (6) espectrofotômetro, (7) cubeta, (8) tubo de Folin-Wu com solução de reação diluída e (9) banho termostático.

### 3.12 - Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi utilizado o método descrito por Singh et al. (2004), o qual baseia-se na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azoproteína.

A atividade proteolítica foi avaliada espectrofotometricamente (440 nm) como sendo a velocidade de hidrólise de azocaseína em solução tampão citrato-fosfato pH 5,0 com 1% de substrato. Neste método foi utilizado a proporção de 1,5 mL de substrato (solução de azocaseína) para 0,5 mL de extrato fermentativo a 37ºC e 2 horas de tempo de reação. A finalização da reação foi realizada com a adição de 0,7 mL de ácido tricloroacético a 10% (SINGH et al 2004). A atividade em protease foi expressa em U/g de sólidos, sendo U definido pela hidrólise associada à geração de 1 unidade de absorbância na hidrólise do reativo cromogênico, azocaseína, por minuto, determinado pela Equação (3.8).

$$A = \left(\frac{Abs}{U_1 * t}\right) * Dil_2 * Dil * Dil_1 * Ext * \left(\frac{100}{Ms}\right) \qquad (3.8)$$

Sendo:

A - atividade em U/g;

Abs - resultado da análise em absorbância

U1 - 0,01 unidade de absorbância.

t - tempo de reação em h

$Dil_2$ – Diluição para correção do volume adicionado de reagente

Dil - Diluição do extrato bruto

$Dil_1$ - Diluição para leitura

Ext - volume de extrato do fermentado em mL

Ms - Massa de substrato em g

Para cada amostra foi feito um branco substituindo 0,5 mL de extrato fermentativo por 0,5 mL de água destilada.

# Capítulo 4

# Resultados e Discussão

# 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 – Caracterização dos resíduos secos

A produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Assim, a caracterização dos resíduos secos de arroz e maracujá visou conhecer a composição dos resíduos com relação ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese das enzimas. A Tabela 4.1 apresenta os resultados da caracterização do substrato, feita por SENAI - Serviço Nacional de aprendizagem Industrial. No anexo 1 encontram-se as cópias das tabelas com os resultados enviados pelo SENAI.

Tabela 4.1 – Caracterização química da mistura dos substratos (50% de casca de maracujá e 50% de resíduo de arroz)

| **Parâmetros analisados** | **Valor (%)** |
|---|---|
| Proteínas | 8,58 |
| Cinzas | 8,94 |
| Gorduras totais | 8,03 |
| Carboidratos | 64,78 |
| Umidade | 9,67 |

Com base nos valores obtidos pode-se considerar que a mistura dos resíduos de arroz e maracujá é um meio rico em nutrientes e, portanto, possa constituir-se em um substrato adequado à fermentação.

## 4.2 – Estudos preliminares para seleção da cepa de *Aspergillus niger*

A primeira etapa do trabalho refere-se à realização de experimentos para avaliar cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029 com base na capacidade de produção das enzimas invertase, amilase e celulase e no melhor tempo de fermentação em termos de produtividade e aumento de atividade. Vale ressaltar, que tais experimentos foram feitos em condições sem otimização das variáveis do processo.

Nas Figuras 4.1 (a, b e c) estão apresentados os resultados das atividades para as cepas estudadas de *Aspergillus niger*.

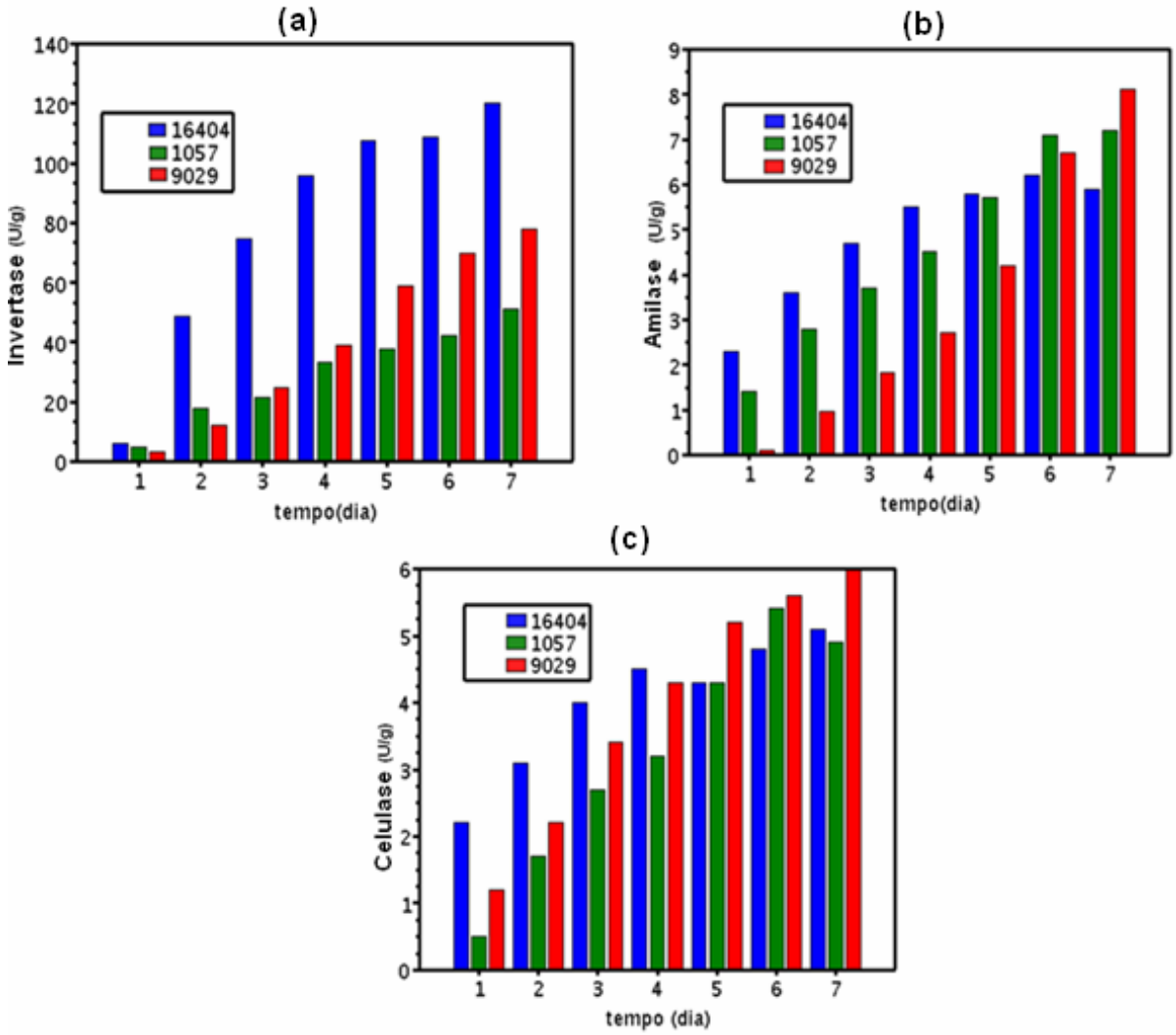


Figura 4.1 - Atividade das enzimas invertase (a), amilase (b) e celulase (c), em função do tempo, empregando as linhagens de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029.

Nota-se nas Figuras 4.1 (a, b e c) que as três cepas estudadas de *Aspergillus niger* produzem as enzimas de interesse e nota-se também que a cepa ATCC 16404 produziu, em maior escala, invertase para todos os dias de fermentação, amilase até o quinta dia de fermentação e celulase até o quarto dia de fermentação.

As Figuras 4.2 (a, b e c) representam os valores de produtividade das cepas ATCC 16404, 1057 e 9029 de *Aspergillus niger*.

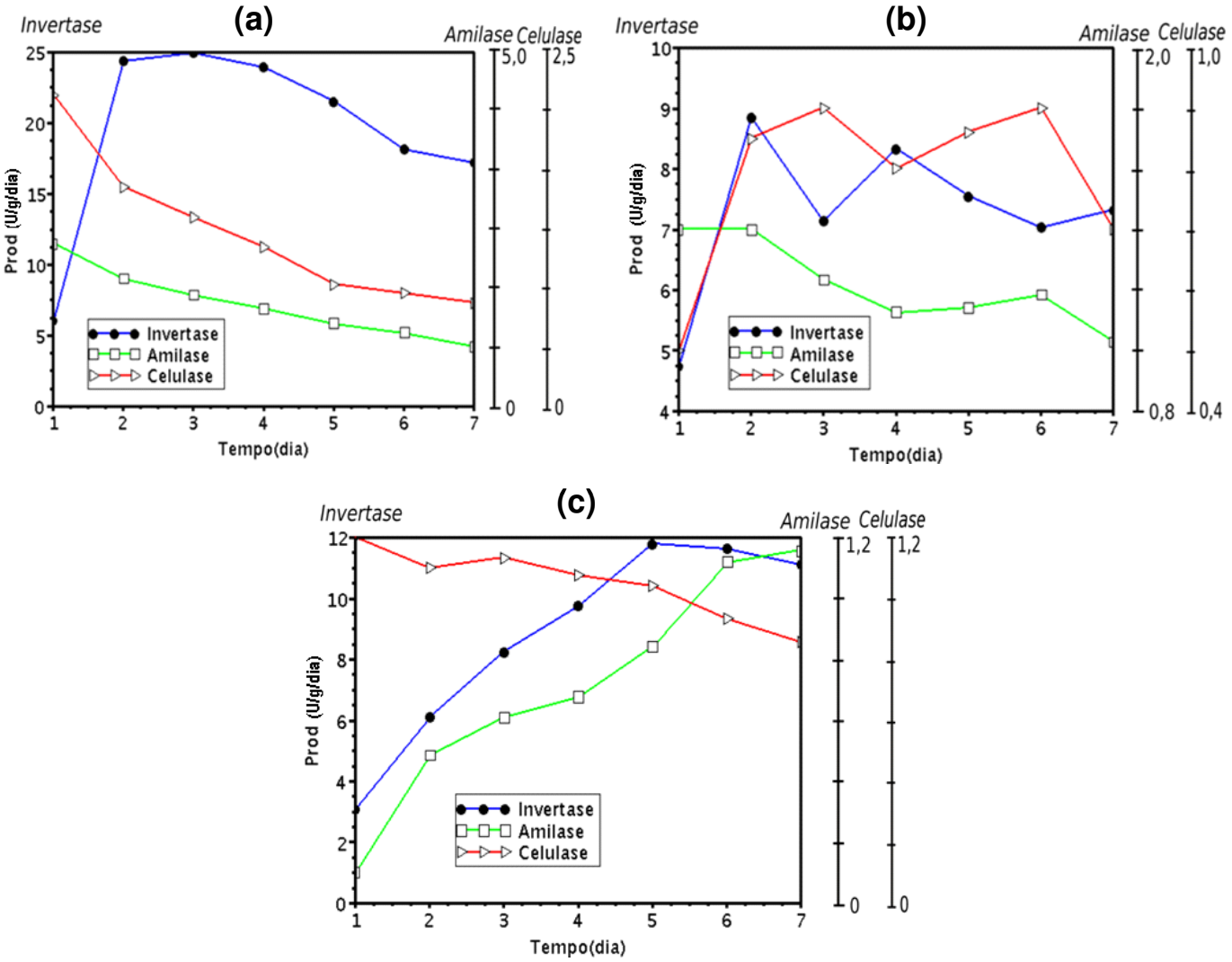


Figura 4.2 - Produtividade das enzimas invertase, amilase e celulase em função do tempo, empregando as linhagens de *Aspergillus níger* ATCC 16404 (a), 1057 (b) e 9029 (c).

Observando as Figuras 4.2 (a, b e c) e a Tabela 4.2 nota-se claramente que a cepa ATCC 16404 produz uma quantidade muito maior da enzima invertase e um pouco maior das enzimas amilase e celulase. Nota-se também que para a cepa ATCC 16404, maior produtora de enzimas avaliadas, após o quarto dia de fermentação há um decréscimo na produtividade.

Tabela 4.2 - Produtividade das enzimas invertase, amilase e celulase em função do tempo, empregando as linhagens de *Aspergillus níger* ATCC 16404, 1057 e 9029.

| Tempo | ATCC 16404 | | | ATCC 1057 | | | ATCC 9029 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| dia | Inverta-se | Amilase | Celulase | Inverta-se | Amilase | Celulase | Inverta-se | Amilase | Celulase |
| | U/g/dia | | | U/g/dia | | | U/g/dia | | |
| 1 | 6,02 | 2,3 | 2,2 | 4,7 | 1,4 | 0,5 | 3,1 | 0,1 | 1,2 |
| 2 | 24,3 | 1,8 | 1,5 | 8,9 | 1,4 | 0,8 | 6,1 | 0,5 | 1,1 |
| 3 | 24,9 | 1,6 | 1,3 | 7,1 | 1,2 | 0,9 | 8,2 | 0,6 | 1,1 |
| 4 | 23,9 | 1,4 | 1,1 | 8,3 | 1,1 | 0,8 | 9,7 | 0,7 | 1,1 |
| 5 | 21,5 | 1,2 | 0,9 | 7,5 | 1,1 | 0,9 | 11,8 | 0,8 | 1,0 |
| 6 | 18,1 | 1,0 | 0,8 | 7,0 | 1,2 | 0,9 | 11,6 | 1,1 | 0,9 |
| 7 | 17,2 | 0,8 | 0,7 | 7,3 | 1,0 | 0,7 | 11,1 | 1,1 | 0,8 |

As Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 representam os perfis de crescimento das cepas ATCC 16404, 1057 e 9029 com o respectivo ajuste do crescimento ao modelo logístico. A Tabela 4.3 apresenta os parâmetros deste modelo sendo $A_A$ o parâmetro que descreve o aumento logarítmico da população, B parâmetro adimensional, D o parâmetro associado ao crescimento celular e SQD a Soma dos Quadrados dos Desvios. Pelas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 observa-se que não há esgotamento do substrato ou geração de produtos capazes de inibir o crescimento durante o tempo de fermentação (Além disto, verifica-se que o modelo logístico descreveu adequadamente o crescimento celular. Os parâmetros do modelo fornecem que o tempo da fase lag é desprezível para cepa ATCC 16404 e foram de aproximadamente 40h e 14h, respectivamente, para as cepas ATCC 1057 e 9029 o que sugere que embora as três cepas estejam bem adaptadas ao meio a cepa ATCC 16404, pelo menor tempo da fase lag, é a que se encontra mais adaptada ao meio.

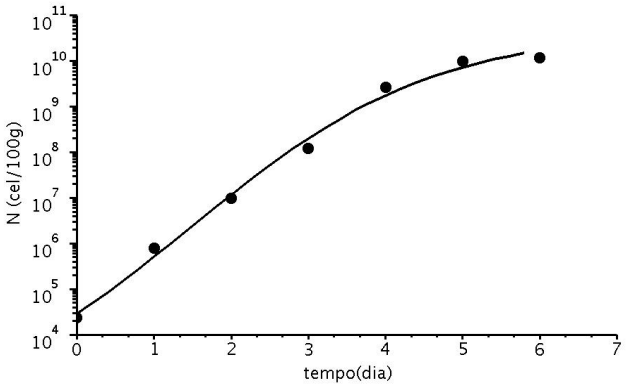


Figura 4.3 - Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 16404 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais.

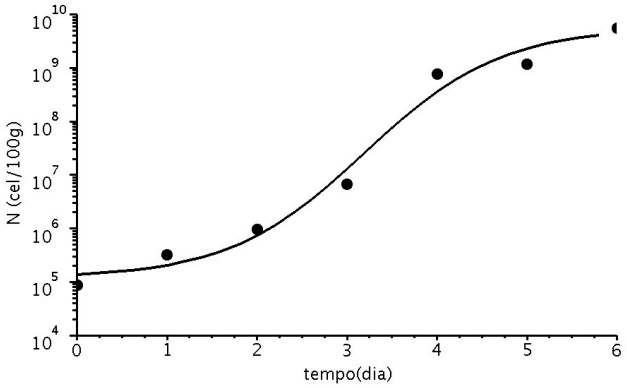


Figura 4.4 - Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 1057 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais.

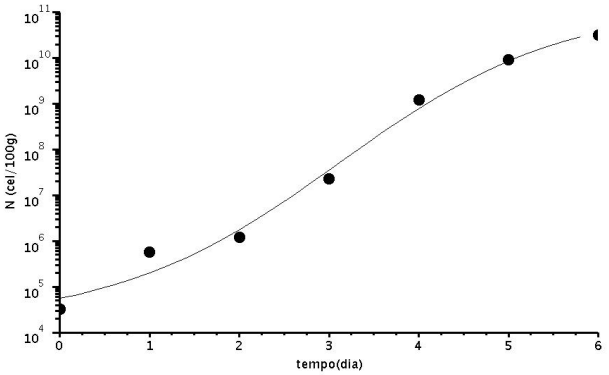


Figura 4.5 - Curva de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 9029 em número de células por 100 g de substrato em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais.

Tabela 4.3 - Parâmetros de ajuste do crescimento ao modelo Logístico – Equação (2.2).

| **Parâmetros** | **Cepa ATCC 16404** | **Cepa ATCC 1057** | **Cepa ATCC 9029** |
|---|---|---|---|
| $A_A$ (adimensional) | 19,9563 ± 6,87 | 10,7659 ± 1,504 | 16,1058 ± 3,785 |
| B (dia $^{-1}$) | 0,63535 ± 0,2457 | 1,33156 ± 0,4718 | 0,798265 ± 0,3165 |
| D (adimensional) | 1,57733 ± 1,11 | 5,58511 ± 1,976 | 3,28326 ± 1,304 |
| SQD | 0,935715 | 1,98558 | 1,94522 |

Foi necessário escolher uma entre as três cepas disponíveis, pois a presente dissertação envolveu uma grande quantidade de ensaios associados à análise simultânea da atividade de cinco enzimas associadas a influência de cinco variáveis de processso (temperatura, tempo de fermentação, proporção de resíduos, umidade e quantidade de inóculo). A cepa ATCC 16404 foi a escolhida pelo fato da mesma apresentar maiores atividades e produtividade para as três das enzimas estudadas nos ensaios iniciais do presente trabalho.

## 4.3 - Otimização da produção das enzimas: invertase, amilase, celulase, pectinase e protease.

Para o estudo de otimização da produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease, realizou-se um Delineamento Composto Central (DCC) para cada uma das respostas obtidas, para que os principais efeitos das variáveis massa de resíduo de arroz/ massa total de substrato, umidade e concentração de inóculo pudessem ser avaliados.

A Tabela 4.4 apresenta a matriz do DCC com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade da invertase. Pode-se notar que os resultados para atividade invertásica variaram entre 5,88 e 108,82 U/g, sendo que os maiores valores obtidos foram no ponto central (experimentos 15, 16 e 17). Analisando os resultados da Tabela 4.4 nota-se que quando se utilizou apenas resíduo de arroz (experimento 10) a atividade foi um dos maiores valores obtidos. Comparando os resultados dos experimentos 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8, verifica-se que maior concentração de resíduo de arroz promove maior produção de invertase pelo *Aspergillus niger*. Comportamento semelhante foi observado para a concentração de inóculo (experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14). De forma mais suave verifica-se que maiores resultados de atividade foram obtidos para maiores valores de umidade (experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12).

Tabela 4.4 - Matriz do DCC para a atividade invertásica.

| Experimentos | Massa de resíduo de arroz (g)/ Massa Total(g) | Umidade (mL/30 g) | Cond. De inóculo (g/100 g) | Invertase (U/g) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 5,88 ± 0,3 |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 23,51 ± 1,0 |
| 3 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 17,71 ± 0,8 |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 29,27 ± 1,2 |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 41,05 ± 1,6 |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 58,71 ± 1,9 |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 49,17 ± 1,7 |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 66,73 ± 2,0 |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 55,06 ± 1,6 |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 103,20 ± 3,0 |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69(-α) | 0,25 (0) | 28,10 ± 1,1 |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) | 65,55 ± 1,8 |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) | 90,20 ± 2,0 |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45(α) | 103,63 ± 2,8 |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 106,70 ± 2,9 |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 108,82 ± 3,1 |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 107,87 ± 3,0 |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

.

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da relação massa de resíduo de arroz/massa total ($X_1$), umidade ($X_2$) e concentração de inóculo ($X_3$) realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de **p** encontrados pelo teste *t- Student*. Estão representados na Tabela 4.5 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas. Os valores em destaque na Tabela 4.5, representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p) inferiores a 10% para a atividade da invertase.

Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão para a resposta invertase.

| | **Coeficientes de regressão** | **Desvio** | **p – valor** |
|---|---|---|---|
| **Média** | **112,722** | **4,974** | **0,000000** |
| **$X_1$ (L)** | **17,530** | **2,806** | **0,000426** |
| **$X_1$ (Q)** | **-21,798** | **3,701** | **0,000606** |
| **$X_2$ (L)** | **7,238** | **2,806** | **0,036532** |
| **$X_2$ (Q)** | **-39,442** | **3,701** | **0,000014** |
| **$X_3$ (L)** | **7,081** | **2,806** | **0,039625** |
| **$X_3$ (Q)** | **12,085** | **3,701** | **0,013769** |
| $X_1 X_2$ | -0,181 | 3,388 | 0,958836 |
| $X_1 X_3$ | 0,754 | 3,388 | 0,830319 |
| $X_2 X_3$ | -0,771 | 3,388 | 0,826456 |

A Equação (4.1) apresenta os parâmetros significativos e não significativos para a resposta atividade invertásica. Após a eliminação dos parâmetros não significativos com nível de significância (p) inferior a 10%, no teste t de Student, foi obtida a Equação (4.2) e o coeficiente de correlação ($R^2$) foi de 0,97.

Este valor de $R^2$ indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 97% da variabilidade dos dados.

**Atividade da Invertase (U/g)** = $112,72 + 17,53X_1 - 21,80X_1^2 + 7,24 X_2 - 39,44 X_2^2 + 7,08X_3 - 12,08 X_3^2 - 0,18X_1X_2 + 0,75X_1X_3 - 0,77X_2X_3$ (4.1)

**Atividade da Invertase (U/g)** = $112,72 + 17,53X_1 - 21,80X_1^2 + 7,24 X_2 - 39,44 X_2^2 + 7,08X_3 - 12,08 X_3^2$ (4.2)

Observa-se pela Equação 4.2, que a atividade invertásica foi influenciada positivamente por todas as variáveis isoladas $X_1$, $X_2$ e $X_3$. Os sinais positivos das variáveis $X_1$, $X_2$ e $X_3$ mostram que a atividade desta enzima aumenta com o aumento da concentração de resíduo de arroz, da umidade e da concentração de inóculo, e isto pode ser verificado conforme discutido anteriormente.

De acordo com o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 4.6, para a atividade da invertase, todos os efeitos são estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%. Observa-se que a massa de resíduo de arroz/ massa total, a umidade e a concentração de inóculo influenciam positivamente na produção de invertase.

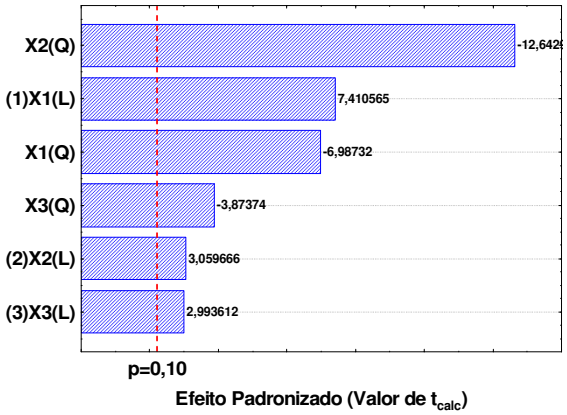


Figura 4.6 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade invertásica.

A Figura 4.7 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero (a) e a representação dos valores previstos em função dos valores experimentais (b).

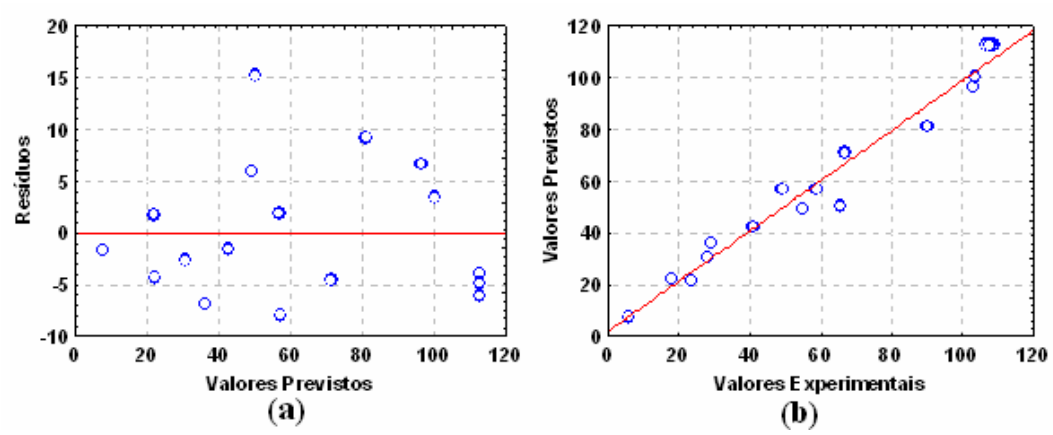


Figura 4.7 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade invertásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade invertásica. (b).

Observando a Figura (4.7 a), verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura (4.7 b), nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade invertásica, são apresentadas as curvas de contorno na Figura 4.8 (a, b e c). Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis na forma real, duas a duas, em relação à resposta atividade invertásica.

Verifica-se, que as regiões de otimização (em vermelho escuro), mostradas nas Figuras 4.8 (a, b e c), apresentaram as seguintes faixas de proporção de substrato (A/T) de 0,45 a 0,85 g/g, umidade de 28 a 35 mL/30 g e inóculo de 0,20 a 0,35 g/100 g.

Com o objetivo de encontrar o ponto correspondente de maximização para a atividade invertásica, dentro da região de otimização, foi realizada a implementação de um algoritmo no software *Scilab 5.0.1*. Os valores reais destes pontos foram 0,650 g de resíduo de arroz/g de massa total, 31,317 mL/30 g de umidade e 0,295 g de inóculo/100 g de substrato. Na condição otimizada (0,650 g de resíduo de arroz/g de massa total, 31,317 mL/30 g de umidade e 0,295 g de inóculo/100 g de substrato) foram realizados experimentos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, e obteve-se a atividade de 109,27 ± 2,9 U/g. Ao substituir os valores das variáveis codificadas na condição otimizada (Equação 4.2) obteve-se a atividade teórica de 117,67 U/g. Ao comparar o valor experimental com o teórico verifica-se que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

Alegre et al., (2009) avaliando a produção de invertase por *Aspergillus caespitosus* utilizando farelo de trigo e com adição de nutrientes (nitrogênio, peptona e fosfato) ao meio fermentado à temperatura de 30°C obtiveram após 72 horas de processo a atividade de 303,4U/g. O valor obtido por esse autor foi superior ao encontrado neste trabalho. Porém, o substrato foi enriquecido com nutrientes de alto valor agregado e foi realizado também o controle de temperatura durante o processo fermentativo.

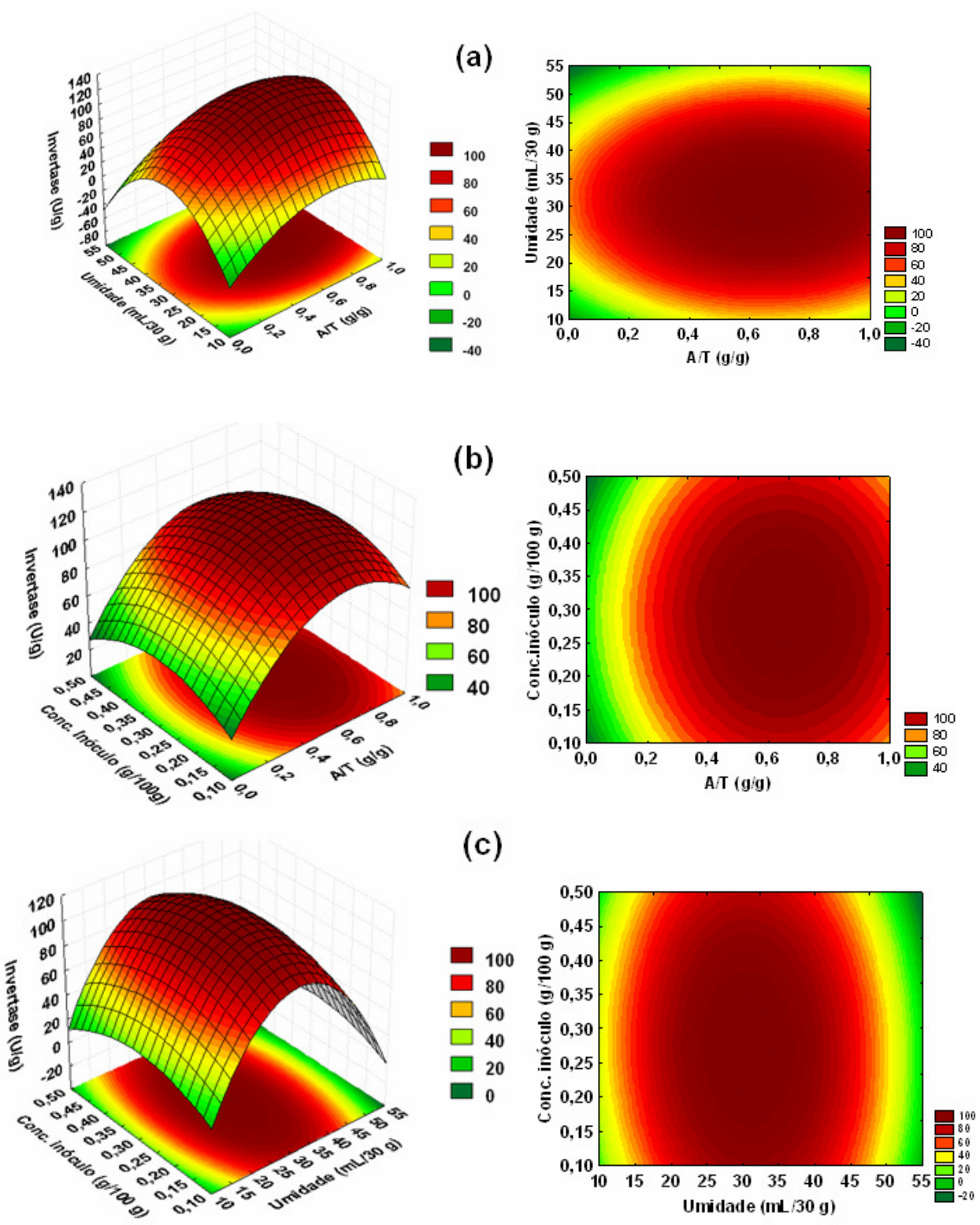


Figura 4.8 - Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da invertase em função da umidade e da relação A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c).

A Tabela 4.6 apresenta a matriz do DCC com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade da amilase.

Tabela 4.6 - Matriz do DCC para a atividade amilásica.

| **Experimentos** | **Massa de resíduo de arroz (g)/ Massa Total(g)** | **Umidade (mL/30 g)** | **Conc. De inóculo (g/100 g)** | **Amilase (U/g)** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 2,64 ± 0,4 |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 4,97 ± 0,7 |
| 3 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 4,03 ± 0,6 |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 5,96 ± 1,0 |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 5,40 ± 0,9 |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 7,96 ± 1,3 |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 6,94 ± 1,1 |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 9,76 ± 1,6 |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 4,65 ± 0,7 |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 10,24 ± 1,8 |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69(-α) | 0,25 (0) | 4,48 ± 0,6 |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) | 6,74 ± 1,2 |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) | 5,05 ± 1,0 |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45(α) | 9,77 ± 1,7 |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 10,56 ± 2,0 |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 9,83 ± 1,8 |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 10,03 ± 1,9 |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

As condições experimentais que forneceram maiores valores de atividade foram as dos experimentos 8, 10, 14 e dos experimentos do ponto central (15, 16 e 17). Para essa enzima, como para a invertase, observou-se a preferência mais acentuada pelo resíduo de arroz, haja visto o resultado obtido no experimento 10 que utiliza apenas resíduo de arroz como substrato. A atividade da amilase foi inferior à obtida para a invertase, mostrando provavelmente a maior produção de invertase para o substrato em estudo. Comparando os experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14; verifica-se que maiores valores de atividade foram obtidos com maiores concentrações de

inóculo. O mesmo comportamento foi observado para a umidade (experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12).

A partir da regressão múltipla feita com os resultados experimentais para atividade amilásica e análise dos valores de p encontrados pelo teste *t- Student*, das variáveis $X_1$, $X_2$ e $X_3$, obteve-se como sendo significativo os parâmetros lineares (L), e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas. Todos os parâmetros, significativos e não significativos, estão representados na Tabela 4.7. Os valores em destaque na Tabela 4.7, representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p) inferiores a 10% para a atividade da amilase.

Tabela 4.7 - Coeficientes de regressão para a resposta amilase

| | **Coeficientes de regressão** | **Desvio** | **p – valor** |
|---|---|---|---|
| **Média** | **9,763** | **0,391156** | **0,000000** |
| **$X_1$ (L)** | **1,717** | **0,220688** | **0,000109** |
| **$X_1$ (Q)** | **-1,001** | **0,291051** | **0,010804** |
| **$X_2$ (L)** | **0,753** | **0,220688** | **0,011276** |
| **$X_2$ (Q)** | **-2,004** | **0,291051** | **0,000234** |
| **$X_3$ (L)** | **1,374** | **0,220688** | **0,000434** |
| **$X_3$ (Q)** | **-1,021** | **0,291051** | **0,009887** |
| $X_1$ $X_2$ | 0,120 | 0,266451 | 0,666066 |
| $X_1$ $X_3$ | 0,140 | 0,266451 | 0,615515 |
| $X_2$ $X_3$ | -0,017 | 0,266451 | 0,949471 |

Utilizando-se os resultados apresentados na Tabela 4.7, após a realização de regressão múltipla no software *Statistica 7*, determinou-se os coeficientes de regressão para atividade amilásica. O modelo completo está apresentado na Equação (4.3). Após a eliminação dos parâmetros não significativos com p>0,10, foi obtida a Equação (4.4) e o valor do coeficiente de correlação ($R^2$) foi de 0,96.

$$\textbf{Atividade da Amilase (U/g)} = 9{,}76 + 1{,}72X_1 - 1{,}00X_1^2 + 0{,}75X_2 - 2{,}00X_2^2 + 1{,}37X_3 - 1{,}02\ X_3^2 + 0{,}12X_1X_2 + 0{,}14X_1X_3 - 0{,}02X_2X_3 \quad (4.3)$$

$$\textbf{Atividade da Amilase (U/g)} = 9{,}76 + 1{,}72X_1 - 1{,}00X_1^2 + 0{,}75X_2 - 2{,}00X_2^2 + 1{,}37X_3 - 1{,}02\ X_3^2 \quad (4.4)$$

Observa-se pela Equação 4.4, que a atividade amilásica foi influenciada pelas variáveis isoladas $X_1$, $X_2$ e $X_3$. Os sinais positivos destas variáveis mostram que a atividade da amilase aumenta com o aumento da concentração de resíduo de arroz, de umidade e da concentração de inóculo.

Para a atividade da amilase, apresentada pelo Diagrama de Pareto na Figura 4.9, nota-se também que todos os efeitos são estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%. Observa-se que a relação massa de resíduo de arroz/ massa total, a umidade e a concentração de inóculo influenciaram positivamente a produção de amilase.

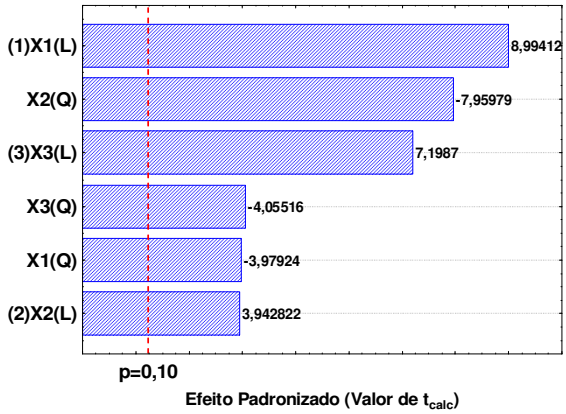


Figura 4.9 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade amilásica.

A Figura 4.10 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero (a) e a representação dos valores previstos em função dos valores experimentais (b).

Nota-se na Figura 4.10 (a e b), que os resíduos não apresentaram nenhuma tendência em relação à distribuição e que os valores obtidos experimentalmente encontram-se próximos aos valores obtidos pela Equação empírica 4.4.

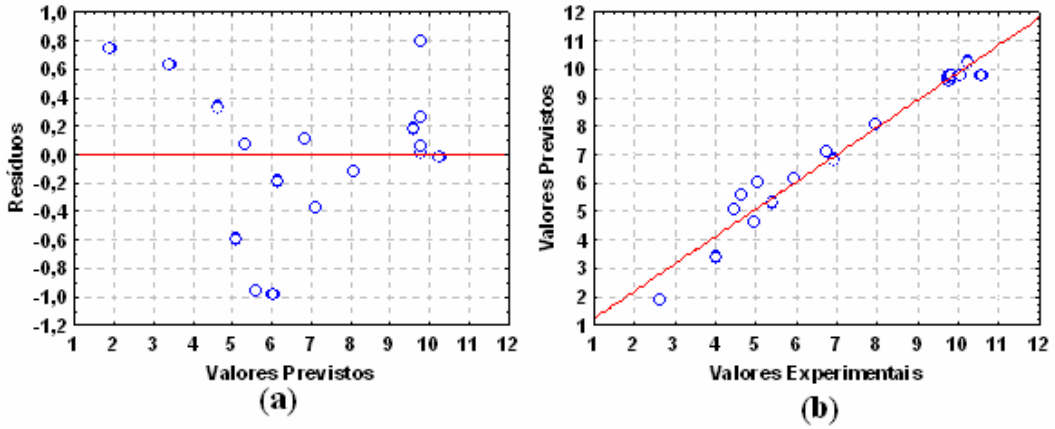


Figura 4.10 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade amilásica (a) e valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade amilásica (b).

A Figura 4.11 (a, b e c) ilustra os efeitos das variáveis na atividade amilásica, por meio das curvas de contorno e superfícies de resposta, mostrando a região de otimização. As curvas de contorno mostram que o máximo de atividade amilásica se encontra na faixa de 0,5 a 1,0 g/g em proporção de substrato, 25 e 40 mL/30 g de umidade e entre 0,27 e 0,43 g de inóculo/100 g de substrato. O ponto correspondente à maximização para a resposta atividade amilásica foi obtido por meio de um algoritmo no software *Scilab 5.0.1*. Os valores destes pontos foram 0,840 g de resíduo de arroz/g massa total, 33,179 mL/30 g de umidade e 0,359 g de inóculo/100 g de substrato. Na condição otimizada (0,840 g de resíduo de arroz/g de massa total, 33,179 mL/30 g de umidade e 0,359 g de inóculo/100 g de substrato) foram realizados experimentos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, obtendo a atividade de 10,67 ± 2,3 U/g. Ao substituir os valores das variáveis codificadas na condição otimizada (Equação 4.4) obteve-se a atividade teórica de 11,12 U/g.

Rahardjo e colaboradores (2005) empregando farinha de trigo e *A. oryzae* na produção de α-amilase obtiveram a atividade de 25 U/g para 4 dias de fermentação com adição de 1% de $O_2$ e 10 U/g para 13,3 dias de processo a 0,25% de $O_2$ (para todos os experimentos foi adicionado agar de extrato de malte). No trabalho do autor, o valor da atividade foi próxima ao obtido neste trabalho, que não foi adicionado oxigênio e nutriente em menor tempo de fermentação.

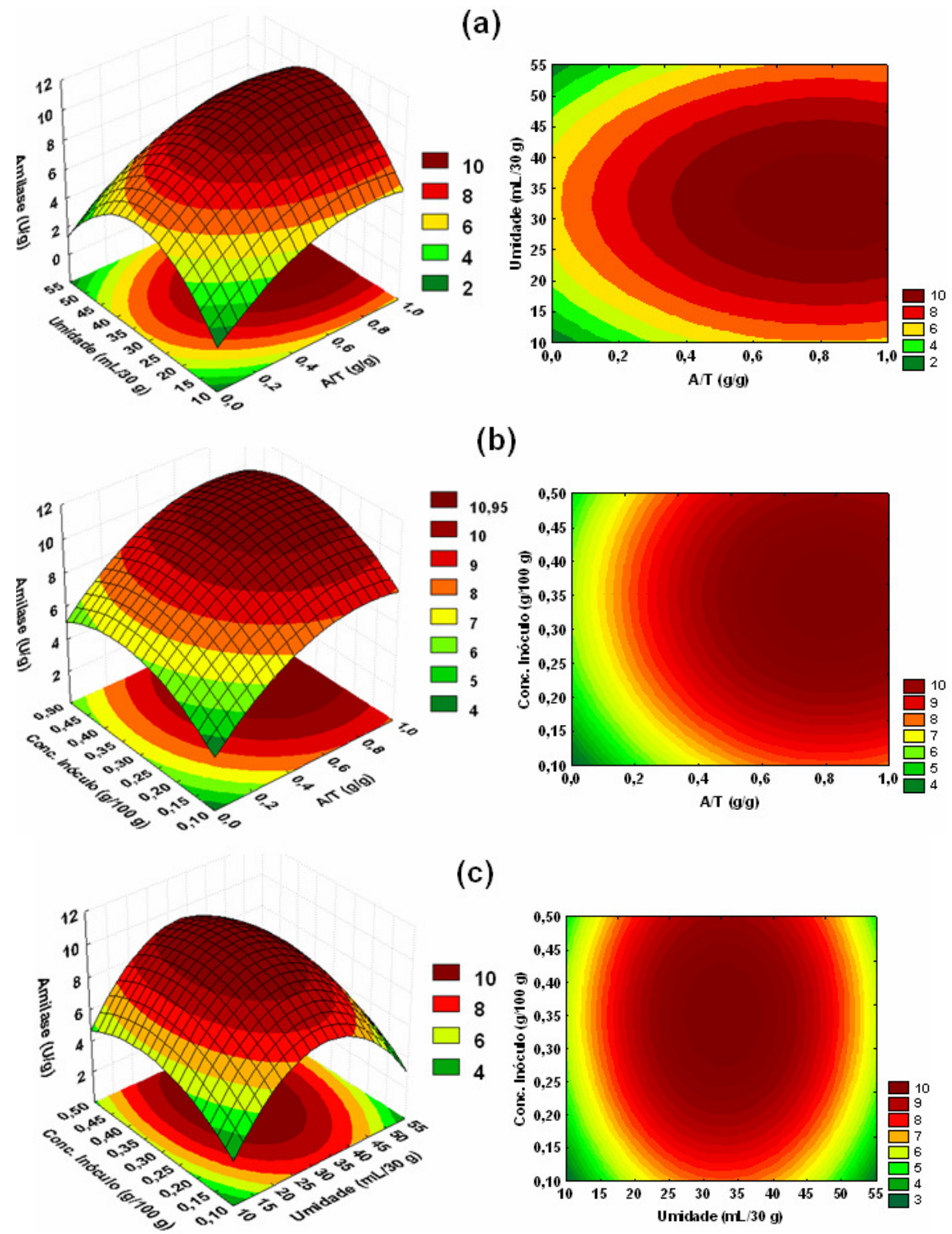


Figura 4.11 - Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da amilase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c).

Os resultados da influência simultânea das variáveis massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo na atividade enzimática da celulase, definidos pelo Delineamento Composto Central, estão representados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Matriz do DCC para a atividade celulásica.

| **Experimentos** | **Massa de resíduo de arroz (g)/ Massa Total(g)** | **Umidade (mL/30 g)** | **Conc. De inóculo (g/100 g)** | **Celulase (U/g)** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 2,80 ± 0,2 |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 3,50 ± 0,4 |
| 3 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 4,77 ± 0,3 |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 5,95 ± 0,7 |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 1,10 ± 0,1 |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 2,10 ± 0,3 |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 3,05 ± 0,5 |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 3,28 ± 0,2 |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5,98 ± 0,8 |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 1,51 ± 0,2 |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69(-α) | 0,25 (0) | 1,72 ± 0,3 |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) | 4,95 ± 0,9 |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) | 4,20 ± 0,7 |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45(α) | 4,50 ± 0,8 |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 4,98 ± 0,8 |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 4,79 ± 0,9 |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5,01 ± 0,6 |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

Observa-se na Tabela 4.8, que os resultados para atividade da celulase variaram entre 1,1 ± 0,1 e 5,98 ± 0,8 U/g. Analisando os resultados da Tabela 4.8 nota-se, que quando se utilizou apenas maracujá (experimento 9) a atividade foi a maior obtida. Comparando os resultados dos experimentos 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8, verifica-se que maior concentração de casca de maracujá promove maior produção de celulase. Comportamento semelhante foi observado para a umidade

(experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12), maiores valores de umidade proporcionaram maiores atividades da enzima celulase. De forma mais suave verifica-se que maiores resultados de atividade foram obtidos para maiores valores de concentração de inóculo (experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14).

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo, realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de **p** encontrados pelo teste *t- Student*. Na Tabela 4.9 estão apresentados os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas. Os valores em destaque na Tabela 4.9, representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p) inferiores a 10% para a atividade da celulase.

Tabela 4.9 - Coeficientes de regressão para a resposta celulase.

| | **Coeficientes de regressão** | **Desvio** | **p – valor** |
|---|---|---|---|
| **Média** | **4,860** | **0,272520** | **0,000000** |
| **$X_1$ (L)** | **-1,161** | **0,153754** | **0,000132** |
| **$X_1$ (Q)** | **-0,562** | **0,202777** | **0,027573** |
| **$X_2$ (L)** | **1,022** | **0,153754** | **0,000291** |
| **$X_2$ (Q)** | **-0,786** | **0,202777** | **0,006074** |
| **$X_3$ (L)** | **0,304** | **0,153754** | **0,090706** |
| $X_3$ (Q) | -0,232 | 0,202777 | 0,290415 |
| $X_1$ $X_2$ | -0,161 | 0,185638 | 0,413839 |
| $X_1$ $X_3$ | -0,081 | 0,185638 | 0,674805 |
| $X_2$ $X_3$ | -0,036 | 0,185638 | 0,850727 |

O modelo obtido para a atividade da celulase é apresentado pela Equação (4.5). Após a eliminação dos parâmetros não significativos estatisticamente, com nível de confiança de 90% no teste t de Student, obteve-se a Equação (4.6), obtendo coeficiente de correlação ($R^2$) de 0,93. Este valor indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 93% da variabilidade dos dados.

**Atividade da Celulase (U/g)** = $4,86 - 1,16X_1 - 0,56X_1^2 + 1,02X_2 - 0,78X_2^2 + 0,30X_3 - 0,23X_3^2 - 0,16X_1X_2 - 0,08X_1X_3 - 0,03X_2X_3$ (4.5)

**Atividade da Celulase (U/g)** = $4{,}70 - 1{,}16X_1 - 0{,}56X_1^2 + 1{,}02X_2 - 0{,}783X_2^2 + 0{,}30X_3$ (4.6)

Observa-se na Equação 4.5 e no Diagrama de Pareto (Figura 4.12), que a atividade da celulase foi influenciada pelas variáveis isoladas $X_1$ (relação de substratos A/T), $X_2$ (umidade) e $X_3$ (concentração de inóculo). Os sinais positivos das variáveis $X_2$ e $X_3$ mostram que a atividade desta enzima aumenta com o aumento da umidade e da concentração de inóculo, já o sinal negativo da relação A/T mostra que a atividade celulásica é maior para maiores concentrações de casca de maracujá conforme discutido anteriormente.

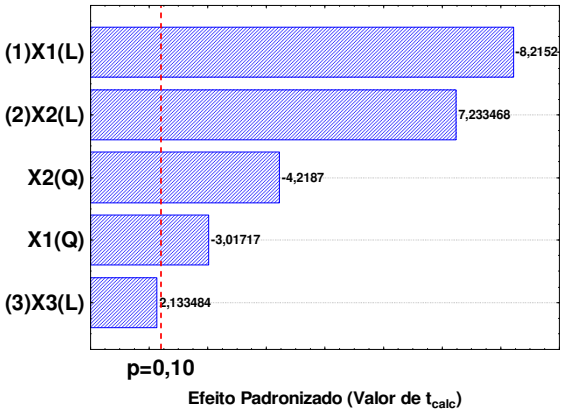


Figura 4.12 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade celulásica.

Para a atividade da celulase, como para as outras atividades já estudadas, observa-se que a distribuição dos resíduos (Figura 4.13a) comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição e observa-se também que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica (Figura 4.13b).

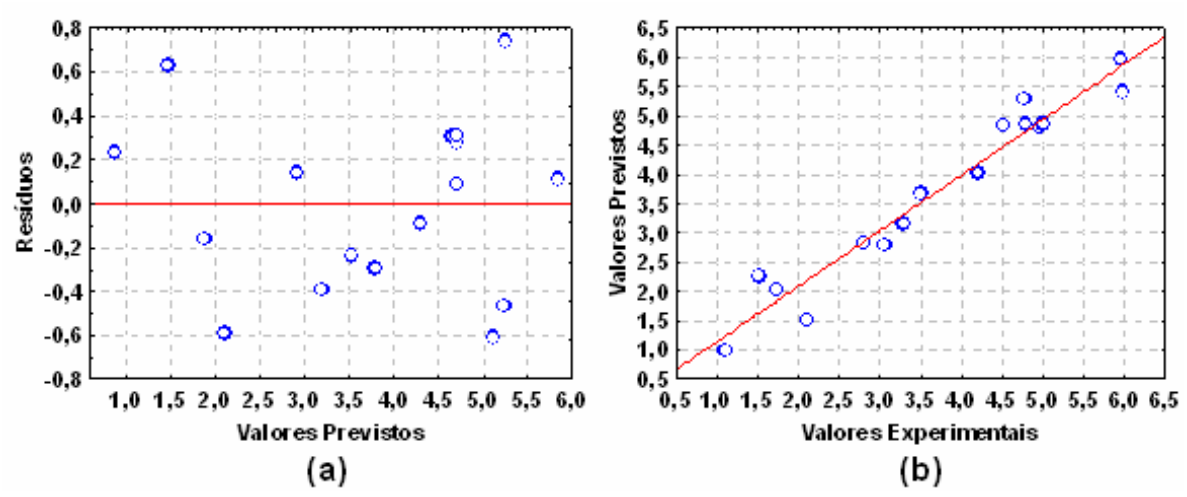


Figura 4.13 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade celulásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade celulásica. (b).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade celulásica são apresentadas as curvas de contorno nas Figuras 4.14 (a, b e c). Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis na forma real, duas a duas, em relação à resposta atividade celulásica.

Verifica-se, que as regiões de otimização, mostradas na Figura 4.14, apresentam as seguintes faixas de proporção de substrato (A/T) de 0,0 a 0,4 g/g, umidade de 33 a 50 mL/30 g e inóculo de 0,35 a 0,50 g/100 g. Com o objetivo de encontrar o ponto correspondente de maximização para a atividade da celulase, dentro da região de otimização, foi realizada a implementação de um algoritmo no software *Scilab 5.0.1*. Os valores reais destes pontos foram 0,055 g de resíduo de arroz/g de massa total, 41,42 mL/30 g de umidade e 0,37 g/100 g de inóculo, assim a produção desta enzima pode ser realizada na ausência de resíduo de arroz. Na condição otimizada (0,055 g de resíduo de arroz/g de massa total, 41,42 mL/30 g de umidade e 0,37 g/100 g de inóculo) foram realizados experimentos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, obtendo a atividade de 5,83 ± 0,9 U/g. E substituindo os valores das variáveis codificadas na Equação 4.6, obteve-se a atividade teórica de 6,06 U/g.

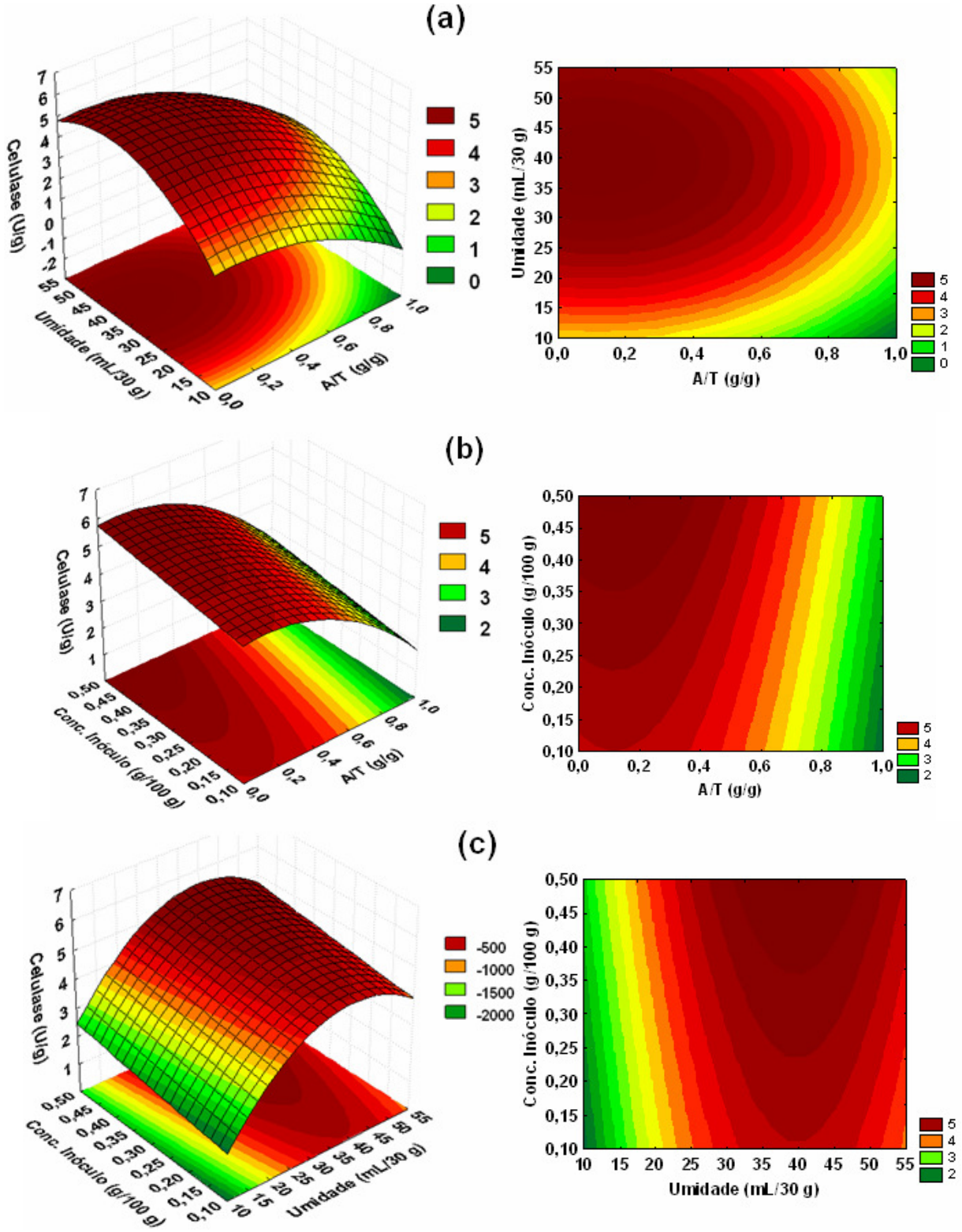


Figura 4.14 - Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da celulase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c).

Sukumaram et al (2009) avaliando a produção de ß-glucosidase com *Aspegillus niger* utilizando farelo de trigo em 72 horas de processo e com adição de nutrientes (peptona, extrato de levedura, uréia, sais de fósforo e de magnésio e oligoelementos) obtiveram a atividade de 4,55 U/g. Kang et al (2004), empregando palha de arroz e nutrientes (milho de maceração, extrato de levedura e sais de cobre, cobalto e fosforo) com *A. niger* para a produção de Fpase (atividade de hidrólise em papel de filtro) após 4 dias de fermentação obtiveram 19U/g. Zuñiga et al., (2009) na produção de FPase, xilanase e endoglicanase empregando bagaço de cana de açúcar e *A. niger* com nutrientes (uréia, peptona, extrato de levedura e outros) a temperatura de 32°C obteve, respectivamente, a atividade de 0,59, 43 e 41 U/g, após 72 de processo. O valor obtido neste estudo, em alguns casos, foi superior aos encontrados na literatura, porém neste trabalho não foi adicionado nutrientes e os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

A Tabela 4.10 apresenta a matriz do DCC com os valores reais, codificados das variáveis massa de resíduo de arroz /massa total ($X_1$), umidade ($X_2$) e concentração de inoculo ($X_3$) e para as respostas de atividade pectinásica.

Os resultados dos experimentos mostraram-se satisfatórios também para a atividade da pectinase, ajustando-se satisfatoriamente ao modelo apresentando valor de $R^2$ de 0,86.

As condições experimentais que forneceram maiores valores de atividade foram as dos experimentos 9 e os pontos centrais (15, 16 e 17). Para essa enzima também observou-se maior preferência pela casca de maracujá, haja visto o resultado obtido no experimento 9, que utiliza apenas a casca de maracujá como substrato. Comparando os experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14; verifica-se que maiores valores de atividade foram obtidos com maiores concentrações de inóculo. Comportamento inverso foi observado para a umidade (experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12).

Tabela 4.10 - Matriz do DCC para a atividade pectinásica.

| **Experimentos** | **Massa resíduo de arroz (g)/ Massa Total(g)** | **Umidade (mL/30 g)** | **Conc. De inoculo (g/100 g)** | **Pectinase (U/g)** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 2,09 ± 0,3 |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 2,87 ± 0,5 |
| 3 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 1,75 ± 0,2 |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 2,41 ± 0,3 |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 1,54 ± 0,1 |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 2,09 ± 0,4 |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 1,23 ± 0,2 |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 1,72 ± 0,2 |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5,24 ± 0,6 |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 2,35 ± 0,4 |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69(-α) | 0,25 (0) | 2,44 ± 0,3 |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) | 1,93 ± 0,2 |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) | 1,17 ± 0,1 |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45(α) | 3,61 ± 0,4 |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 4,87 ± 0,6 |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5,05 ± 0,7 |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5,10 ± 0,9 |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

Os efeitos das variáveis $X_1$, $X_2$ e $X_3$ são mostrados na Tabela 4.11. Observa-se que apenas a variável isolada $X_2$ não foi significativa para a resposta em questão. Os valores em destaque na Tabela 4.11, representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p) inferiores a 10% para a atividade da pectinase.

Tabela 4.11 - Coeficientes de regressão para a resposta pectinase.

| | **Coeficientes de regressão** | **Desvio** | **p – valor** |
|---|---|---|---|
| **Média** | **4,830** | **0,328921** | **0,000002** |
| **$X_1$ (L)** | **-0,553** | **0,185575** | **0,020497** |
| **$X_1$ (Q)** | **-0,441** | **0,244743** | **0,114201** |
| $X_2$ (L) | -0,186 | 0,185575 | 0,349380 |
| **$X_2$ (Q)** | **-1,321** | **0,244743** | **0,001012** |
| **$X_3$ (L)** | **0,496** | **0,185575** | **0,031928** |
| **$X_3$ (Q)** | **-1,209** | **0,244743** | **0,001676** |
| $X_1$ $X_2$ | 0,015 | 0,224057 | 0,948496 |
| $X_1$ $X_3$ | -0,050 | 0,224057 | 0,829785 |
| $X_2$ $X_3$ | -0,022 | 0,224057 | 0,922826 |

O modelo completo ajustado está descrito na Equação linear (4.7), cujos coeficientes foram estimados por regressão linear. A Tabela 4.11 mostra que as interações não apresentaram coeficientes significativos. Após a eliminação dos parâmetros não significativos (Equação 4.8) com $p > 0,10$, o valor do coeficiente de correlação ($R^2$) foi de 0,86.

**Atividade da Pectinase (U/g)** = $4,83 – 0,55X_1 – 0,44X_1^2 – 0,19X_2 – 1,32X_2^2 + 0,50X_3 – 1,21X_3^2 + 0,01X_1X_2 - 0,05X_1X_3 – 0,02X_2X_3$ (4.7)

**Atividade da Pectinase (U/g)** = $4,52 – 0,55X_1 – 1,32X_2^2 + 0,50X_3 - 1,21X_3^2$ (4.8)

Observa-se pelos valores dos coeficientes das variáveis na Equação (4.8) que a relação massa de resíduo de arroz/massa total e a concentração de inóculo mostraram efeitos significantes na atividade enzimática, pois apresentam os menores valores. O sinal positivo das variáveis para a concentração de inóculo e negativo para a relação A/T mostram que a atividade da pectinase aumenta com o aumento da concentração de inóculo e de casca de maracujá.

O Diagrama de Pareto (Figura 4.15) mostra os fatores avaliados (massa de resíduo de arroz/ massa total, umidade e concentração de inóculo) em ordem decrescente em relação aos seus efeitos. A linha vermelha separa os efeitos significativos ($p<0,10$).

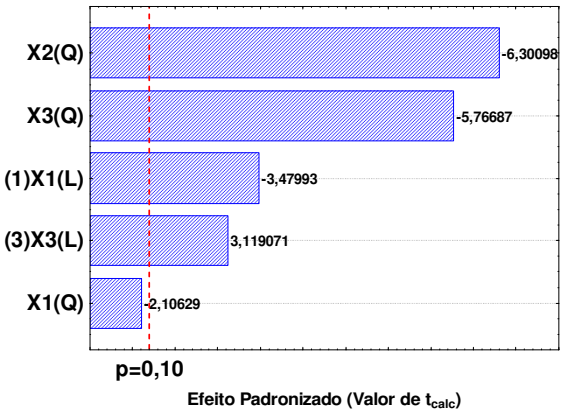


Figura 4.15 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de massa de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade pectinásica.

Com base na equação que representa o modelo (Equação 4.7), foi possível determinar os valores de atividade para diferentes relações de massa de resíduo de arroz/massa total e valores de umidade e de concentração de inóculo. A Figura 4.16 (a) relaciona os resíduos e os valores previstos nos experimentos demonstrando uma distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero. A Figura 4.16 (b) relaciona os valores previstos com os valores obtidos experimentalmente, observa-se que houve uma correlação considerável entre esses valores.

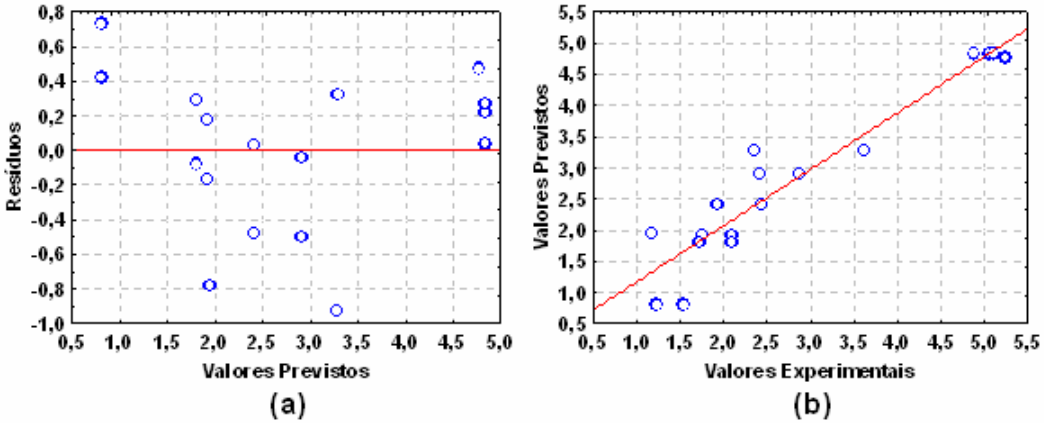


Figura 4.16 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade pectinásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade pectinásica. (b).

Os efeitos significativos foram os lineares da relação de massa de resíduo de arroz/massa total e concentração de inóculo, e os quadráticos das três variáveis estudadas, que geraram as superfícies de resposta ilustradas na Figura 4.17 (a, b e c).

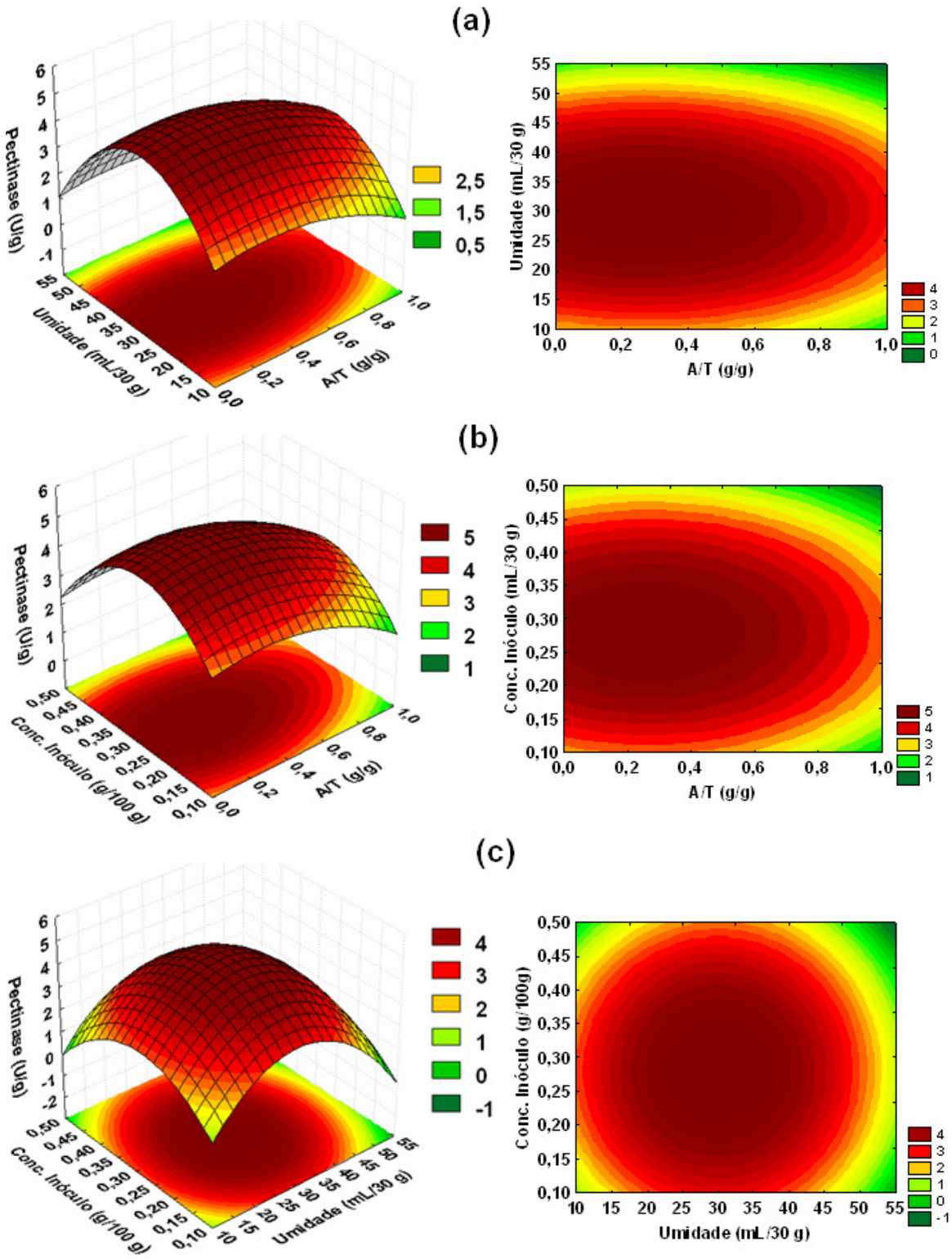


Figura 4.17 - Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da pectinase em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c).

As curvas de contorno mostram que o máximo de atividade se encontra entre 0,0 e 0,4 g/g em proporção de substrato (A/T), 23 e 37 mL/30 g de umidade e entre 0,23 e 0,33 g de inóculo/100 g de substrato. O ponto correspondente a maximização para a resposta atividade da pectinase foi obtido por um algoritmo implementado no software *Scilab 5.0.1.* Os valores reais destes pontos foram 0,26 g de resíduo de arroz/g massa total, 28,83 mL/30g de umidade e 0,28 g de inóculo/100 g de substrato.

Na condição otimizada (0,26 g de resíduo de arroz/g de massa total, 28,83 mL/30g de umidade e 0,28g/100g de inóculo) foram realizados experimentos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, obtendo a atividade de 5,02 ± 0,4 U/g. Substituindo os valores das variáveis codificadas na condição otimizada (Equação 4.8) obteve-se a atividade teórica de 5,06 U/g.

Debing et al., (2006) obteve a atividade da pectinase de 36,3U/g a partir de *A. niger*, utilizando dextrose de arroz, farelo de trigo e sulfato de amônio com amplo fornecimento de oxigênio. Neste trabalho o U foi definido em miligrama de ácido d-galacturônico/h. Patil et al., (2006) com *A. niger* empregando casca de grama verde e sacarose na produção de endo-pectinase após 96 horas obteve 45,9 U/g. Os valores obtidos neste estudo foram inferiores aos mencionados anteriormente, porém os substratos utilizados nos estudos citados apresentam maior valor agregado.

A Tabela 4.12 apresenta a matriz do DCC com os valores reais e codificados para as variáveis massa de resíduo de arroz /massa total ($X_1$), umidade ($X_2$) e concentração de inoculo ($X_3$) e as respostas para a atividade da protease.

Tabela 4.12 - Matriz do DCC para a atividade proteásica.

| Experimentos | Massa de resíduo de arroz (g)/ Massa Total(g) | Umidade (mL/30 g) | Conc. de inóculo (g/100 g) | Protease (U/g) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 4.215,00 ± 3,4 |
| 2 | 0,13 (-1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 3.223,00 ± 2,7 |
| 3 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 3.510,00 ± 2,6 |
| 4 | 0,13 (-1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 2.502,00 ± 1,8 |
| 5 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,10 (-1) | 3.009,00 ± 2,9 |
| 6 | 0,87 (1) | 15 (-1) | 0,40 (1) | 2.105,00 ± 1,5 |
| 7 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,10 (-1) | 2.512,00 ± 2,1 |
| 8 | 0,87 (1) | 45 (1) | 0,40 (1) | 1.804,00 ± 1,6 |
| 9 | 0 (-α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 4.015,00 ± 3,7 |
| 10 | 1 (α) | 30 (0) | 0,25 (0) | 2.806,00 ± 2,8 |
| 11 | 0,5 (0) | 9,69(-α) | 0,25 (0) | 3.016,00 ± 3,6 |
| 12 | 0,5 (0) | 50,28 (α) | 0,25 (0) | 2.011,00 ± 2,2 |
| 13 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,05 (-α) | 4.022,00 ± 3,0 |
| 14 | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,45(α) | 3.825,00 ± 2,7 |
| 15 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5.131,00 ± 3,2 |
| 16 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5.201,00 ± 3,8 |
| 17 (C) | 0,5 (0) | 30 (0) | 0,25 (0) | 5.013,00 ± 3,9 |

Massa de resíduo de arroz/massa total = quantidade de resíduo de arroz utilizado /quantidade total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá); Umidade = volume de sobrenadante do inóculo centrifugado/massa de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) . volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

As condições experimentais que forneceram maiores valores de atividade da protease foram as dos experimentos nos pontos centrais (15, 16 e 17). Como para as enzimas celulase e pectinase, para a protease observou-se também a preferência pela casca de maracujá, conforme resultado obtido no experimento 9 que utiliza apenas a casca de maracujá como substrato e na comparação entre os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, obteve-se maiores valores de atividade para maiores concentrações de casca de maracujá. Comparando os experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14; verifica-se que maiores valores de atividade foram obtidos com menores concentrações de inóculo. Comportamento igual foi observado para a umidade (experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12). Provavelmente devido a alta concentração de proteína presente no substrato, conforme mostra os resultados de sua caracterização (Tabela 4.1), não houve necessidade de grandes

quantidades de inóculo para uma alta produção de protease. Além disso, esta proteína deve estar facilmente disponível para o micro-organismo, não havendo necessidade de alta umidade para reduzir os problemas relacionados à transferência de massa e melhorar a acessibilidade da mesma ao *A. niger.*

Os efeitos significantes de $X_1$, $X_2$ e $X_3$ na atividade da protease e as interações entre os fatores são mostrados na Tabela 4.13. A relação de massa de resíduo de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo mostraram efeitos significantes na atividade enzimática, tanto em nível linear quanto quadrático. Os valores em destaque na Tabela 4.13, representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p) inferiores a 10% para a atividade da protease.

Tabela 4.13 - Coeficientes de regressão para a resposta protease.

| | **Coeficientes de regressão** | **Erro padrão** | **p – valor** |
|---|---|---|---|
| **Média** | **4888,40** | **215,3103** | **0,000000** |
| **$X_1$ (L)** | **-485,87** | **121,4765** | **0,005192** |
| **$X_1$ (Q)** | **-652,09** | **160,2080** | **0,004748** |
| **$X_2$ (L)** | **-305,71** | **121,4765** | **0,040006** |
| **$X_2$ (Q)** | **-1141,01** | **160,2080** | **0,000190** |
| **$X_3$ (L)** | **-332,74** | **121,4765** | **0,028954** |
| **$X_3$ (Q)** | **-370,92** | **160,2080** | **0,053768** |
| $X_1$ $X_2$ | 78,73 | 146,6670 | 0,608063 |
| $X_1$ $X_3$ | 48,72 | 146,6670 | 0,749453 |
| $X_2$ $X_3$ | 21,37 | 146,6670 | 0,888236 |

Utilizando-se os resultados apresentados na Tabela 4.13, após a realização de regressão múltipla no software *Statistica 7*, determinou-se os coeficientes de regressão para atividade da protease. O modelo completo está apresentado na Equação (4.9). Após a eliminação dos parâmetros não significativos com $p > 0,10$, obteve-se a Equação (4.10) e o valor do coeficiente de correlação ($R^2$) foi de 0,93.

**Atividade da Protease (U/g)** = $4.888,40 - 485,87X_1 - 652,09X_1^2 - 305,71\ X_2 - 1.141,01\ X_2^2 - 332,74X_3 - 370,92\ X_3^2 + 78,73\ X_1\ X_2 + 48,72\ X_1\ X_3 + 21,37\ X_2\ X_3$ (4.9)

**Atividade da Protease (U/g)** = $4.888,40 - 485,87\ X_1 - 652,09X_1^2 - 305,71\ X_2 - 1.141,01\ X_2^2 - 332,74X_3 - 370,92\ X_3^2$ (4.10)

Observa-se pela Equação 4.10 e no Diagrama de Pareto (Figura 4.18), que a atividade da protease foi influenciada pelas variáveis isoladas $X_1$, $X_2$ e $X_3$. O sinal negativo destas para a concentração de inóculo, umidade e relação A/T mostram que a atividade da protease aumenta com o aumento da concentração de casca de maracujá e com a redução na concentração de inóculo e de umidade, como foi também observado anteriormente na Tabela 4.12.

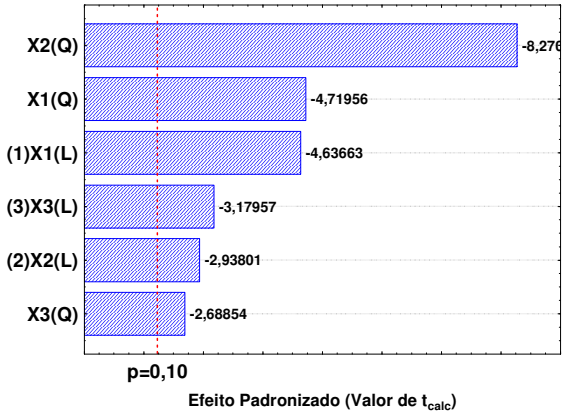


Figura 4.18 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de arroz/massa total, umidade e concentração de inóculo para a atividade proteásica.

Este modelo apresentou alto valor de $R^2$ (0,93), indicando que ele explica mais de 93% da variabilidade dos dados experimentais. Espera-se, assim, uma distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero e uma relação próxima entre os valores obtidos experimentalmente e os valores teóricos previstos. Essas correlações são ilustradas na Figura 4.19 (a e b), respectivamente.

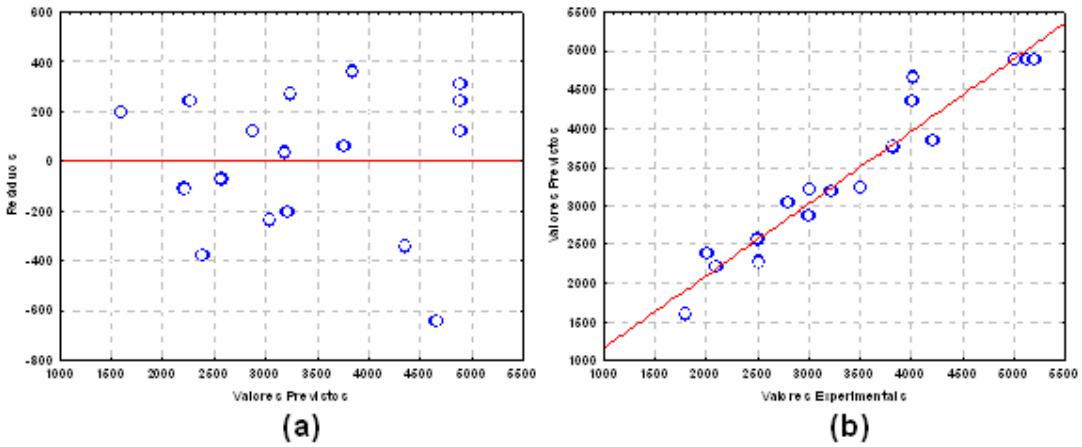


Figura 4.19 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade proteásica (a) e Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade proteásica (b).

As Figuras 4.20 (a, b e c) ilustram os efeitos das variáveis na atividade da protease, por meio das curvas de contorno e superfícies de resposta, mostrando a região de otimização.

As curvas de contorno mostram que o máximo de atividade se encontra entre 0,3 e 0,5 g/g em proporção de substrato, 22 e 33 mL/30 g de umidade e entre 0,23 e 0,33 g de inóculo/100 g de substrato. O ponto correspondente a maximização para a resposta atividade da protease foi obtido por meio de um algoritmo implementado no software *Scilab 5.0.1*. Os valores reais destes pontos foram 0,35 g de resíduo de arroz/g massa total, 27,70 mL/30 g de umidade e 0,18 g de inóculo/100 g de substrato. Na condição otimizada apresentada anteriormente foram realizados experimentos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, obtendo a atividade de 5.051,20 ± 3,3 U/g. Ao substituir os valores das variáveis codificadas na condição otimizada (Equação 4.10) obteve-se a atividade teórica de 5.091,00 U/g.

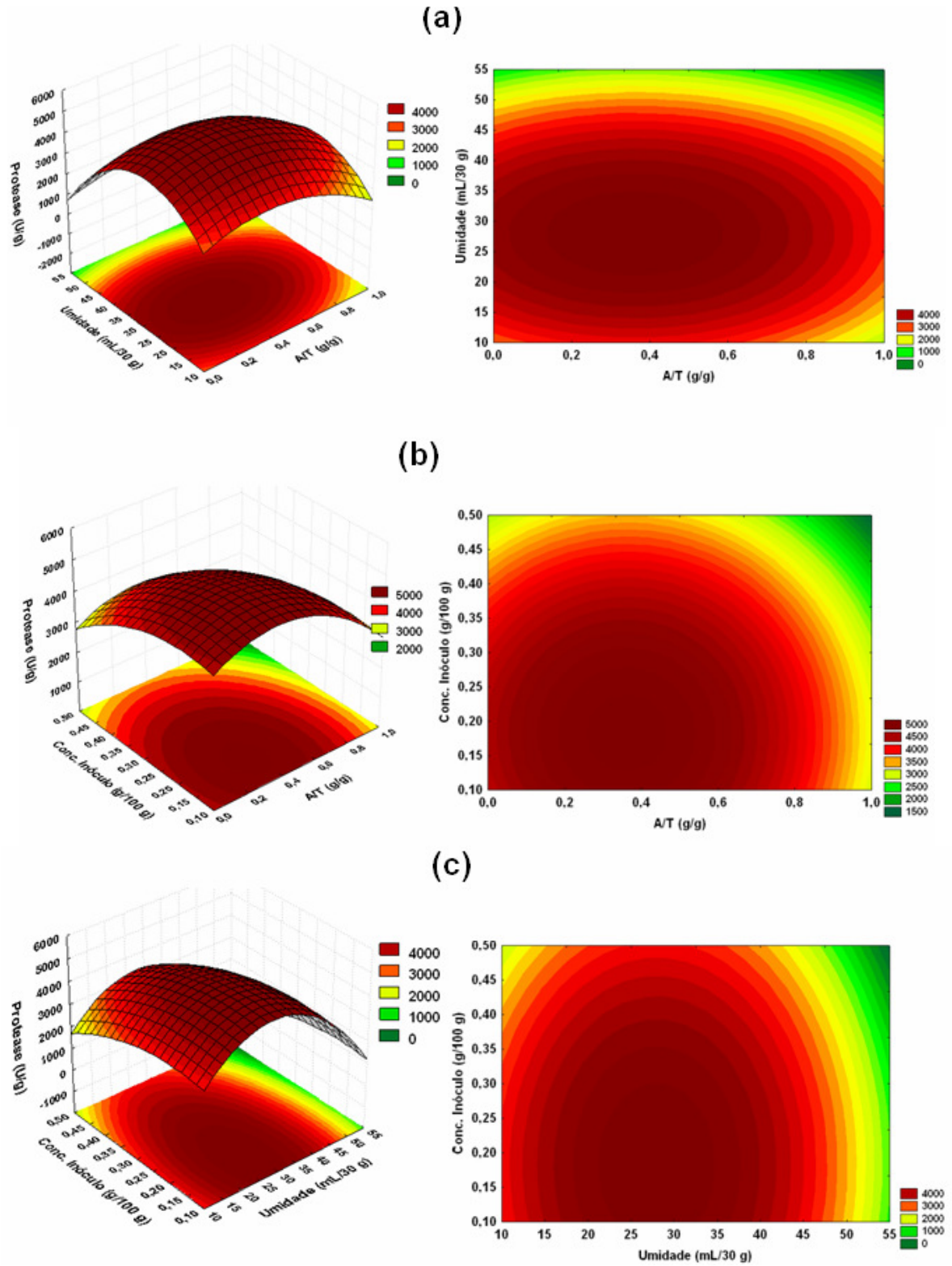


Figura 4.20 - Curvas de contorno e superfícies de resposta para a atividade da protease em função da umidade e de A/T (a), da concentração de inóculo e de A/T (b) e da concentração de inóculo e da umidade (c).

Paranthaman et al., (2009) avaliando a produção de protease com *A. niger* e arroz a 35°C obtiveram 67,7 U/g em 96 horas de fermentação. Sandhya et al., (2005) empregando farelo de trigo e *A orysae* obtiveram 31,2 U/g em 72 horas de processo a 30°C. Castro et al., (2009b e 2009c) utilizando *A orysae* e como substrato torta de girassol deslipidificada e farelo de algodão obtiveram, respectivamente as atividade de 270 e 290 U/g a 30°C, após 48 h de fermentação. Freitas et al., (2009) empregando torta de canola e meio nutriente de extrato de levedura e *A. orysae* obtiveram 393 U/g em 96 horas de processo a 20°C. Couri et al., (2000) com *A. niger* e utilizando como substrato farelo de trigo e pectina cítrica obtiveram a atividade de 5,27 U/mL (unidade de enzima por preparo enzimático) em 42 horas a 32°C. Neste trabalho os melhores resultados obtidos foram para a produção de enzima protease. Os valores determinados em termos de atividade enzimática para essa enzima estão muito acima dos encontrados na literatura, mostrando uma boa adaptação do micro-organismo aos substratos utilizados.

A Tabela 4.14 resume os resultados obtidos para as cinco respostas estudadas. Analisando a Tabela 4.14 e visando a produção do conjunto enzimático, pode-se concluir a partir dos resultados experimentais e da análise estatística a partir do delineamento composto central, que a melhor condição para a produção conjunta das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease por fermentação em estado sólido, foi a condição experimental do ponto central (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e concentração de Inóculo = 0,25 g/100 g). Para a relação A/T verifica-se que o ponto central (A/T = 0,5 g/g) não atende apenas as enzimas celulase e pectinase, porém este valor fica bastante próximo ao limite superior da região de otimização. Com relação à umidade a concentração de 30 mL/30 g de sólido atende todas as enzimas avaliadas e a concentração de inóculo de 0,25 g/100 g de sólido fermentado não se encontra dentro da região de otimização apenas para a enzima celulase, mais este valor também encontra-se bastante próximo ao limite inferior desta região. Vale ressaltar também, que analisando os resultados obtidos nas Tabelas 4.4, 4.6, 4.8, 4.10 e 4.12, os valores de atividade no ponto central, para todas as enzimas estudadas, não se encontram muito abaixo dos demais ensaios determinados no DCC.

Tabela 4.14 – Resumo dos resultados obtidos para as enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease.

| | **Invertase (U/g)** | **Amilase (U/g)** | **Celulase (U/g)** | **Pectinase (U/g)** | **Protease (U/g)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Região de otimização da proporção de substrato (A/T) (g arroz / g massa total)** | 0,45 a 0,85 | 0,5 a 1,0 | 0,0 a 0,4 | 0,0 a 0,4 | 0,3 a 0,5 |
| **Região otimização da umidade (mL / 30g de substrato)** | 28 a 35 | 25 a 40 | 33 a 50 | 23 a 37 | 22 a 33 |
| **Região otimização da concentração de inoculo (g de inóculo / 100 g de substrato)** | 0,20 a 0,35 | 0,27 a 0,43 | 0,35 a 0,50 | 0,23 a 0,33 | 0,10 a 0,3 |
| **Ponto de Maximização da proporção de substrato (A/T) (g arroz / g massa total)** | 0,65 | 0,84 | 0,05 | 0,26 | 0,35 |
| **Ponto de Maximização da umidade (mL / 30g de substrato)** | 31,32 | 33,17 | 41,42 | 28,83 | 27,70 |
| **Ponto de Maximização da concentração de inóculo (g de inóculo / 100 g de substrato)** | 0,29 | 0,36 | 0,37 | 0,28 | 0,18 |
| **Maior atividade obtida no DCC (experimental)** | 108,82 ± 3,1 | 10,56 ± 2,0 | 5,98 ± 0,8 | 5,24 ± 0,6 | 5.201,00 ± 3,8 |
| **Atividade na condição otimizada (resultados experimentais)*0** | 109,27 ± 2,9 | 10,67 ± 2,3 | 5,83 ± 0,9 | 5,02 ± 0,4 | 5.051,20 ± 3,3 |
| **Atividade teórica**** | 117,67 | 11,12 | 6,06 | 5,06 | 5.091,00 |

* Tais testes foram feitos visando verificar a reprodutibilidade dos resultados
** Substituindo-se os valores das variáveis codificadas na condição otimizada

## 4.4 – Cinéticas de fermentação para a condição otimizada

Tendo em vista as condições pré-estabelecidas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e Inóculo = 0,25 g/100 g), determinadas pela metodologia de análise da superfície de resposta, realizou-se o estudo cinético do processo nas temperaturas 28 ± 2ºC, 35 ± 0,5ºC, 40 ± 0,5ºC e 45 ± 0,5ºC para avaliar o efeito da temperatura no crescimento celular e produção enzimática.

As Figuras 4.21 (a e b) apresentam a cinética de crescimento celular descritas pela biomassa e pelo número de esporos formados. Pode-se notar, que o maior crescimento da biomassa e maior número de esporos foi observado para as temperaturas de 35ºC e 40ºC, assim a temperatura ótima para o crescimento celular está entre 35°C e 40ºC. Também é possível observar que a temperatura de crescimento ótimo está no intervalo citado, embora o *Aspergillus niger* cresça de forma satisfatória em todo intervalo de temperatura estudado.

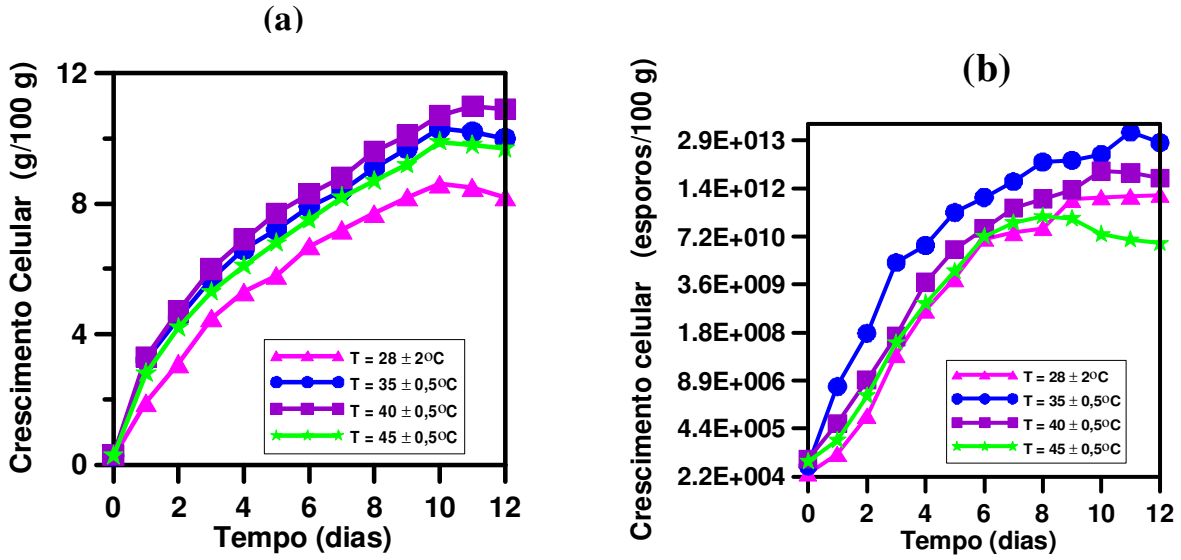


Figura 4.21 – (a) Cinética de crescimento celular do *Aspegillus niger* ATCC 16404 (biomassa) e (b) Cinética de crescimento celular (número de esporos formados), nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo do cultivo de 12 dias.

A Figura 4.22 representa os pontos experimentais com as respectivas curvas geradas pelo ajuste destes pontos ao modelo de Dalsenter et al., (2005) e a Tabela 4.15 mostra os parâmetros associados ao respectivo ajuste.

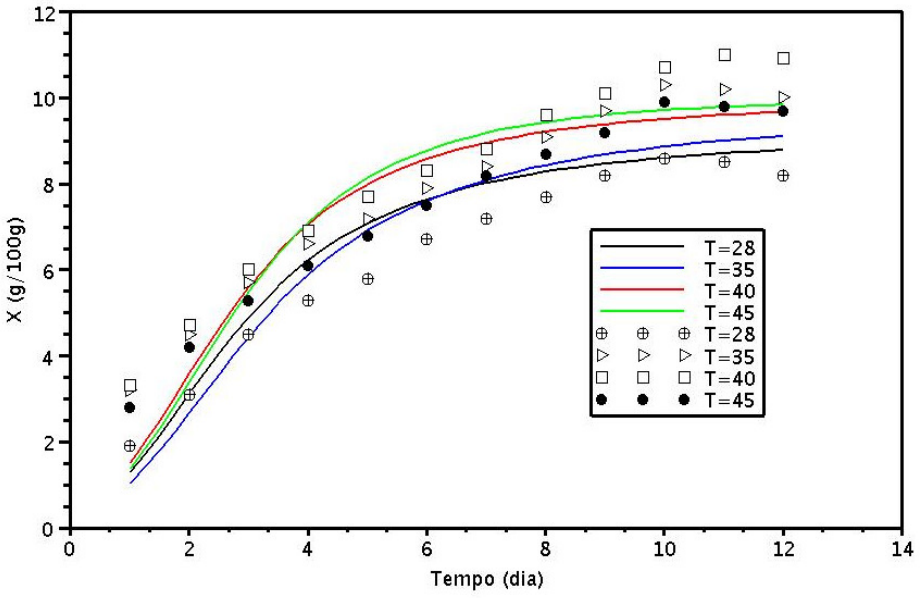


Figura 4.22 – Curva de crescimento do *Aspergillus níger* ATCC 16404, em g de células por 100 g de substrato em função do tempo, nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo do cultivo de 12 dias. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Dalsenter e colaboradores (2005) aos dados experimentais.

Tabela 4.15 – Parâmetros de ajuste do crescimento ao modelo de Dalsenter e colaboradores (2005) Equações (2.6)-(2.9), (R=0,922 e $R^2$=0,850)

| Parâmetro | Valor | Unidade |
|---|---|---|
| $\mu_m$ | 2,2644 | $dia^{-1}$ |
| $\mu_m$ | 0,0944 | $h^{-1}$ |
| n | 0,5393 | g/g |
| $E_s$ | 117,67 | kJ/mol |
| $E_d$ | 12,78 | kJ/mol |
| $A_s$ | $2,11x10^{10}$ | $dia^{-1}$ |
| $A_d$ | 8,06 | $dia^{-1}$ |

Sendo, $\mu_m$ velocidade máxima de crescimento celular, $E_s$ e $E_d$ energia de ativação das reações de síntese e degradação de F, F concentração adimensional de um componente intracelular,

$A_s$ e $A_d$ fatores de freqüência da equação de Arrhenius, e n o expoente da equação que representa o modelo de ordem n de degradação do componente F.

Saucedo-Castañeda et al., (1990), trabalhando com uma metodologia diferente em condições otimizadas em um reator obtiveram uma máxima concentração celular em 20h de fermentação e como parâmetro associado a este crescimento celular obteve $\mu_m = 0,3\ h^{-1}$, o presente trabalho obteve um tempo de crescimento celular de 11 dias e um valor de velocidade máxima de crescimento celular de $\mu_m = 0,09h^{-1}$. Raimbault et al., (1980), obteve para temperatura de 35ºC, de forma experimental e calculada $\mu_m = 0,31\ h^{-1}$ e $\mu_m = 0,27\ h^{-1}$, respectivamente. Parte da diferença entre os valores pode ser explicada pelo fato do farelo de trigo, utilizado nos experimentos dos autores, ser um meio mais nutritivo que o utilizado neste experimento e pelo fato das condições utilizadas pelos autores serem otimizadas.

A Tabela 4.16 apresenta os resultados do estudo cinético para a atividade invertásica nas temperaturas estudadas e estes podem ser melhor analisados na Figura 4.23.

Tabela 4.16 – Resultados do estudo cinético para a atividade invertásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e Inóculo = 0,25 g/100 g).

| **Tempo (dias)** | **Atividade (U/g) T= 28 ± 2ºC** | **Atividade (U/g) T = 35 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 40 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 45 ± 0,5C** |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 10,30 ± 0,6 | 12,70 ± 0,9 | 13,40 ± 1,00 | 7,70 ± 0,4 |
| **2** | 49,70 ± 0,9 | 52,70 ± 1,01 | 43,70 ± 1,05 | 25,80 ± 0,9 |
| **3** | 81,20 ± 1,38 | 82,90 ± 1,43 | 62,80 ± 1,16 | 38,70 ± 0,99 |
| **4** | 100,20 ± 1,76 | 107,50 ± 1,84 | 73,70 ± 1,28 | 54,50 ± 1,01 |
| **5** | 115,50 ± 1,83 | 120,30 ± 1,92 | 86,20 ± 1,41 | 60,20 ± 1,08 |
| **6** | 120,30 ± 1,95 | 132,70 ± 2,33 | 92,30 ± 1,67 | 66,70 ± 1,11 |
| **7** | 123,70 ± 2,14 | 137,90 ± 2,45 | 98,40 ± 1,75 | 79,80 ± 1,17 |
| **8** | 125,20 ± 2,29 | 143,80 ± 2,94 | 100,10 ± 1,82 | 82,10 ± 1,19 |
| **9** | 127,30 ± 2,35 | 149,20 ± 2,99 | 102,90 ± 1,90 | 85,20 ± 2,03 |
| **10** | 129,20 ± 2,54 | 151,30 ± 3,08 | 103,70 ± 1,93 | 87,70 ± 2,14 |
| **11** | 130,50 ± 2,87 | 155,80 ± 3,28 | 104,20 ± 1,97 | 87,50 ± 2,12 |
| **12** | 130,90 ± 3,06 | 155,20 ± 3,22 | 104,70 ± 2,01 | 89,00 ± 2,18 |

A/T = g de resíduo de arroz utilizado /g total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá), Umidade = volume de sobrenadante do inóculo/quantidade de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

De acordo com a Figura 4.23 pode-se observar que a fermentação à temperatura de 35ºC apresentou uma atividade invertásica superior às outras temperaturas analisadas para todo o tempo em estudo, obtendo atividade máxima de 155,80 U/g no 11º dia da fermentação. Nas temperaturas de fermentação de 28ºC, 40ºC e 45ºC, nota-se na Figura 4.23 um aumento menor, mas crescente nas atividades até o 12º dia de fermentação. Embora o aumento da atividade tenha sido observado ao longo de todo tempo de fermentação tem-se que até o quarto dia, o crescimento da atividade enzimática foi exponencial, obtendo aumentos nas atividades de 31%, 44%, 42% e 63% para as temperaturas de 28ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC, respectivamente, e que após o sexto dia de fermentação o aumento ocorreu de forma menos expressiva, com aumentos nas atividades de 9%, 17%, 13% e 33%, respectivamente, para as temperaturas de 28ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC.

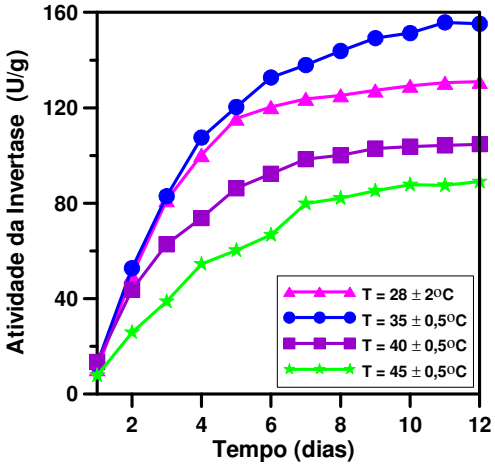


Figura 4.23 – Cinética da atividade invertásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias.

Os resultados da atividade amilásica são apresentados na Figura 4.24 e na Tabela 4.17. É possível observar que exceto para 45ºC a produção enzimática aumenta ao longo de todo intervalo de tempo estudado. Para 45ºC houve um decréscimo da atividade após o sétimo dia de fermentação. Assim ocorre a produção de amilase de forma satisfatória para temperaturas inferiores a 45ºC sendo que a melhor temperatura para produção desta enzima é de 28ºC e 35ºC. Nota-se também que para todas as temperaturas estudadas até o quarto dia de fermentação o ritmo de crescimento da atividade

diminui, sendo que para algumas temperaturas ele estabiliza e até ocorre uma redução da mesma, como mencionado anteriormente.

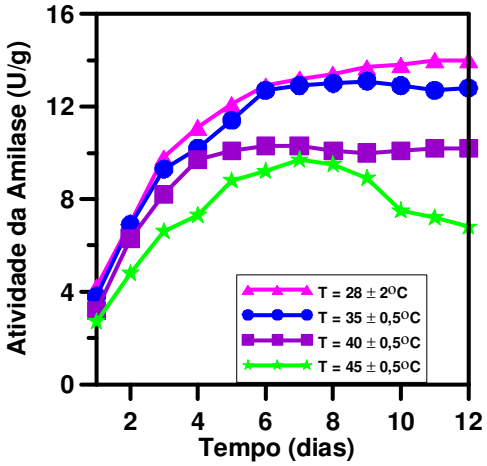


Figura 4.24 – Cinética da atividade amilásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias.

Tabela 4.17 – Resultados do estudo cinético para a atividade amilásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e Inóculo = 0,25 g/100 g).

| Tempo (dias) | Atividade (U/g) T= 28 ± 2ºC | Atividade (U/g) T = 35 ± 0,5ºC | Atividade (U/g) T = 40 ± 0,5ºC | Atividade (U/g) T = 45 ± 0,5C |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 4,20 ± 0,75 | 3,80 ± 0,87 | 3,20 ± 0,75 | 2,70 ± 0,58 |
| **2** | 7,00 ± 0,94 | 6,90 ± 1,14 | 6,30 ± 1,09 | 4,80 ± 0,84 |
| **3** | 9,80 ± 1,17 | 9,30 ± 1,84 | 8,20 ± 1,15 | 6,60 ± 0,98 |
| **4** | 11,10 ± 1,51 | 10,20 ± 1,99 | 9,70 ± 1,28 | 7,30 ± 1,00 |
| **5** | 12,10 ± 1,96 | 11,40 ± 2,05 | 10,10 ± 1,85 | 8,80 ± 1,08 |
| **6** | 12,90 ± 1,98 | 12,70 ± 2,13 | 10,30 ± 1,98 | 9,20 ± 1,28 |
| **7** | 13,20 ± 2,13 | 12,90 ± 2,19 | 10,30 ± 1,97 | 9,70 ± 1,35 |
| **8** | 13,40 ± 2,20 | 13,00 ± 2,21 | 10,10 ± 1,78 | 9,50 ± 1,29 |
| **9** | 13,70 ± 2,35 | 13,10 ± 2,29 | 10,00 ± 1,76 | 8,90 ± 1,20 |
| **10** | 13,80 ± 2,39 | 12,90 ± 2,22 | 10,10 ± 1,80 | 7,50 ± 1,16 |
| **11** | 14,00 ± 2,41 | 12,70 ± 2,16 | 10,20 ± 1,90 | 7,20 ± 1,09 |
| **12** | 14,00 ± 2,42 | 12,80 ± 2,18 | 10,20 ± 1,87 | 6,80 ± 1,05 |

A/T = g de resíduo de arroz utilizado /g total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá), Umidade = volume de sobrenadante do inóculo/quantidade de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) . volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

A cinética de atividade celulásica para as temperaturas de 28°C, 35ºC, 40ºC e 45ºC é apresentada na Tabela 4.18 e Figura 4.25 que mostram que para todo intervalo de temperatura estudado há produção da enzima, sendo que as maiores temperaturas favorecem uma maior produção da enzima. Para esta enzima observa-se que após o quarto dia ocorreu um aumento na atividade de 37%, 26%, 43% e 53%, respectivamente, para as temperaturas de 28°C, 35ºC, 40ºC e 45ºC, e após o sexto dia o aumento na atividade de 18%, 9%, 23% e 18%, respectivamente, para as temperaturas de 28°C, 35ºC, 40ºC e 45ºC, verificando que a taxa de crescimento da atividade ainda é considerável.

Tabela 4.18 – Resultados do estudo cinético para a atividade celulásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e Inoculo = 0,25 g/100 g).

| **Tempo (dias)** | **Atividade (U/g) T= 28 ± 2ºC** | **Atividade (U/g) T = 35 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 40 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 45 ± 0,5C** |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 2,10 ± 0,30 | 3,10 ± 0,33 | 4,20 ± 0,38 | 4,30 ± 0,41 |
| **2** | 3,80 ± 0,39 | 5,20 ± 0,70 | 6,30 ± 0,81 | 7,10 ± 0,94 |
| **3** | 4,50 ± 0,42 | 6,30 ± 0,84 | 7,90 ± 1,20 | 8,40 ± 1,30 |
| **4** | 5,10 ± 0,65 | 6,80 ± 0,92 | 8,80 ± 1,46 | 9,20 ± 1,53 |
| **5** | 5,50 ± 0,74 | 7,30 ± 1,00 | 9,00 ± 1,52 | 10,10 ± 1,64 |
| **6** | 5,90 ± 0,79 | 7,90 ± 1,19 | 10,20 ± 1,68 | 11,90 ± 1,92 |
| **7** | 6,30 ± 0,82 | 8,10 ± 1,21 | 10,80 ± 1,73 | 12,30 ± 1,95 |
| **8** | 6,70 ± 0,87 | 8,30 ± 1,28 | 11,20 ± 1,82 | 12,70 ± 1,97 |
| **9** | 7,00 ± 0,92 | 8,40 ± 1,31 | 11,80 ± 1,89 | 13,00 ± 2,05 |
| **10** | 7,20 ± 0,98 | 8,50 ± 1,37 | 12,50 ± 1,96 | 13,60 ± 2,12 |
| **11** | 7,20 ±0,96 | 8,60 ± 1,40 | 12,70 ± 1,99 | 13,80 ± 2,18 |
| **12** | 7,00 ± 0,92 | 8,60 ± 1,43 | 12,60 ± 2,02 | 14,10 ± 2,25 |

A/T = g de resíduo de arroz utilizado /g total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá), Umidade = volume de sobrenadante do inóculo/quantidade de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

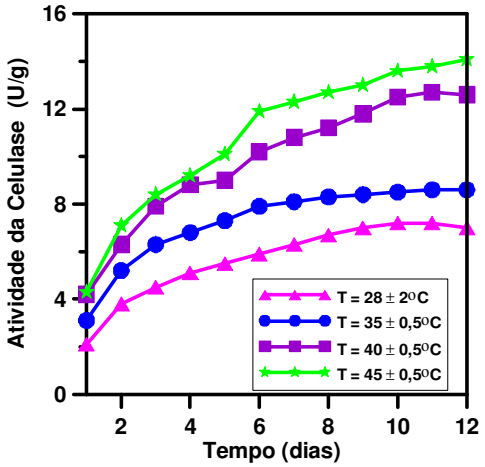


Figura 4.25 – Cinética da atividade celulásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias.

A Tabela 4.19 apresenta os resultados do estudo cinético para a atividade pectinase nas temperaturas estudadas e estes podem ser melhor analisados na Figura 4.26.

Tabela 4.19 – Resultados do estudo cinético para a atividade péctinásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/30 g e Inoculo = 0,25 g/100 g).

| **Tempo (dias)** | **Atividade (U/g) T= 28 ± 2ºC** | **Atividade (U/g) T = 35 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 40 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 45 ± 0,5C** |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 2,50 ± 0,3 | 2,60 ± 0,3 | 2,20 ± 0,4 | 2,30 ± 0,4 |
| **2** | 3,70 ± 0,4 | 3,90 ± 0,7 | 4,10 ± 0,5 | 3,70 ± 0,6 |
| **3** | 4,30 ± 0,5 | 4,50 ± 0,7 | 5,00 ± 0,6 | 4,90 ± 0,6 |
| **4** | 4,90 ± 0,6 | 5,30 ± 0,7 | 5,70 ± 0,6 | 5,50 ± 0,8 |
| **5** | 5,30 ± 0,6 | 5,70 ± 0,8 | 6,30 ± 0,8 | 6,,60 ± 0,9 |
| **6** | 5,50 ± 0,7 | 6,20 ± 0,9 | 7,00 ± 0,9 | 7,60 ± 0,9 |
| **7** | 5,70 ± 0,7 | 6,90 ± 1,0 | 7,60 ± 0,9 | 8,80 ± 1,0 |
| **8** | 6,00 ± 0,9 | 7,20 ± 0,8 | 7,80 ± 0,9 | 9,80 ± 1,1 |
| **9** | 6,10 ± 0,8 | 7,70 ± 0,8 | 8,10 ± 1,0 | 10,20 ± 1,3 |
| **10** | 6,30 ± 0,8 | 8,10 ± 0,9 | 8,50 ± 1,1 | 10,70 ± 1,4 |
| **11** | 6,50 ± 0,8 | 8,60 ± 0,9 | 8,90 ± 1,2 | 10,50 ± 1,4 |
| **12** | 6,50 ± 0,7 | 9,00 ± 0,9 | 9,20 ± 1,1 | 10,80 ± 1,5 |

A/T = g de resíduo de arroz utilizado /g total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá), Umidade = volume de sobrenadante do inóculo/quantidade de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) **.** volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

Nota-se na Tabela 4.19 e Figura 4.26 que para a cinética da atividade pectinásica o efeito da temperatura na produção desta enzima foi o mesmo observado no estudo da celulase, porém a comparação entre o efeito das temperaturas nos casos de produção de pectinase e celulase mostra que as maiores temperaturas geram um aumento na atividade quando se trata da enzima celulase. Porém analisando com mais critérios os resultados nota-se que após o oitavo dia os aumentos na atividade foram de 8%, 25%, 18% e 10% para as temperaturas de 28ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC, respectivamente, mostrando que após esse tempo a taxa de crescimento da mesma reduz significativamente para as temperaturas de 28ºC, 40ºC e 45ºC e provavelmente um maior tempo de fermentação não seria economicamente viável. Para a temperatura de 35ºC, deve-se avaliar o tempo de fermentação até o nono dia, pois após esse tempo, o aumento na atividade foi de 16%.

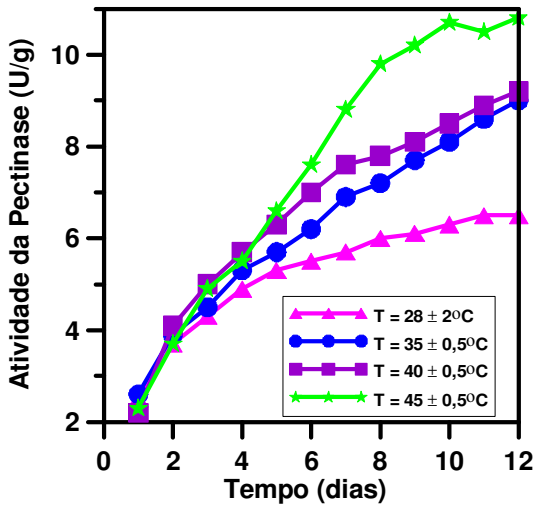


Figura 4.26 – Cinética da atividade pectinásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias.

Analisando as respostas obtidas na cinética da atividade proteásica, apresentadas na Figura 4.27 e na Tabela 4.20, nota-se que ocorre perda de atividades de 30% para o sexto dia de fermentação a 40ºC e de 27% para o sexto dia de fermentação a 45ºC. Também foi constatado que as atividades a 28°C e 35°C foram muito próximos uma da outra para todos os tempos de fermentação estudados. Os resultados mostram também que para todas as temperaturas entre 4 e 6 dias de fermentação a atividade foi praticamente constante.

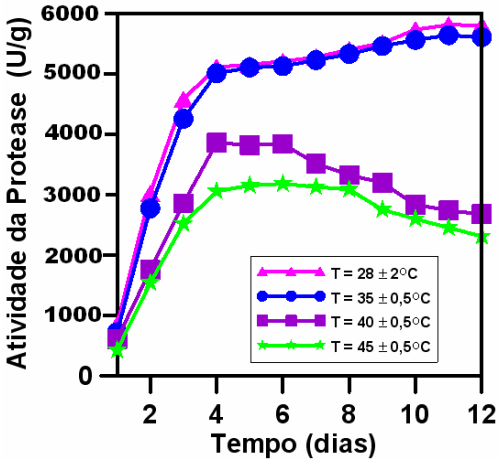


Figura 4.27 – Cinética da atividade proteásica nas temperaturas T = 28ºC, T = 35ºC, T = 40ºC e T = 45ºC ao longo de 12 dias.

Tabela 4.20 – Resultados do estudo cinético para a atividade proteásica nas condições otimizadas (A/T = 0,5 g/g; Umidade = 30 mL/ 30g e Inóculo = 0,25 g/100 g).

| **Tempo (dias)** | **Atividade (U/g) T= 28 ± 2ºC** | **Atividade (U/g) T = 35 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 40 ± 0,5ºC** | **Atividade (U/g) T = 45 ± 0,5C** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 855,00 ± 0,9 | 725,00 ± 0,8 | 612,00 ± 0,6 | 427,00 ± 0,5 |
| 2 | 3.024,00 ± 2,5 | 2.773,00 ± 1,8 | 1.754,00 ± 1,1 | 1.542,00 ± 1,0 |
| 3 | 4.578,00 ± 3,6 | 4.255,00 ± 3,4 | 2.857,00 ± 2,4 | 2.518,00 ± 1,6 |
| 4 | 5.107,00 ± 3,9 | 5.007,00 ± 3,7 | 3.855,00 ± 2,9 | 3.057,00 ± 2,5 |
| 5 | 5.152,00 ± 3,9 | 5.102,00 ± 3,8 | 3.821,00 ± 2,9 | 3.152,00 ± 2,5 |
| 6 | 5.203,00 ± 4,0 | 5.124,00 ± 3,8 | 3.840,00 ± 2,7 | 3.181,00 ± 2,6 |
| 7 | 5.274,00 ± 3,8 | 5.225,00 ± 3,8 | 3.513,00 ± 2,8 | 3.128,00 ± 2,6 |
| 8 | 5.397,00 ± 3,9 | 5.326,00 ± 3,9 | 3.325,00 ± 2,7 | 3.087,00 ± 2,4 |
| 9 | 5.508,00 ± 4,10 | 5.457,00 ± 3,9 | 3.197,00 ± 2,7 | 2.752,00 ± 1,8 |
| 10 | 5.729,00 ± 4,20 | 5.558,00 ± 4,10 | 2.834,00 ± 2,4 | 2.598,00 ± 1,7 |
| 11 | 5.809,00 ± 4,20 | 5.637,00 ± 4,10 | 2.738,00 ± 2,5 | 2.454,00 ± 1,6 |
| 12 | 5.801,00 ± 4,21 | 5.603,00 ± 4,12 | 2.678,00 ± 2,5 | 2.311,00 ± 1,5 |

A/T = g de resíduo de arroz utilizado /g total de substrato (massa de resíduo de arroz + massa de resíduo de maracujá), Umidade = volume de sobrenadante do inóculo/quantidade de substrato utilizado no experimento, Inóculo = concentração de micro-organismos (massa seca) . volume de diluíção do sólido fermentado/massa de substrato.

Os resultados experimentais da condição otimizada no DCC (Tabela 4.14) quando comparados aos da cinética nos testes preliminares para quatro dias de fermentação (95,5; 5,5 e 4,5 U/g de sólido fermentado para as enzimas invertase, amilase e celulase, respectivamente), foram superiores. Isto mostra, que a análise conjunta das variáveis com a otimização das mesmas foi um estudo importante para determinar as condições experimentais do processo fermentativo de produção das enzimas.

A Tabela 4.21 apresenta os resultados para quatro dias de fermentação à temperatura ambiente (28 ± 2ºC), obtidos nas cinéticas (100,2; 11,10; 5,10; 5,90 e 5.107,00 U/g de sólido para as atividades da invertase, amilase, celulase, pectinase e protease, respectivamente) e os determinados experimentalmente no ponto de otimização do DCC (Tabela 4.14), para todas as enzimas estudadas. Comparando os resultados da Tabela 4.21 verifica-se que não houve alteração significativa dos mesmos. Este fato era esperado já que as condições experimentais foram as mesmas, por outro lado isto mostra a reprodutibilidade dos experimentos. Adicionalmente, com exceção das enzimas celulase e pectinase pode-se produzir as demais enzimas avaliadas a temperatura ambiente, para o caso do Brasil (temperatura próxima de 30ºC), o que representa uma boa economia de energia no processo. Notou-se também, que exceto para a celulase e pectinase tempos de fermentação superiores a quatro dias provavelmente não seria economicamente viável para produção das enzimas invertase, amilase, celulase e protease.

Tabela 4.21 - Resultados para quatro dias de fermentação à temperatura ambiente (28 ± 2ºC) e no ponto de otimização experimental do DCC.

| | **Invertase (U/g)** | **Amilase (U/g)** | **Celulase (U/g)** | **Pectinase (U/g)** | **Protease (U/g)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Cinética 28 ± 2ºC** | 100,20 | 11,10 | 5,10 | 4,90 | 5.107,00 |
| **Ponto de otimização experimental do DCC** | 109,27 | 10,67 | 5,83 | 5,02 | 5.051,20 |

O *Aspergillus niger* em presença dos substratos resíduos do processamento de arroz e casca de maracujá mostrou-se como potencial produtor das enzimas invertase, amilase, pectinase, celulase

e protease, com destaque para esta última que apresentou uma produção superior aos resultados encontrados na literatura.

A Tabela 4.22 representa os parâmetros do modelo que descreve a geração de enzima como função do crescimento celular, massa celular e degradação enzimática ajustado pela Equação (4.11).

$$\frac{dP}{dt} = Z_1 . \frac{dX}{dt} + Z_2 . X - K_u . A^n \tag{4.11}$$

Sendo $Z_1$*(dX/dt) a síntese enzimática associada ao crescimento celular, $Z_2$*X a síntese enzimática não associada ao crescimento celular e $K_u$*$A^n$ a velocidade de decomposição da enzima. A comparação entre as energias de ativação para degradação das enzimas e as energia de ativação associada à degradação do componente F ($E_d$=12,78 kJ/mol) mostra que a temperatura tem um efeito mais intenso nas células que na degradação enzimática. Este comportamento é condizente com a constatação nos experimentos iniciais que indicavam que a produtividade diminui com o tempo de fermentação, pois a atividade total enzimática reduz pela morte celular. Os valores de energia de ativação também mostram que as enzimas pectinase e celulase são mais estáveis que as enzimas invertase, amilase e protease. A Tabela 4.23 mostra a comparação entre os valores encontrados neste trabalho e valores da literatura. A comparação entre os valores encontrados mostra que a previsão da estabilidade comparativa entre as diferentes enzimas prevista pelo modelo, descrita anteriormente, é satisfatória e que, também, os valores encontrados para as energias de ativação são compatíveis com os valores registrados na literatura para diferentes enzimas.

Tabela 4.22 – Modelo descrito da produção enzimática

| Enzima | Parâmetro | Valor | Unidade | Qualidade do ajuste |
|---|---|---|---|---|
| Invertase | $Z_1$ | 16,7208 | U | $R^2$=0,609 |
| | $Z_2$ | 7,8423e-09 | $U.dia^{-1}$ | R=0,78 |
| | $A_u$ | 3,1930e+08 | $dia^{-1}$ | |
| | Eu | 91,4652 | kJ/mol | |
| | n | 0,3828 | | |
| Amilase | $Z_1$ | 1,6783 | U | $R^2$=0,732 |
| | $Z_2$ | 0,001040 | $U.dia^{-1}$ | R=0,855 |
| | $A_u$ | 1,15728e+15 | $dia^{-1}$ | |
| | $E_u$ | 188,08 | kJ/mol | |
| | n | 1,66508 | | |
| Celulase | $Z_1$ | 1,1849 | U | $R^2$=0,585 |
| | $Z_2$ | 0,0001579 | $U.dia^{-1}$ | R= 0,765 |
| | $A_u$ | 3,4211e+14 | $dia^{-1}$ | |
| | $E_u$ | 206,41 | kJ/mol | |
| | n | 0,1864 | | |
| Pectinase | $Z_1$ | 0,9110 | U | $R^2$=0,79 |
| | $Z_2$ | $4,1x10^{-4}$ | $U.dia^{-1}$ | R= 0,891 |
| | $A_u$ | $8,24x10^{14}$ | $dia^{-1}$ | |
| | $E_u$ | 215,20 | kJ/mol | |
| | n | 0,1327 | | |
| Protease | $Z_1$ | 87,8967 | U | $R^2$= 0,716 |
| | $Z_2$ | 0,2213 | $U.dia^{-1}$ | R= 0,846 |
| | $A_u$ | 2,3064e+14 | $dia^{-1}$ | |
| | $E_u$ | 144,49 | kJ/mol | |
| | n | 0,1911 | | |

Tabela 4.23 – Comparação de Energia de ativação (Ea) de trabalhos encontrados na literatura com o presente trabalho

| **Enzima** | **Eu do presente trabalho** | **Eu e micro-organismo de trabalho da literatura** | **Referência** |
|---|---|---|---|
| Invertase | 91,47 kJ/mol | 4,056 kJ/mol *Fusarium solani* | Bhatti et al., 2006 |
| | | 188,34 KJ/mol, *Oryza sativa* | Isla et al., 1995 |
| Amilase | 188,08 kJ/mol | 171,98 kJ/mol, *Arracacia xanthorriza* | Pires et al., 2002 |
| | | 23,29 kJ/mol, *Perna viridis* | Sabapathy et al., 1992 |
| Celulase | 206,41 kJ/mol | 32,83 kJ/mol, *Alternaria alternata* | Paraskevi e Greece, 1984 |
| | | 33 kJ/mol, *Tricoderma reesei* | Ng e Zeikus, 1981 |
| Pectinase | 215,20 kJ/mol | 215,22 kJ/mol, *Aspergillus aculeatus* | Sarioglu et al., 2001 |
| | | 212,54 kJ/mol, *Aspergillus niger* | Mutlu et al., 1999 |
| Protease | 144,49 kJ/mol | 0,32 kJ/mol, *Bacillus stearothermophilus* | Chopra e Mathur, 1985 |
| | | 267 kJ/mol, *Actinidia chinensis* | Katsaros et al., 2009 |

# Capítulo 5

# Conclusões e Sugestões

# 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

## 5.1 – Conclusões

Os resultados indicaram a potencialidade do emprego dos resíduos das indústrias de processamento do arroz e do maracujá, como substratos, abundante e de baixo custo, na síntese das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease por fermentação em estado sólido, utilizando a linhagem *A. niger* ATCC 16404. Dentro dos limites das variáveis estudadas, pôde-se concluir que:

- O meio de cultura contendo resíduo de arroz e casca de maracujá é satisfatório para o crescimento de *Aspergillus niger* na produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease, sendo entre as cepas ATCC 16404, 1057 e 9029 a cepa ATCC 16404 a mais adequada;
- Neste meio o crescimento do fungo pode ser quantificado de forma satisfatória pelo modelo logístico sendo que a produção de enzimas é mais favorável para tempos de fermentação inferiores a quatro dias;
- Os resultados mostraram que ocorreu maior produção de invertase e amilase para maiores concentrações de resíduo de arroz e de celulase, pectinase e protease para maiores concentrações de casca de maracujá;
- Dentro da faixa estudada para as variáveis: A/T, umidade e concentração de inóculo, foi possível obter regiões de otimização para a atividade das enzimas estudadas;
- Os testes de reprodutibilidade mostram que os experimentos realizados dentro da região de otimização apresentaram valores próximos**;**
- É possível produzir e analisar separadamente cada enzima, atendendo a diversos interesses.

Portanto, dentre as condições experimentais empregadas e análise obtida pelo delineamento composto central, para a síntese das enzimas estudadas pelo *Aspergillus niger*, por fermentação em estado sólido, empregando resíduos das indústrias de processamento de arroz e de maracujá, foram: A/T de 0,5, umidade de 30 mL/30g de substrato e concentração de inóculo de 0,25 g/100g de substrato. Nessas condições verificou-se que:

- Obteve-se maior crescimento da biomassa e maior número de esporos para as temperaturas de 35ºC e 40ºC, assim a temperatura ótima para o crescimento celular está entre 35°C e 40ºC. Também é possível observar que a temperatura de crescimento ótimo esteja no intervalo citado, embora o *Aspergillus niger* cresça de forma satisfatória em todo intervalo de temperatura estudado.
- Maior atividade invertásica foi obtida em fermentações feitas na temperatura de 35ºC. Nas temperaturas 28ºC, 40ºC e 45ºC houve aumento menor mas crescente nas atividades até o 12º dia. Embora o aumento da atividade tenha sido observado ao longo de todo tempo de fermentação tem-se que até o quarto dia o crescimento da atividade enzimática foi exponencial e que após o sexto dia de fermentação aumento ocorreu de forma menos expressiva.
- Na produção da enzima amilase, exceto para 45$^{o}$C a produção enzimática aumenta ao longo de todo intervalo de tempo estudado. Para 45$^{o}$C houve um decréscimo da atividade após sete dias de fermentação. Assim ocorre a produção de amilase de forma satisfatória para temperaturas inferiores a 45$^{o}$C sendo que a temperatura ótima para produção desta enzima é inferior a 35$^{o}$C. Nota-se também que para todas as temperaturas estudas após o quarto dia de fermentação o ritmo de crescimento da atividade diminui, sendo que para algumas temperaturas ele estabiliza e até ocorre uma redução da mesma.
- Os resultados para as atividades da pectinase e da celulase, mostram que para todo intervalo de temperatura estudado a produção das enzimas é satisfatória, sendo que as maiores temperaturas favorecem uma maior produção enzimática. Para a pectinase, após o oitavo dia os aumentos nas atividades para as temperaturas de 28ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC foram relativamente altos e após este tempo a mesma reduz consideravelmente para as temperaturas de 28ºC, 40ºC e 45ºC e provavelmente um maior tempo de fermentação não seria economicamente viável. Para a temperatura de 35ºC, deve-se avaliar o tempo de fermentação até o nono dia, pois após esse tempo, o aumento na atividade reduz. Para a celulase observa-se que entre o quarto e o sexto dia a taxa de crescimento da atividade ainda é satisfatória.
- Para a enzima protease, obteve-se significativa perda de atividade enzimática para temperaturas superiores a 40$^{o}$C em tempos de fermentação superiores a quatro dias. Também foi constatado que as atividades a 28°C e 35$^{o}$C foram muito próximos uma da outra para todos os tempos de fermentação estudados. Os resultados mostram também que

para todas as temperaturas entre quatro e seis dias de fermentação a atividade foi praticamente constante. Observa-se também que a alta atividade proteásica obtida deve ser devido à alta concentração de proteína na mistura de resíduos utilizados como substrato (8,58%).

## 5.2 – Sugestões

- Avaliar o desempenho de diferentes tipos de reatores no aproveitamento de resíduos agro-industriais para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus níger* ou outra espécie de *Aspergillus.*
- Avaliar processos de separação para as enzimas produzidas;
- Testar formas de aplicação das enzimas produzidas de maneira conjunta sem a necessidade de utilização de processos de separação, tal como na hidrólise de resíduos para produção de etanol.
- Estudar formas de estabilizar o preparado enzimático final.

# Capítulo 6

# Referências Bibliográficas

# 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. **Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando a produção de pectinases por fermentação semisólida**. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. Anais... Curitiba: ___, 2007. CD.

ADRIANO, W.S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana.** Tese do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2008.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. e VARMA, A. J. **Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production**. Carbohydr. Polymer., 57, 67-72, 2004.

AGUIAR, C., MARGONAR, M.H., LUCENA, S.L. **Produção de celulases por Aspergillus niger e efeito do pH e da temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos**. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul), 2008.

AIDOO, K.E., HENRY, R., WOOD, B.J.B.. **Solid state fermentations.** Advances in Applied Microbiology, v.28, p.201-237, 1982.

ALBERTO, F.; BIGNOM, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B. e MIRJAM, C.Z.J.Z. **The Three-dimensional Structure of Invertase (β-Fructosidase) from *Thermotoga maritime* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases**. J. Biol. Chem. 279 (18): 18903-18910, 2004.

ALBUQUERQUE, L.P., SCARIOT, F.O., ABREU-LIMA, T.L., CARREIRO, S.C. **Produção De Pectinase por uma Linhagem de Levedura Isolada de Polpa de Maracujá.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

ALEGRE, A.C.P., POLIZELI, M.L.T.M., TERENZI, H.F., JORGE, J.A., GUIMARÃES, L.H.S. **Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerge or solid state fermentation using agro-industrial residue as carbon source**. Braz. J. Microbiol, v. 40, nº 3, 2009.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. **Industrial applications of pectic enzymes – a review**. Process Biochemistry, v.33, n.1, p.21-28, 1998.

ANDRADE, V. S.; SARUBBO,L. A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, A, NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Production of extracelular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 106-110, Apr./June 2002.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official methods of Analysis**. 16th. Ed. Arlington, Virgínia, v.2, p.783, 1990.

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

ARISTIDOU, A. e PENTILLÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization**. Curr. Opin. Biotechnol., 11, 187-198, 2000.

AZEREDO, L. A. I.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; BENCHETRIT, L. C.; COELHO, R. R. R. **Proteases from actinomycetos interfere in solid media plate assays of hialuronidase activity**. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 207-212, July 2001.

BARATA, R. A.; ANDRADE, M. H. G.; RODRIGUES, R. D.; CASTRO, I. M. **Purification and characterization of na extracellular trypsina-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini**. Journal of Bioscience an Bioengineering, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, Oct. 2002.

BARGA, M.C., **Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido**. Dissertação-Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

BARTHIAR, S.; ANDERSSON, A. G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. **Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia sp***. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 5, p. 525-531, Apr. 2002.

BÉGUIN, P. e AUBERT, J. **The biological degradation of cellulose**. FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58, 1994.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, p.992, 1999.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2ª ed., p.255-257, 1988.

BHATTI, H.N., ASGHER, M., ABBAS, A. **Studies on Kinetics and Thermostability of a Novel Acid Invertase from *Furasium solani***. J. Agric. Food Chem., 54(13), p. 4617-4623, 2006.

BHAT, M. K. e BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. Biotechnol. Adv., 15 (3/4), p. 583-620, 1997.

BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnology Advances, v.18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BINA, M. **Dados nutricionais do maracujá**. Disponível em: <www.saudelar.com>. Acesso em 07 jul. 2004.

BON, E. P. S. **Enzimas industriais: política e gestão**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. , 2002, Brasília. Anais. . . Brasília, DF, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. e PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A; Ferrara, M. A. e Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters – an introduction to design, data analysis and model building.** New York: John Wiley e Sons, 1978.

BRAN, B., SOLOMONS, G.L. **Production of the enzyme naringinase by Aspergillus niger. Applied Microbiology**, Nov., Printed in U.S.A., 1965.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. **Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, p.38-44, jul/set, 1999.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. **Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus***. Ciência Agrotecnológica, v.24(edição especial), p.137-152, 2000.

BRUNO, M. E. C. **Utilização de proteases de origem bacteriana e fúngica na produção de biscoitos semidoces duros**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p.143, 1989

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 752, 2000.

CAO, Y. e TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose**. Carbohydr. Res., 337, p.

1291–1296, 2002.

CARDOSO, I.C., PEREIRA, K.C., SILVA, N.K.G., BARBOSA, R.C., CARDOSO, V.L., FILHO, U.C. **Fermentação do soro do leite por *Aspergillus niger* para produção enzimática**. 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

CARVALHO, S.M.S. **Análise das Enzimas Amiolíticas Produzidas por Microrganismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, Dissertação em Ciência de Alimentos. Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1999.

CASTRO (a), R.J.S., FREITAS, A.C., BESERRA, M.A., VIEIRA, J.M.M., PINTO, G.A.S. **Produção de Poligalacturonase por *Aspergillus niger* em Fermentação Semi-Sólida utilizando como substrato Torta de Canola**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

CASTRO (b), R.J.S., PINTO, G.A.S. **Estudo Comparativo da Produção de Proteases por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Tortas de Girassol.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

CASTRO (c), R.J.S., FREITAS, A.C., PINTO, G.A.S. **Efeito da Quantidade Inicial de Água na Síntese de Protease por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

CHAN, H. T. **Passion fruit, papaya and guava juices**. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. (Eds). Fruit juice processing technology. Auburndale (Flórida): Agscience, p. 334-348, 1993.

CHAUDHURI, A.; BHARADWAY, G. e MAHESHWARI, R. **An unusual patter of invertase activity development in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus***. FEMS Microbiol. Lett. 177, p. 39 - 45, 1999.

CHENG, T. C.; DUAN, K. J. e CHYI SHEU, D. **Immobilization of β-fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* on chitosan using tris hydroxymethyl phosphine or glutaral-dehyde as a coupling agent**. Biotechnnol. Lett. 27, p. 335-338, 2005.

CHENYU, D., LIN, S.K.C., KOUTINAS, A., WANG, R., DORADO, P., WEBB, C. A **Wheat biorefining strategy base don solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid**. Bioresour. Technol., doi: 10.1016/j.biortech.2008.03.019, 2008.

CHERRY, H.M., HUSSAIN, T., ANWAR, M.N. (2004) **Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus***. *Pak. J. Biol. Sci*. 7 v. 11, 1988–1992.

CHOPRA, A.K., MATHUR., D.K. **Purification and Characterization of Heat-Stable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67**. Journal of Dairy Science, v.68, nº 12 3202-3211, 1985.

CODNER, R. C. **Pectinolytic and cellulolitic enzymes in the microbial modification of plant tissues**. Journal of Applied Bacteriology, v.84, p.147-160, 2001.

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

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. **Caracteristicas físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa D*egener) obtida por secagem**. Boletim do CEPPA, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

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

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus niger mutante 3T5B8. 198f**. Tese (Doutorado em Ciências). Pósgraduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 1993.

COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, G.A.S., FREITAS, S.P., COSTA, A.C.A. **Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8.** Process Biochemistry, v. 36, p. 255-261, 2000.

CRONLUND, A. D.; WOYCHICK, J. H. **Effect of microbial rennets on eat fractions**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 34, n. 3, p. 502-505, May/June 1986.

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

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

DALSENTER, F.D.H., VICCINI, G., BARGA, M., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N**. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture.** Process Biochemistry. V. 40, p. 801-807, 2005.

DEBING, J., PEIJUN, L., STAGNITTI, F., XIANZHE, X., LI, L. **Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p. 244-250, 2006.

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

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol.2, 2001.

DELLA, V.P., KUHN, I., HOTZA, D. **Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica**. Química Nova, v.24, n.6, p.778-782, 2001.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A. e RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases**. Ind. Crop. Prod., 20, p. 11-21, 2004.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. **Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 13, p. 34-37, 2000.

DJEKRIF-DAKHMOUCHE, S., GHERIBI-AOULMI, Z., MERAIHI, Z., BENNAMOUN, L. **Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α- amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder**. *Journal of Food Engineering*, 73 v. 2, p. 190-197, 2006.

DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E.. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

DSMZ: Centro de Pesquisas de material biológico da alemanha: Disponível na internet http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium129.pdf, acessado em 10 de dezembro de 2009.

DURAND, A .. **Bioreactors desings for solid state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v.13, n.2/3, p.113-125, 2003.

EMBRAPA AGROINDUSTRIAL TROPICAL, 2004. Disponível na internet: www.embrapa.br, acessado em outubro de 2007.

FAGUERIA, N.K., BARBOSA FILHO, M.P. **Recomendações para uso de fertilizantes fosfato para a cultura de arroz cequeiro**. Circular Técnica, nº 03, p.15, EMBRAPA – CNPAF, Goiânia, 1980.

FERNÁNDEZ, R. C.; MARESMA, B. G.; JUÁREZ, A. e MARTÍNEZ J. **Production of fructooligosaccharides by β-fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H**. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79 v. 3, p. 268-272, 2004.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M. **Formation of flavour compounds in cheese**. Advances in Applied Microbiology, New York, v. 45, p. 17-85, 1997.

FRANCO, M.N. **Produção de Celulases por Actinomicetos em Resíduos Agro-Industriais, visando a Obtenção de Bioetanol**. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Rio de Janeiro-RJ, 2009.

FREITAS, A.C., CASTRO, R.J.S., SANTOS, T.M., PINTO, G.A.S. **Caracterização da Torta de Canola durante o Processo Fermentativo para Produção de Proteases.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

FRUTISÉRIES, Distrito Federal, Maracujá. **Frutisséries 2** , Brasília-DF, março/2002.

GANCEDO, J. M. **Carbon catabolite repression in yeast**. Eur. J. Biochem. v. 206, p. 297-313, 1992.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. **Caracterization and stability of proteases from Penicillium sp produced by solid-state fermentation**, Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, Feb. 2003.

GERVAIS, P., MOLIN, P. **The role of water in solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v.13, p.85-101, 2003.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. **Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 5, p. 513-518, Apr. 2003.

GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p.68, 1991.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. e JORGE, J. A. **Production and characterization of a thermostable extracellular β-D fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustial residues as carbon source**. Enzyme Microbiol. Tech. 42 , v. 1, p. 52-57, 2007.

GUPTA, A ., GUPTA, V.K., MODI, V.R., YADAVA, L.P.. **Production and characterization of α-Amilase from *Aspergillus niger*.** Biotechnology 7 v.3, p. 551-556, 2008.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. **Microbial α-amylases: a biotechnological perspective**. *Process Biochemistry*, v. 38, p.1599-1616, 2003.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications**. Applied Microbiology Biotechnology, New York, v. 59, n. 1, p. 15-32, June 2002.

GUTIERREZ-ROJAS, M., FAVELA-TORRES, E., CORDOVA-LOPES, J., GARCIA-RIVERO, M., **Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerg, agar surface and solid state fermentation**. Process Biochemistry, v.33, n.2, p.103-103, 1998.

HAICHAR, F. Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M. F. ; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESDENT, J.; BERGE, O**. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing**. Environ. Microbiol., 9 (3), p. 625–634, 2007.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, P. ;SHOJAOSADATI, S. A.; HOOGSCHAGEN , M. ;VASHEGHANI-FARAHANI, E. ; RINZEMA, A. A **two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation**. Biochemical Engineering Journal, v. 36, p.100–107, 2007.

HAN, Y.W., GALLAGHER, D.J., WILFRED, A. G.. **Phytase production by Aspergillus ficuum on semi solid substrate**. Journal of Industrial Microbiology, v.2, p.195 – 200, 1987.

HAQ, I., ASHRAF, H., QADEER, M.A., IQBAL, J. **Production of alpha-amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium**. *Bioresour. Technol*. v. 87, p. 57– 61, 2003.

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

HERMANN, S.R., HERNANDES, F., RIVALDI, J.D., SILVEIRA, G.G., SILVA, D., SOARES, L.H.B., DEL BIANCHI, V.L., KRIEGER, N., MORAES, R.O., DENTIZEN, A . **Produção de Pectina Liase e Amilase por Fermentação no Estado Sólido à Base de Bagaço de Laranja e Farelo de Arroz**. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis-SC. Anais do Sinaferm 2003, 2003.

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

HOUDERT, D.; MULLER, G. **Solution properties of pectin polysaccharides.** Carbohydrate polymers, v.16, p.409-432, 1991.

HWANG, C.L., CHANDRA, S. **Waste materials used in concrete manufacturing, Chapter 4: The use of rice husk ash in concrete**. William Andrew Publishing/Noyes, 1997.

IBGE (c): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, julho de 2009. Disponível na internet. http://www.ibge.gov.br/, acessado em 25 maio de 2007.

IBGE (d): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, julho de 2009. Disponível na internet. http://www.ibge.gov.br/, acessado em 31 de agosto de 2009

IBGE (b): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002. Disponível na internet. http://www.ibge.gov.br/, acessado em janeiro de 2003.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005. Disponível na internet. http://www.ibge.gov.br/, acessado em março de 2007.

IGARASHI, K.; WADA, M.; e SAMEJIMA, M. **Activation of crystalline cellulose to cellulose IIII results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase**. FEBS J., 274, p. 1785–1792, 2007.

IMANDI, Z S.B., BANDARU V.V.R., SOMALANKA S.R., BANDARU S.R., GARAPATI H.R.. **Apliccation of statistical experimental designs for the optimization of medium constituintes for the production of citric acid from pineapple waste.** Bioresource Technology 99, p. 4445-4450, 2008.

ISLA, M.I., SALERNO, G., PONTIS, H., VATTUONE, M.A., SAMPIETRO, A.R. **Purification and properties of the soluble acid invertase from *Oryza sativa*.** Phythochemistry, vol. 38, p. 321-325, 1995.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização**. São Paulo: Secretaria de Agricultura de São Paulo, p.206, 1980. (Série Frutas Tropicais).

JARVIS, M. C. **Structure and properties of pectin gels in plant cell walls**. Plant Cell and Enviromment, Oxford, n.7, p.153-164, 1984.

JOSHI, C. P. e MANSFIELD, S. D. **The cellulose paradox - simple molecule, complex biosynthesis**. Curr. Opin. Plant Biol., v. 10, p. 220–226, 2007.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. e VIIKARI, L. **Characterization of**

**cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources**. Process Biochem, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KANG, S.W., PARK, Y.S., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. **Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, v.91, p. 153–156, 2004.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. **Applications of pectinases in the commercial sector: a review**. Bioresource Techcology, v.77, n.3, p. 215-227, 2001.

KATSAROS, G.I., KATAPODIS, P., TAOUKIS, P.S. **Modeling the effect of temperature and high hydrostatic pressure on the proteolytic activity of kiwi fruit juice.** Journal of Food Engineering, v. 94, p. 40-45, 2009.

KAWABATA, C.Y. **Aproveitamento de Cinzas da queima de resíduos agroindustriais na produção de compósitos fibrosos e concreto leve para a construção rural**. Tese – Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2008.

KILCAWLEY, K. L.; WILKINSON, M. G.; FOX, P. F. **Determination of key enzyme activies in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 31, n. 3, p. 310-320, Aug. 2002.

KIRSCH, L.S., PINTO, A.C.S., PORTO, T.S., PORTO, A.L.F., TEIXEIRA, M.F.S. **Produção de Proteases de Lentinus citrinus DPUA 1535 Utilizando um Planejamento Fatorial**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do Sinaferm 2009, 2009.

KOELSCH, G.; TANG, J.; LOY, J. A.; MONOD, M.; JACKSON, K.; FOUNDLING, X. L. **Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1480, n. 1/2, p. 117-131, July 2000.

KONSOULA, Z., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. **Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates**. *Bioresource Technology*, v. 98, p.150-157, 2007.

KUNAMNENI, A., PERMAUL, K., SINGH, S. **Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus***. Journal of bioscience and bioengineering, 100 (2), p.168–171, 2005.

LACAZ, C.S.. **Micologia Médica**. 7Ed. São Paulo-SP. Sarvier, p. 557-568, 1992.

LEITÃO, M. C. A.; SILVA, M. L. A.; JANUÁRIO, M. I. N.; AZINHEIRA, H. G. **Galacturonic**

**acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC**. Carbohydrate Polymers, v.26, p.165-169, 1995.

LIN, L.L., CHYAU, C.C., HSU, W.H. **Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23**. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:61–68, 1998.

LONGO, M. A.; NOVELLA, I. S.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. **Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as proteases producer under operating conditions**. Journal of Bioscience and Bioengineering, Oska, v. 88, n. 1, p. 35- 40, July 1999.

LONSANE, B.K., GHIDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V.. **Engineering aspects of solid state fermentation**. Enz. And Microbial Technol., v. 7, p. 258-265, 1985.

LUDWIG, V. S. **A Agroindústria Processadora do Arroz: Um Estudo das Principais Características Organizacionais e Estratégicas das Empresas Líderes Gaúchas.** Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, UFRGS, 2004.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALVES DA SILVA, C. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. **Detecção do potencial biotecnológico em bactérias e leveduras isoladas de sedimentos de mangue**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos, Brasília, DF, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brook**, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.

MARQUES, R.M; TARDELI, A. O.; DIAS, V.S. **Modelo de Spillman-modificado para regressão assintótica**. Revista brasileira de estatística, v, 42, p 3-16, 1981.

MARQUART, M. M.; PAVAN, V.; GERMANI, J. C. **Estudos de obtenção de proteases por *Bacillus cereus* em meio de proteína de soja**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos, Brasília, DF, 2002.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. Dissertação (Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

MATSUURA, F. C. A. U. **Estudo do albedo do maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas,

Campinas, 2005.

MEDINA, J.C. **Alguns aspectos tecnológicos das frutas tropicais e seus produtos**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo, p.295, 1980. (Série Frutas Tropicais).

MENEZES, G.D.G., OLIVEIRA, A.C.P., SARAIVA, S.H., DAMASO, M.C.T., OLIVEIRA, M.A.C.L., COURI, S. **Efeito da concentração das fontes de nitrogênio e de carbono na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* 3TSB8 em fermentação semi-sólida**. In: V Congresso Iberoamericano de Ingenieria de alimentos, n.5, Puerto Vallarta. Anais... Puerto Vallarta, 2005.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** ***Analytical Chemistry***, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL., D.A., DUONG, D.DO, GREENFIELD, PAUL F. **A semimechanistic Mathematical Model for Growth of *Rhizopus oligosporus* in a Model Solid-State Fermentation System**. Biotechnology and Bioengineering, vol. 38, p. 353-362, 1991.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing**. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MITCHELL, D.A ., LONSANE, B.K.. **Definition, characterization and economic evaluation**. In: *Solid Substrate Cultivation,* Elsevier, London, 1992.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

MOLIS, C.; FLOURIE, B.; OUARNE, F.; GAILING, M.F.; LARTIGUE, S.; GUIBERT, A.; BORNET, F. e GALMICHE, J. P. **Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans**. Am.J. Clin. Nutr. Nantes. 64 (3), p. 324-328, 1996.

MONTIEL-GONZALEZ, A. M.; FERNANDEZ, F. J.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. e LOERA, O. **Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination**. Biochem. Biotechnol. v.6, p. 63-70, 2002.

MURTHY, R.M.V.; KARANTH, N.G; RAO, R.K.S. **Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation**. *Advances in Applied Microbiology*. v.38, p.99-149, 1993.

MUTLU, M., SARIOGLU, K., DEMIR, N., ERCAN, M.T., ACAR, J. **The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity.** Journal of Food Engineering, v.41, p. 147-150, 1999.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. **Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva Braz**. J. Food Technol., v. 3, p, 41-51, 2000.

NARAHARA, H., KOYAMA, Y., YOSHIDA, T., PICHANGKURA, S., UEDA, R.; TAGUCHI, H. **Growth and enzyme production in a solid-state culture of Aspergillus oryzae**. Journal Fermentation Technology, v.60, n.4, p.311 – 319, 1982.

NC – IUBMB **Nomenclature Commitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Recommendations of the nomenclature comitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of Enzyme-catalysed reactions**. Disponível em: <http://www. chem. qmw. ac. uk/iumb/enzyme/>. Acesso em: jan. 2005.

NETO, J. A. **Algumas aplicações de enzimas**,.In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). Processos fermentativos e enzimáticos. Sào Paulo: Editora Edigard Blucher, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial), 2001.

NG, T.K., ZEIKUS, J.G. **Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414.** Appl Environ Microbiol, V. 42. P. 231-240, 1981.

NIGAM, P., SINGH, D. **Enzyme and microbial systems involved in starch processing**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p.770-778, 1995.

NIZAMUDDIN, S., SRIDEVI A, NARASIMHA G.. **Production of β-galastosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation**. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (8), p. 1096-1100, 17 April, 2008.

NOSB. **National Organic Standards Board. Enzymes**, Plant and Fungal, 1999. Disponível em: http://www.omri.org/Enzymes_processing.pdf. Acesso em: 05 jun, 2007.

Novozymes (2005). Disponível em: http://www.novozymes.com. Acessado em julho de 2005.

OKI, Y. FERNANDES, G.W. **Fungos: amigos ou inimigos?** Ciência Hoje, v. 42, nº 252, p. 64-66, 2008.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R.

**Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.

OLIVEIRA, M. M. **Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

OKAZAKI, N., SUGAMA, S., TANAKA, T. **Mathematical model of surface culture of koji mold.** Journal of Fermentation Technology, v. 58, p. 471-476, 1980.

OROZCO, A.L., PÉREZ M.I., GUEVARA O, RODRÍGUEZ J., HERNÁNDEZ M., GONZÁLEZ-VILA F.J., POLVILLO O, ARIAS M.E.. **Biotechnological enhancemente of coffe pulp residues by solid-state fermentation wuth streptomyces**. Py-GC/MS analysis. J. Anal. Appl. Pyrolysis 81, p. 247-252, 2008.

OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. **Nutritive values and utility of passion fruit by products**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 6, n. 1, p. 54-57, 1958.

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

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, A.; GALBE, M. ZACCHI, G. **Ethanol roduction from non-starch carbohydrates of wheat bran**. Bioresource Technol., 96, p. 843–850, 2005.

PANAROTTO, C., MALVESSI, E., SILVEIRA, M.M. **Avaliação de Limão Taiti como Fonte de Indutor na Produção de Poligalacturonases por *Aspergillus niger* em Estado Sólido**. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM 2003, n.14, 2003. Florianópolis. Anais... Florianópolis, 2003.

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

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

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRIGUES-LEON, J.A., NIGAM, P.. **Solid state fermentation**

**in biotechnology**. Nova Deli, Asiatech, 221p, 2001.

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

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

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

PARANTHAMAN, R., ALAGUSUNDARAM, K., INDHUMATHI, J. **Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation.** World Journal of Agricultural Sciences, v. 5 (3), p. 308-312, 2009.

PARASKEVI, A., GREECE, A. **Production and Characterization of Cellulase and r-Glucosidase from a Mutant of *Alternaria alternate*.** Applied amd Environmental Microbiology, Mar., p. 560-565, 1984.

PARIZZI, O. J**. Metabolização de açúcares em linhagens *Saccharomyces cereviseae* com ou sem transporte de sacarose e diferentes atividades de invertase**. Dissertação de Mestrado apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicada. 106 p. 2006.

PASTORE, G. M. **Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. , 2002, Brasília. Anais. . . Brasília, DF, 2002.

PATIL, S.R., DAYANAND, A. **Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions**. Bioresource Technology 97 (2006), p. 2340-2344, 2006.

PATRICK, J. W. **Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. Annu**. Ver. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. v. 48, p.191-222, 1997.

PAULA, B.; MORAES, I. V. M; CASTILHO, C. C.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. **Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático**. Boletim CEPPA, v. 22, n.2, p. 311-324, 2004.

PEREIRA, J.A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Tereseina: EMBRAPA Meio-Norte, p.226, 2002.

PERES, L. E. P. **Transporte no floema**. Apostila Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, 2006.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G. e KOLEV, D. N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7**. Biotechnol. Lett., v. 24, p. 2107- 2111, 2002.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. **High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86. 8. 20)**. Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 72-76, 1993.

PINTO, G.A.S., BRITO, E.S., ANDRADE, A.M.R., FRAGA, S.L.P., TEIXEIRA, R.B., **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005

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

PIRES, T.C.R., VEIGA, E.M., FINARDI FILHO, F. **Amylolytic enzymes from peruvian carrot (*Arracaia xanthorrhiza Bancroft*.).** Ciênc. Tecnol. Aliment, v.22, nº 3, 2002.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. **Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica***. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916-921, Nov. 2001.

RAHARDJO, Y.S.P., SAI, S., WEBER, F.J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. **Effect of low oxygen concentrations on growth and a-amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems.** Biomolecular Engineering, v. 21, p. 163-172, 2005.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. **Culture method to study fungal growth in solid fermentation**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. , v. 9, p.199-209, 1980.

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

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. **Enzymes from isolates of Pseudomonas fluorescens involved in food spoilage**. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.

RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAGHAVA RAO, K.S.M.S. **Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation**. Advances in Applied Microbiology, v.38, p.99-

147, 1993.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.

RASHID, M. H. e SIDDIQUI, K. S. **Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β- glucosidases from *Aspergillus niger***. Process. Biochem. 33 (2), p. 109-115, 1998.

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

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. **Pectic enzymes. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.33, p.323-385, 1976.

ROCCO, C.S. **Determinação de fibra alimentar total por método gravimétrico não-enzimático**. Curitiba. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná., 1993.

RODARTE, M.P. **Atividade Proteolítica de Bactérias, Leveduras e Fungos Isolados dos Frutos e Grãos de Café (Coffe arabica L.)**. Dissertação – Universodidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Lavras, 2005.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. H., (Ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, v.5, p.227-282, 1980.

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

ROSENBOHM, C.; LUNDT, I.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; YOUNG, N. W. G. **Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties**. Carbohydrate Research, v.338, p.637-649, 2003.

RUBIO, M. C.; RUNCO R. e NAVARRO A. R. **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis***. Phytochemistry. 61 (6), p. 605-609, 2002.

RUSTIGUEL, B.C. **Produção, Purificação e Caracterização Bioquímica das Invertases do Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis***. Dissertação – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

RUTZ, F., TORERO, A, FILER, K. **Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas**. Revista Aveworld, Edição 29, 2008.

SABAPATHY U., TEO L.H. **A kinetic study of the α-amylase from the digestive gland of *Perna viridis* L**. Comp. Biochem. and Physiol. B, v. 101, p. 73-77, 1992.

SAID, S. **Aplicação de enzimas em medicamentos e análises clínicas**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos... Brasília, DF, 2002.

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.

SANGALETTI, N., CADORIN, T.L., HENDGES, D.H., DARTORA, D.F., ONOFRE, S.B., ALENCAR, S.M. **Produção de Invertase de *Alternaria sp* por Fermentação Semi-Sólida**. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis-SC. Anais do Sinaferm 2003, 2003.

SANT ANNA JR., G. L. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A. , AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edigard Blucher, 2001, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial).

SANTOS, J.G., CRUZ FILHO, R.F., LIMA, L.A., MONTENEGRO, P.C.C., FERNANDES, O.C.C., TEIXEIRA, M.F.S. **Produção de Proteases Alcalinas por Bacillus sp Isolado do Solo Contendo Resíduos Industriais de Couro**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do Sinaferm 2009, 2009.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

SANTOS, S.F.M., MACEDO, G.R.. **Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de poligalacturonase**. Quim. Nova, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

SARIOGLU, K.,DEMIR, N., ACAR, J., MUTLU, M. **The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2:Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial Pectinase.** Journal of Food Engineering, v.47, p. 271-274, 2001.

SATO, K., SUDO, S. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology – Small-scale solid-state fermentations**. 2ª edition, Washington, p.61-79, 1999.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., BACQUET, G., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GOMZÁLEZ, G. **Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation**. Biotechnology and Bioengineering, v. 35, p. 802-808, 1990.

SAXENA, R.K., DUTT, K., AGARWAL, L., NAYYAR, P. **A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp**. PN5. *Bioresource Technology*, 98 (2), p. 260- 265, 2007.

SCARIOT, F.O., ALBUQUERQUE, L.P., ABREU-LIMA, T.L., CARREIRO, S.C. **Influência das Condições de Cultivo na Produção de α-amilase por uma Linhagem de Levedura**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do Sinaferm, 2009.

SCILAB-5.1.0 , Copyright © 1989-2008. INRIA ENPC.

SEGUENKA, B., PRIGOL, E., TIBOLLA, H., COSTA, J.A.V., COLLA, L.M., SARTORI, T., BERTOLIN, T.E. **Produção de Celulase a partir de Fungos Filamentosos Utilizando Serragem de Eucalipto ( *Eucalyptus robusta*) como Fonte de Carbono**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do Sinaferm, 2009.

SEPLAN-RR. Disponível em http://www.rr.gov.br/investidor.php. Acessado em abril de 2006.

SHAFIQ, K.; SIKAND, A. e LKRAM, H. **Effect of Different mineral nutrients on invertase production by *Sacharomyces ceresiae* GCB-K5**. Biotechnol. 1 (1), p. 40-44, 2002.

SILVA, S.R.; MERCADANTE, A.Z. **Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa) in natura***. Ciência e Tecnologia de Alimentos**,** v. 22, n.3, 254-258, 2002.

SIMIONESCU, C.; POPA, M. e DUMITRIU, S. **Immobilization of invertase on the Diazonium Salt of 4-Amino Benzoylcellulose. Biotechnol. Bioeng**. 29, p. 361-365, 1987.

SINGH D, NAIK SR, NAIK S. **Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death**. *Parasitol 129*: 1-9, 2004.

SOCCOL, C.R., Rojan, P.J., Patel, A.K., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P.S., Pandey, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc. p. 221-230, 2005.

SOUZA, J. **Estudo da durabilidade de argamassas utilizando cinzas e casca de arroz**. 2008. Tese – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-PB, 2008.

SOUZA, R.L.A., SILVA, F.L.H., OLIVEIRA, L.S.C. **Estudo da Produção de Pectinases por**

**Fermentação Semi-Sólida pela Metodologia de Superfície de Resposta**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do Sinaferm, 2009.

STURM, A. e TANG, G-Q. **The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning**. Trends Plant Sci. 4, p. 401-407, 1999.

SUKUMARAM., R.K., SINGHANJA, R.R., MATHEW, G.M., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. Renewable Energy, v. 34, p. 421-424, 2009.

TAHA, H. A. Pesquisa operacional, Pearson Brasil ,8a ed., p.384, 2009.

TEERI, T. T. **Crystalline cellulose degradation: new insigth into the function of cellobiohydrolases**. Tibtech May. , v. 15, p.160 – 167, 1997.

TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L.; DURAN, N. **Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586**. Brazilian Journal of Microbiology, v.31, p.286-290, 2000.

TEIXEIRA, M.F.S., MATSUURA, A.B.J., SOARES, C.S.S.S.. **Micologia Médica: Manual de Laboratório**. Manaus: UFAM, 111p., 1999.

TONG-JIANG, X., T., YEN-PENG. **Fungal bioleaching of incineration fly ash: Metal extraction and modeling growth kinetics**. Enzyme and Microbial Technology, v. 44, p. 323–328, 2009.

TRUSWELL, A. S. **Food fibre and blood lipids**. Nutrition Reviews, Washington, v.35, n.3, p.51-54, 1997.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. **Pectinases: Aplicações Industriais e perspectivas**. Química Nova, v. 30, n. 2, p.388-394, 2007.

VALADARES FILHO, S.C., MAGALHÃES, K.A., ROCHA JUNIOR, V.R., CAPELLE, E.R. **Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos**. Viçosa: UFV, p.288, 2006.

VAN DER MAAREL, M.J., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. **Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family**. *J. Biotechnol.* 94, p.137-155, 2002.

VASSILEV, N., VASSILEVA M., BRAVO V., FERNÁNDEZ-SERRANO M., NIKOLAEVA I. **Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes**. Industrial Crops and Products 26, p. 332-336, 2007.

VERMELHO, A. B. , MELO, A. C. N.; SALVADOR, V. R. O.; SIMONE, G.; BRANQUINHA, M. H. **Purificação de uma metaloproteinase extracelular de *Crithidia guilhermei***. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos... Brasília, DF, 2002.

VERMELHO, A. B.; MEIRELLES, M. N. L.; LOPES, A.; PETINATE, S. D. G.; CHAIA, A. A.; BRANQUINHA, M. H. **Detection of extracellular proteases from microorganisms on Agar plates**. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, Nov./Dec. 1996.

VITOLO, M. **Tópicos de Enzimologia Industrial**. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Said, S e Pietro, R. C. L. R. Eds, Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto, 2004.

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

WHITAKER, J. R. **Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices**. Enzymes and Microbial Technology, v.6, n.8, p.342-349, 1984.

WISEMAN, A. e WOODWARD, J. **Industrial Yeast Invertase Stabilization**. Process Biochem. 10: 24-30, 1975.

ZUÑIGA, U.F.R., FARINAS, C.S., GONÇALVES, F.M.N., NETO, V.B., COURI, S., CRESTANA, S. **Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulases em Fermentação Semi-Sólida do Bagaçu de Cana-de-açúcar por Aspergillus niger**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.

# Anexo 1

**Certificado de Análise**
**SENAI- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial**
CETAL/FAM - Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentinl nº 245 , Bairro : Roosevelt - CEP: 38401-062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208 - E-mail : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21 - I.E: Isento
Uberlândia - MG

SENAI FIEMG

| LABORATÓRIO | |
|---|---|
| x | FÍSICO-QUÍMICA |
| | MICROBIOLOGIA |
| | MEIO AMBIENTE |

| | |
|---|---|
| EMISSÃO Nº: | 001 |
| DATA : | 30.09.2009 |

| Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA |
|---|
| x |

| Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO |
|---|
| 0676FQ/09 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **CLIENTE:** | Christiane Pereira Rocha | | |
| **ENDEREÇO:** | Rua Francisco Antônio Fernades, 30 | | |
| **CIDADE** | Uberlândia | **ESTADO :** | MG |
| **CNPJ:** | 045.984.346-00 | **CEP** | 38408-010 |
| **I.E.** | - | **Nº REG. ESTAB. IMA:** | x |
| **CONTATO :** | Christiane | | |
| **TELEFONE :** | 3229 0407 | | |
| **EMAIL :** | rochachristiane@uol.com.br | **DELEGACIA:** | x |

| | |
|---|---|
| **PRODUTO/AMOSTRA :** | Amostra de metade de casca e farelo de arroz e metade casca de maracujá |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **DATA FABRICAÇÃO :** | x | **TEMPERATURA COLETA (º C) :** | x |
| **DENOMINAÇÃO DE VENDA :** | x | **RESPONSÁVEL COLETA:** | Christiane |
| **MARCA :** | x | **Nº LACRE AMOSTRA DE PROVA :** | x |
| **RÓTULO IMA Nº :** | x | **Nº LACRE AMOSTRA CONTRA PROVA :** | x |
| **Nº DE UNIDADES COLETADAS** | 100 g | | |
| **DATA DA COLETA :** | x | **Nº LACRE AMOSTRA TESTEMUNHA:** | x |
| **HORA COLETA ( h) :** | x | **TEMPERATURA DE RECEBIMENTO AMOSTRA (°C)** | x |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **AMOSTRA ACEITA** | | | x | **SIM** | | **NÃO** |
| **EMBALAGEM** | x | **PRÓPRIA/ÍNTEGRA** | | **ESTERIL** | | |
| | | **PRÓPRIA/ALTERADA** | | **NÃO ESTERIL** | | |

C:Cetal/17025/Formulários/[Form059] Revisão 09 1/3

**Certificado de Análise**
**SENAI- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial**
CETAL/FAM - Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentinl nº 245 , Bairro : Roosevelt - CEP: 38401-062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208 - E-mail : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21 - I.E: Isento
Uberlândia - MG

SENAI FIEMG

**LABORATÓRIO**

| | |
|---|---|
| x | FÍSICO-QUÍMICA |
| | MICROBIOLOGIA |
| | MEIO AMBIENTE |

| | |
|---|---|
| EMISSÃO Nº: | 001 |
| DATA : | 30.09.2009 |

| Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA | Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO |
|---|---|
| x | 0676FQ/09 |

| **ANÁLISES SOLICITADAS :** | | **METODOLOGIA :** |
|---|---|---|
| 44 | Proteínas (%) | LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal - Método Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, 1981. Método de Kjeldahl. |
| 18 | Cinzas ( % ) | □ LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal - Método Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, 1981. Método Gerber |
| 37 | Gorduras Totais (%) | Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3 ed. 1985. 533 p. Método por extração de Soxlet. |
| 119 | Carboidratos (%) | Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3 ed. 1985. 533 p. |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx |

C:Cetal/17025/Formulários/[Form059] Revisão 09 2/3

**Certificado de Análise**
**SENAI- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial**
CETAL/FAM - Centro Tecnológico de Alimentos- Fábio de Araújo Motta
LAMAM- Laboratório de Ensaios em Alimentos e Meio Ambiente
Rua Ernesto Vicentini nº 245 , Bairro : Roosevelt - CEP: 38401-062
FONE : (34) 3228-5228/ 3228-5208 - E-mail : cetal-lab@fiemg.com.br
C.N.P.J : 03.773.700.0014-21 - I.E: Isento
Uberlândia - MG

SENAI FIEMG

**LABORATÓRIO**

| | |
|---|---|
| x | FÍSICO-QUÍMICA |
| | MICROBIOLOGIA |
| | MEIO AMBIENTE |

EMISSÃO Nº: 001
DATA : 30.09.2009

| Nº DO TERMO DE COLETA DE AMOSTRA | Nº DO PROTOCOLO NO LABORATÓRIO |
|---|---|
| x | 0676FQ/09 |

DATA INÍCIO DA ANÁLISE : 24.09.2009 — DATA TÉRMINO ANÁLISE : 28.09.2009

| ANÁLISES | | PADRÃO Mínimo | PADRÃO Máximo | Resultado | Incerteza de Medição |
|---|---|---|---|---|---|
| 44 | Proteínas (%) | x | x | 8,58 | x |
| 18 | Cinzas ( % ) | x | x | 8,94 | x |
| 37 | Gorduras Totais (%) | x | x | 8,03 | x |
| 119 | Carboidratos (%) | x | x | 64,78 | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |
| x | xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx | x | x | x | x |

A incerteza expandida (U) relatada, é baseada em uma incerteza padronizada combinada multiplicada por um fator de abrangência, fornecendo um nível de confiança de aproximadamente 95%.

**CONCLUSÃO :** xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

**BASE INTERPRETATIVA**
RESOLUÇÃO : xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
COPAM: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
PORTARIA : xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

**NOTA: OS RESULTADOS DESTA ANALISE TEM SIGNIFICADO RESTRITO E REFEREM-SE SOMENTE A AMOSTRA ANALISADA, NAO PEDENDO SER UTILIZADOS EM QUALQUER TIPO DE PROPAGANDA OU REPRODUZIDO PARCIALMENTE.**

OBSERVAÇÕES xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Fabricio Silverio Flausino
Responsável Técnico
CRQ-MG 02.407.169 - 2ª Região

GILBERTO P. BARBOSA
Técnico de Laboratório

UBERLÂNDIA, 30 de setembro de 2009

C:Cetal/17025/Formulários/[Form059] Revisão 09 3/3