

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

FABIANE FERNANDA DE BARROS CORREA

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO UTILIZANDO-SE  
RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Rhizopus oligosporus* E  
ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro - SP  
2015

**FABIANE FERNANDA DE BARROS CORREA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO UTILIZANDO-SE  
RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Rhizopus oligosporus* E  
ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Rio Claro  
Março/2015

**FABIANE FERNANDA DE BARROS CORREA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO UTILIZANDO-SE  
RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Rhizopus oligosporus* E  
ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Prof. Dr. Eutímio Gustavo Fernández Núñez

Rio Claro, 25 de março de 2015.

## AGRADECIMENTOS

“Eu tenho pensado nas pessoas que me somam. Naquelas que perdem seu tempo e energia comigo, insistindo de várias formas, para que o meu riso seja constante e as preocupações pequenas. Naquelas pessoas que me pegam pela mão e me ajudam a atravessar abismos. Eu tenho pensado nas pessoas que fazem abrigo no coração, pra eu morar. Naquelas que tecem milhares de sorrisos no meu rosto. Naquelas que constroem inúmeras certezas em cima do meu medo. Naquelas que falam bonito, depois de uma tempestade emocional desabar sobre o meu quintal. Naquelas que plantam pés de esperança, no vaso de entrada, pra encantar meu olhar. Por aquelas pessoas que não desistem de mim, eu agradeço!”

Inteiramente a Deus por nunca soltar minhas mãos, por ser absolutamente tudo nos momentos de tristeza e solidão.

À melhor família que poderia ter, sem tirar nem por. Tudo que sou vem do alicerce amoroso que são vocês. Especialmente a minha mãe Solange, exemplo de amor infindável. Por ter valentia na vida e por sempre confiar em mim e me incentivar nos meus sonhos. Tenho certeza que nos momentos em que eu não consegui, você acreditou por mim. Amo você infinitamente.

Aos meus avós preferidos Agenor e Evanilda, presentes em tudo e sempre. Por todos os almoços deliciosos que eu tive quentinhos sobre a mesa em meio a tanta correria, por todos os gestos de carinho e por todo o incentivo, por todos os conselhos e por tanto amor.

A Eleusa melhor madrinha, por se orgulhar tanto de mim e por ser o maior exemplo de força e fé na vida que alguém poderia ter.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa.

Ao Instituto de Biociências Campus de Rio Claro – Universidade Estadual de São Paulo – (IB-UNESP/Rio Claro), Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela oportunidade da realização deste mestrado, e a todos os docentes e profissionais envolvidos no programa.

A Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP por disponibilizar as instalações e recursos para realização dos experimentos e da parte prática deste estudo.

Ao prof. Dr. Pedro de Oliva Neto por confiar no meu trabalho, pela paciência, orientação e atenção.

A Dra. Ana Flávia Azevedo Carvalho pelo acompanhamento durante o meu estágio no laboratório e na realização das últimas análises deste projeto, agradeço imensamente.

Aos colegas de Rio Claro: Rafael, Gustavo, Ana, Bárbara, Tássio, Jaqueline, Danilo, Bruna, Renata (Tops), Vanessa, Carol e Marina. Em particular a Jaque, Rafa, Gu, Marina e Carol por me

receberem em suas repúblicas e tornarem possível à realização das disciplinas. De forma especial, agradeço ao Rafa, que desde o início acreditou que eu conseguiria e me apoiou de todas as formas possíveis desde a realização das provas para ingresso no programa de pós-graduação, sua amizade é um presente desde a graduação, meu querido.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) por meio do professor Prof. Dr. Hamilton Cabral, que abriu gentilmente a oportunidade para realização de parte deste trabalho e colaborou muito, bem como aos colegas Nathália, Ronivaldo, Juliana, Tatiane, Gabriel, Luciana, Youssef e Ana Cláudia do Laboratório de Tecnologia Industrial (LTE), que nunca mediram esforços para colaborar com a realização desta etapa.

De forma especial gostaria de agradecer a Luciana, que me recebeu em sua casa de braços abertos por todo o tempo que precisei sem hesitar e a Ana Cláudia, por seu companheirismo diário e por me permitir estar sempre na presença de Deus. Levarei vocês duas sempre em meu coração.

A amiga Jéssica e seu marido por me receberem afetivamente em Ribeirão Preto e fazer com que me sentisse em casa.

Agradeço aos amigos que Ribeirão Preto me trouxe: Ana Beatriz por ceder sua casa nos primeiros meses, muito obrigada pela confiança. Ao Heitor pela parceria e por sempre me fazer rir. E especialmente ao Vinicius por estar sempre ao meu lado com sua amizade e principalmente por tornar essa jornada mais leve e feliz.

Aos meus amigos tão queridos do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LABI), do qual eu orgulhosamente faço parte. Agradeço a companhia diária Thaís (Caçula), Douglas, Louise, Bruna, Érika, Lud, David, Fran, Tania, Víctor, Éric, Fábio, Dani e a todos que passaram por lá nessa fase.

Especialmente ao amigo Douglas que me ajudou sempre, principalmente nos estudos iniciais, com paciência e incentivo.

Agradeço de todo coração e carinhosamente a Caçula, que é a amiga-irmã que a pós-graduação me trouxe, nada que eu disser será suficiente para explicar o quanto você foi ímpar para que eu chegasse até aqui e o quão importante é para mim.

As minhas amigas de vida Naty, Amanda, Larissa e Camila por todo suporte emocional e por toda a amizade, independente da distância física ou dos anos. Sabem o quanto são essenciais para mim, sempre.

*"Não vês que somos viajantes?  
E tu me perguntas: Que é viajar?  
Eu respondo com uma palavra: é avançar!  
Experimentais isto em ti  
Que nunca te satisfaças com aquilo que és  
Para que sejas um dia aquilo que ainda não és.  
Avança sempre! Não fiques parado no caminho."*

*Santo Agostinho*

## RESUMO

As amilases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, atuando na estrutura do amido com a hidrólise das ligações glicosídicas dos tipos  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, do interior das cadeias de amilose e amilopectina, respectivamente. Atualmente são responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de enzimas e apresentam uma vasta gama de aplicações industriais. Os fungos capazes de produzir enzimas amilolíticas podem ser cultivados mediante insumos de baixo custo empregados na fermentação em estado sólido (FES), o que possibilita a valorização dos subprodutos da agroindústria, bem como fornece suporte semelhante ao encontrado pelo micro-organismo no ambiente natural. O presente estudo visa produzir amilases por *Rhizopus oligosporus* var. *oligosporus* em FES utilizando o farelo de trigo como substrato, purificar parcialmente o extrato bruto enzimático obtido, caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático parcialmente purificado e posteriormente realizar a sacarificação pela hidrólise do amido presente na quirera de arroz e fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol. A atividade enzimática do extrato bruto foi 39,8 U/mL o que equivale a 358 U/g de substrato. O índice de purificação, após as etapas de cromatografia foi parcial, mas suficiente para que a caracterização bioquímica do extrato produzido fosse realizada. Estes testes demonstraram faixa ótima no pH 4,0 e pH 5,5, indicando as condições ácidas como as melhores para este estudo. A estabilidade do pH foi ampla variando do pH 3,5 ao pH 8,5 com cerca de 40 a 60% de atividade relativa. A temperatura ótima de atividade enzimática determinada como ideal foi de 60 a 65 °C, porém a enzima mostrou-se termooestável até 60 °C. Os testes do efeito de íons na reação enzimática amilolítica demonstraram que os íons  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+2}$  e  $\text{Na}^{+2}$  comportaram-se como inibidores da atividade. O íon  $\text{Mn}^{+2}$  destacou-se por potencializar em cerca de 60% a atividade enzimática relativa à hidrólise sem a adição de íons. A hidrólise enzimática utilizando quirera de arroz como substrato possibilitou a conversão do amido em açúcar redutor a partir de 6 h de reação, entretanto o melhor tempo foi o de 10 h de reação que apresentou 54,9% de rendimento em massa de glicose, o que equivale a 594 kg de glicose por tonelada de substrato. O xarope de glicose obtido foi então empregado na fermentação alcoólica por duas linhagens *S. cerevisiae*, M-26 e Fleishmann, e ambas produziram cerca de 44 g/L de etanol, com rendimento de 90,7 e 95,8% em 24 horas, respectivamente.

**Palavras-chave:** Amilase; Fermentação em estado sólido; *Rhizopus oligosporus*; Quirera de arroz; Farelo de trigo, Xarope de glicose.

## ABSTRACT

Amylases are enzymes belonging to the class of hydrolases acting on starch structure with the hydrolysis of glycosidic bonds of  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 types, in the interior of the chains of amylose and amylopectin, respectively. Currently they are responsible for about 30% of the world market enzymes and show a wide range of industrial applications. Fungi capable of producing amylases can grow by low cost inputs in solid-state fermentation (SSF), which enables the recovery of the agricultural industry by-products and provides support similar to that found by the microorganism in the natural environment. This study aims to produce amylase by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* in solid-state fermentation using wheat bran as substrate partially to purify the crude enzyme extract obtained biochemically characterize the partially purified enzyme extract and subsequently to carry out the hydrolysis saccharification of starch present in broken rice and fermentation of it by *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Enzymatic activity of the raw extract was 39.8 U/mL equivalent to 358 U/g substrate. The purification ratio after the chromatography step was partial, but sufficient for the biochemical characterization of the produced extract was taken. These tests showed optimal range of pH 4.0 to pH 5.5 indicating the acidic condition as the best for this study. The pH stability was wide range of pH 3.5 to pH 8.5 with 40 to 60% relative activity. The optimum temperature for enzyme activity determined as optimum was 60 to 65 °C, but the enzyme was thermostable up to 60 °C. Ion effect of the amylolytic enzyme tests showed that the reaction  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+2}$  and  $\text{Na}^{+2}$  ions behaved like activity inhibitors. The  $\text{Mn}^{+2}$  ions distinguished for enhancing at about 60% relative enzymatic activity to hydrolysis without addition of ions. The enzymatic hydrolysis of broken rice using as substrate allowed the complete conversion of starch to reducing sugars after 6 hours of reaction, although the best time of reaction was 10 hours that showed 54.9% yield by weight of glucose, which is similar to 594 kg of glucose per ton of substrate. The glucose syrup obtained was used in fermentation for both strains of *S. cerevisiae*, M-26 and Fleishmann, and both produced about 44 g/L of ethanol, a yield of 90.7 and 95.8% at 24 hours, respectively.

**Keywords:** Amylase; Solid state fermentation; *Rhizopus oligosporus*; Wheat bran; Broken rice; Wheat bran; Glucose syrup.



## SUMÁRIO

### Página

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                              | 11 |
| 2. ESTADO DA ARTE.....                                                           | 14 |
| 2.1 Amido.....                                                                   | 14 |
| 2.1.1 Gelatinização e Sacarificação do Amido.....                                | 16 |
| 2.2 Resíduos amiláceos .....                                                     | 17 |
| 2.2.1 Farelo de Trigo .....                                                      | 18 |
| 2.2.2 Subprodutos do beneficiamento do arroz - Quirera de arroz .....            | 18 |
| 2.3 Fermentação em estado sólido .....                                           | 20 |
| 2.4 Amilases .....                                                               | 22 |
| 2.4.1 Micro-organismos produtores de amilases .....                              | 22 |
| 2.4.2 Tipos e mecanismos de ação das amilases .....                              | 23 |
| 2.4.3 Aplicações das amilases .....                                              | 27 |
| 2.5 Purificação de enzimas .....                                                 | 28 |
| 2.6 Hidrólise do amido e Mecanismo de ação química e enzimática.....             | 29 |
| 2.7 Condições de crescimento dos micro-organismos e produção de enzimas.....     | 29 |
| 2.8 Fatores que interferem na atividade enzimática .....                         | 30 |
| 2.9 Produção de etanol .....                                                     | 31 |
| 2.9.1 Fermentação alcoólica.....                                                 | 31 |
| 2.9.2 Processos de batelada alimentada e contínuo.....                           | 32 |
| 2.9.3 Micro-organismo e Condições operacionais .....                             | 33 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                               | 35 |
| 3.1 Geral.....                                                                   | 35 |
| 3.2 Específico .....                                                             | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                      | 36 |
| 4.1 Produção de amilases de <i>Rhizopus oligosporus</i> .....                    | 36 |
| 4.1.1 Micro-organismo e manutenção das cepas.....                                | 36 |
| 4.1.2 Produção da enzima em Fermentação em Estado Sólido (FES) .....             | 37 |
| 4.2 Purificação parcial do extrato enzimático bruto.....                         | 37 |
| 4.2.1 Pré purificação do extrato enzimático .....                                | 37 |
| 4.2.2 Cromatografias de troca iônica.....                                        | 37 |
| 4.2.3 Cromatografias de interação hidrofóbica .....                              | 38 |
| 4.2.4 Concentração da amostra .....                                              | 38 |
| 4.2.5 Cromatografias de exclusão molecular (gel filtração) .....                 | 38 |
| 4.2.6 Eletroforese .....                                                         | 39 |
| 4.3 Caracterização Bioquímica do extrato enzimático parcialmente purificado..... | 39 |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1 Efeito do pH na reação enzimática e estabilidade .....                                  | 39 |
| 4.3.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica.....               | 39 |
| 4.3.3 Estabilidade de íons na atividade enzimática .....                                      | 40 |
| 4.3.4 Efeito do manganês em diferentes concentrações na atividade enzimática .....            | 40 |
| 4.4 Produção do xarope de glicose .....                                                       | 40 |
| 4.5 Produção de etanol .....                                                                  | 41 |
| 4.5.1 Produção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                                       | 41 |
| 4.5.2 Meios de cultivo .....                                                                  | 41 |
| 4.5.2.1 Meio para a propagação das leveduras e Produção do inóculo .....                      | 41 |
| 4.5.2.2 Meio para a Fermentação Alcoólica.....                                                | 41 |
| 4.5.3 Multiplicação dos micro-organismos e Produção do inóculo .....                          | 41 |
| 4.5.4 Ensaios de fermentação alcoólica.....                                                   | 42 |
| 4.6 Procedimentos analíticos .....                                                            | 42 |
| 4.6.1 Determinação de açúcares redutores e atividade enzimática .....                         | 42 |
| 4.6.2 Determinação de proteínas .....                                                         | 43 |
| 4.6.3 Crescimento e viabilidade das leveduras .....                                           | 43 |
| 4.6.4 Determinação da concentração de etanol e açúcares por CLAE.....                         | 43 |
| 4.6.5 Refratometria na escala Brix .....                                                      | 44 |
| 4.6.6 Eficiência de hidrólise.....                                                            | 44 |
| 4.6.7 Cálculos da eficiência e a produtividade etanólica .....                                | 44 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                               | 46 |
| 5.1 Produção de amilases por <i>Rhizopus oligosporus</i> em fermentação em estado sólido..... | 46 |
| 5.2 Etapas de purificação parcial do extrato enzimático bruto.....                            | 46 |
| 5.3 Caracterização bioquímica do extrato enzimático parcialmente purificado .....             | 49 |
| 5.4 Sacarificação de substratos amiláceos para produção de xarope de glicose .....            | 53 |
| 5.5 Fermentação alcoólica e produção de etanol.....                                           | 55 |
| 5.5.1 Crescimento e viabilidade celular .....                                                 | 55 |
| 5.5.2 Análises do consumo de açúcares redutores e produção de etanol .....                    | 56 |
| 5.5.3 Eficiência e produtividade etanólica .....                                              | 57 |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                                            | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                            | 61 |

## 1. INTRODUÇÃO

O aprimoramento e o detalhamento de tecnologias que se utilizam de catalisadores biológicos e resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis como o etanol, vem recebendo cada vez mais destaque no meio científico e industrial. Esse biocombustível, obtido por meio da fermentação de açúcares, tem se mostrado uma fonte de energia alternativa viável e pouco agressiva ao meio ambiente, e conseqüentemente, estes processos de produção são cada vez mais pesquisados (SAITO e CABELLO, 2006).

Atualmente através da biotecnologia busca-se aprimorar e desenvolver cada vez mais alternativas para a redução da utilização de combustíveis fósseis e substituição por processos tecnológicos que utilizem resíduos agroindustriais que resultem não só em benefícios econômicos como também para o ambiente. A alta demanda em produzir produtos de interesse com baixo custo, como o etanol, salienta a importância dos processos de biocatálise, uma vez que dependem da produção e consumo de enzimas, para a quebra dos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis pelo agente catalizador do processo de produção de etanol.

As matérias-primas lignocelulósicas que contém também fontes amiláceas representam uma fonte alternativa para a produção de etanol (CAMACHO, 2009). A maioria das agroindústrias gera uma grande quantidade de subprodutos que podem ser reaproveitados, dentre eles se destacam farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de mandioca, casca de café, sementes de milho, resíduos de batata doce, polpa de beterraba, entre outros (FREITAS, 2012; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2014).

O mercado mundial de enzimas industriais é estimado em US\$ 2,3 bilhões por ano e tem três principais segmentos: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para a ração animal. As principais enzimas utilizadas na indústria são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases, dentre outras, e as maiores empresas produtoras são europeias: Gist-Brocades (Holanda), Genencor International (Finlândia), Novozymes, líder na produção mundial de enzimas para biocombustíveis (Dinamarca) e Novo Nordisk (Dinamarca). Esta última sozinha detém cerca de metade do mercado mundial de enzimas industriais (MUSSATTO et al., 2007).

As enzimas produzidas por processos biotecnológicos são utilizadas em diversas aplicações na indústria e na ciência. As amilases são um grupo de enzimas de destaque nas indústrias de detergentes, alimentícia, têxtil e química, na panificação, indústria farmacêutica, de análises clínicas, na hidrólise do amido e produção de etanol (NIELSEN et al., 2000; SUMERLY, 2003; GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005; PANDEY et al., 2005; SOCCOL, 2005). Estas fazem parte da classe das hidrolases atuando na estrutura do amido com a hidrólise das

ligações glicosídicas que estão presentes no interior das cadeias de amilose e amilopectina. Dentre as glicoamilases estão as que liberam unidades de glicose,  $\alpha$ -amilases que originam dextrinas e  $\beta$ -amilases que produzem maltose (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; GUANDALINI, 2007; SANTANA, 2007).

Nos vegetais, plantas, animais e micro-organismos podem ser encontrados enzimas amilolíticas, mas o setor industrial tem maior interesse nas enzimas microbianas (GUPTA et al., 2003).

Várias bactérias e fungos foram identificados como ótimos produtores de amilases (BABU E SATYANARAYANA, 1995; MURADO et al., 1997; SIDHU et al., 1997; CORONADO et al., 2000; YUGUO et al., 2000; JIN et al., 2001; STAMFORD et al., 2001). O gênero *Bacillus* é um dos grupos de bactérias mais conhecidos como produtor de amilases. Entretanto, os fungos filamentosos se destacam como fonte biológica de enzimas, perfazendo 60%, em contraste com as bactérias, 26%; animais 6%; plantas, 4%; leveduras 4% (PANDEY et al., 2000).

A fermentação em estado sólido (FES) vem se destacando e sendo valorizada como importante processo alternativo à fermentação submersa (FSm), uma vez que seu valor econômico é mais atrativo. A FES faz uso de resíduos agrícolas e industriais que são substratos de baixo custo, contribui para economia de água, visto que a quantidade utilizada é minimizada e produz uma quantidade de biomassa significativamente importante (RAIMBAULT, 1998; SINGHANIA et al., 2009, THOMAS et al., 2013).

A produção de amilases de *Rhizopus oryzae* foi feita comparando-se o cultivo em estado sólido e o cultivo submerso, sendo que a maior produção enzimática foi verificada no primeiro tipo de cultivo (NOROUZIAN et al., 2006; OLIVA-NETO et al., 2013).

O fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, é usado na culinária asiática para produção de alimentos fermentados como o Tempeh, e possui atividade amilolítica e segurança alimentar reconhecidas. Quando utilizado no processo de FES com farelo de trigo como substrato, é possível obter enzimas de interesse industrial além de agregar valor a esse resíduo (RANDHIR et al., 2004; FREITAS, 2012).

A equipe do Laboratório de Biotecnologia Industrial – LABI (UNESP-Assis) obteve, recentemente, uma patente para produção de amilases via fermentação em estado sólido que utiliza um meio de cultura à base de farelo de trigo complementado com sais de baixo custo e o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (CCT 3762) e, através do extrato amilolítico produzido, obtém-se a hidrólise total do amido puro ou na forma de resíduo em etapa única, ou seja, a liquefação e a sacarificação para a hidrólise total e obtenção de xarope de glicose. Este último, com alto potencial para posterior aplicação para produção de etanol (ESCARAMBONI e OLIVA-NETO, 2014).

Pelos processos de purificação, é possível definir as características das amilases e dessa forma aperfeiçoar os processos fermentativos e de produção, para que sejam cada vez mais específicos, obtendo resultados mais avançados e biosustentáveis.

A produção de etanol a partir de resíduos amiláceos pode ser empregada independentemente ou anexa às indústrias que geram estes resíduos, o que resulta em aumento da produção deste biocombustível. Este último modelo é adotado no Brasil para a produção de etanol carburante em destilarias anexas às usinas de açúcar onde o melaço é o principal resíduo utilizado para a produção deste biocombustível.

O estudo da utilização de resíduos agroindustriais para produção de biocombustíveis é estratégico, pois com isto pode-se diminuir a necessidade do cultivo em novas áreas agrícolas, destinando-as para a produção de alimentos. A segurança alimentar é uma das políticas importantes em nível mundial e cada vez mais é fonte de preocupação em todo o mundo, tendo em vista a limitação de novas fronteiras agrícolas e a provável escassez dos combustíveis fósseis aumentando a pressão pelo uso daqueles obtidos de fontes renováveis (BOCCHINI et al., 2005; OLIVA-NETO et al., 2012).

O presente trabalho visou produzir, purificar parcialmente e caracterizar as amilases obtidas a partir do fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* cultivado em FES tendo como substrato o farelo de trigo. Após estas etapas, foram realizadas a sacarificação do amido da quirera de arroz e sua concentração para produção de xarope de glicose. Este último foi também avaliado quanto a sua fermentabilidade para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. ESTADO DA ARTE

O estudo de novas tecnologias para o tratamento de subprodutos tem se mostrado promissor em termos econômicos ao considerar a utilização destes como substratos em processos de produção de etanol (KRISHNA et al., 2000; RÉCZEY et al., 2004). Além disso, os resíduos agroindustriais estão sendo uma alternativa em bioprocessos tanto para uso como substratos, quanto para solucionar problemas de poluição ambiental (PRIMO-YÚFERA et al., 1995; PANDEY et al., 2000).

De acordo com Sun et al. (2002) a diminuição dos custos do processo industrial mediante a utilização de resíduos agroindustriais como matérias-primas, tem se mostrado favorável para o substrato fermentativo, dentre eles pode-se citar os farelo de trigo e de mandioca, bem como a quirera de arroz. Os resíduos têm sido estudados como alternativas mais rentáveis do ponto de vista econômico-ambiental, e dentre os aproveitamentos está a possibilidade da produção de xarope de glicose e etanol, além de produtos fibrosos para a alimentação humana (RAUPP et al., 2002).

### 2.1 Amido

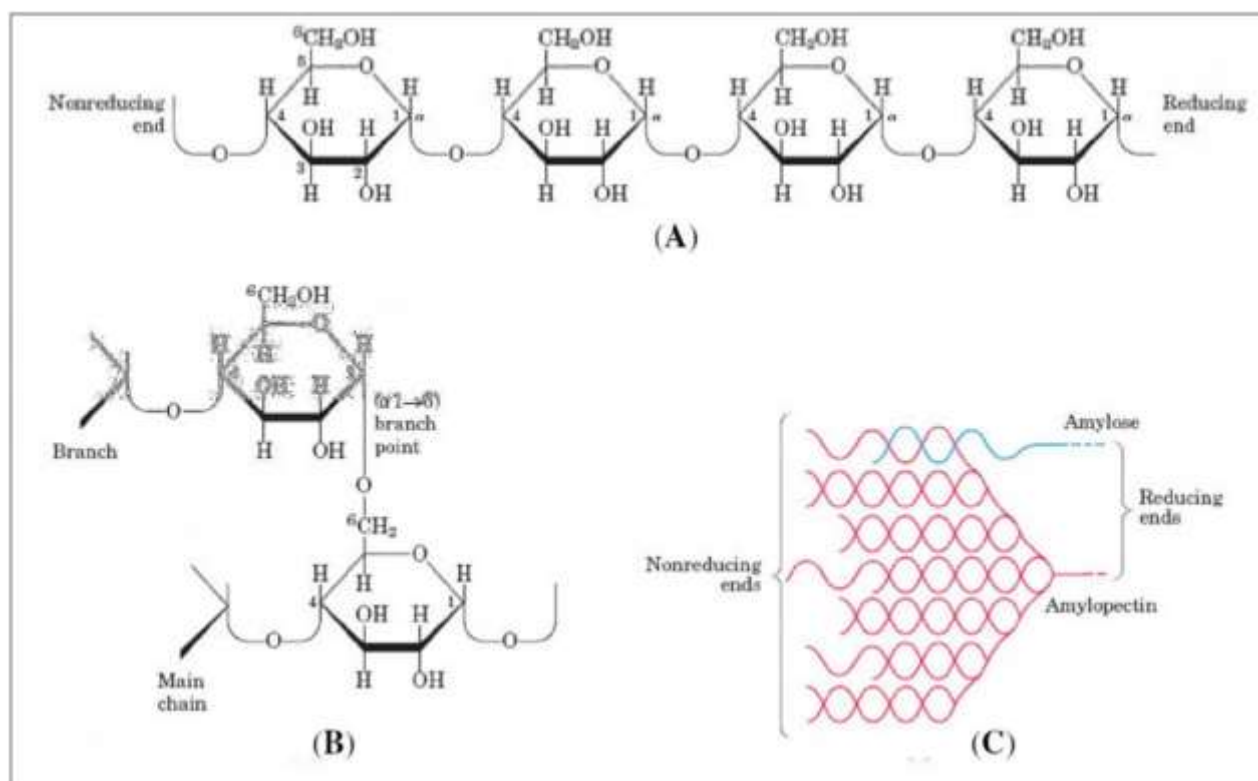
O amido ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> é o principal polissacarídeo de armazenamento nas células de vegetais superiores, responsáveis por fornecer de 70 a 80% das calorias adquiridas pelo homem através da alimentação (FREITAS, 2012). É armazenado nas raízes, tubérculos e no endosperma de grãos, sendo utilizado como reserva alimentar e principal fonte de energia para os organismos fotossintetizantes (VACLAVIK e CHRISTIAN, 2008). Em sua forma pura o amido é um pó branco sem sabor e inodoro, seu grânulo é inerte, estruturalmente estável, densamente condensado e insolúvel em água e álcool, podendo ser rompido na presença de enzimas (PINTO, 2009).

Trata-se de uma matéria-prima renovável, biodegradável e atóxica, com tamanho e formato dos grânulos específicos em cada espécie de planta (MYERS et al., 2000; LEONEL, 2001; PINTO, 2009; SCIPIONI, 2011). As fontes de amido mais comumente utilizadas são o trigo, a mandioca, a batata, o milho e o arroz (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2014).

O amido é amplamente utilizado em vários setores industriais devido ao seu custo relativamente baixo. Tem um amplo espectro de propriedades funcionais e pode ser usado em forma natural ou modificado. Várias transformações físicas, químicas e enzimáticas melhoram suas propriedades funcionais e permitem uma extensiva aplicação. A maior quantidade de informações a respeito das enzimas tem melhorado o processamento de amido, tanto em aspectos econômicos quanto técnicos (MOORE et al., 2005).

Quimicamente o amido é um homopolímero constituído de moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, estas com estabilidade em pH alcalino, mas hidrolisadas enzimaticamente por fungos como *Rhizopus oligosporus* em pH ácido em torno de 5,5 em uma faixa de tempo que pode variar de 2 à 24h dependendo das condições do processo. Estruturalmente possui um grupo aldeído no final da cadeia polimérica, conhecido como redutor. A amilose e a amilopectina, dois tipos de polímeros de glicose, estão presentes no amido e unidos por ligações de hidrogênio. (VAN DER MAAREL et al., 2002; NELSON e COX, 2006; CASTRO et al., 2010).

A amilose é um polímero linear de cadeias longas, não ramificadas, composto de até 6000 unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4. A amilopectina é muito ramificada, sendo constituída por uma cadeia linear curta de 10-60 unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e cadeias laterais com 15-45 unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 (Figura 1) (NELSON e COX, 2006; SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Todos os amidos são constituídos de uma ou de ambas destas moléculas, mas o percentual de uma para outra varia de acordo com a fonte de amido (REGULY, 1996; AEHLE, 2007).



**Figura 1.** Polímeros do amido. (A) Segmento linear curto da amilose com ligações  $\alpha$ -1,4. (B) Ponto de ramificação ( $\alpha$ -1,6) da amilopectina. (C) Disposição da amilose e amilopectina no grão de amido. As fibras de amilopectina (vermelho) formam estrutura dupla-hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose (azul). Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006).

### **2.1.1 Gelatinização e Sacarificação do Amido**

As condições de processamento e armazenamento do amido influenciam profundamente as suas propriedades funcionais e fisiológicas, pois podem ocorrer mudanças em sua estrutura. A quantidade de água, o tempo e a temperatura de armazenamento são fatores de influência direta (COLONNA et al., 1992; ESCARPA et al., 1996; LOBO e SILVA, 2003).

Uma alta viscosidade é desejável para o uso industrial sendo o amido uma substância com poder espessante. A gelatinização ocorre inicialmente na região amorfa do grânulo (no hilo) e segue rapidamente para a periferia (SINGH et al., 2003). É um processo que forma uma pasta visco-elástica turbida ou em concentrações suficientemente altas de um gel elástico opaco. O processo se dá pelo aquecimento do amido em meio aquoso dentro de uma dada faixa de temperatura que varia de 50 a 70 °C, dependendo da origem e variedade do amido (LOBO e SILVA, 2003). Singh et al. (2003) citam valores na faixa de 61 a 72 °C para a batata, 68 a 74 °C para o milho, 56 a 62 °C para o trigo e de 65 a 79 °C para o arroz. Os amidos de farinha de mandioca e de batata apresentam valores de 70,4 e 74,2 °C, respectivamente (SHARIFFA et al., 2009).

As diferentes temperaturas podem ser atribuídas a diferenças no grau de cristalinidade, quanto mais elevada, maior a estabilidade estrutural dos grânulos e sua resistência a gelatinização (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003). Dessa forma as ligações de hidrogênio, que são interações estabilizadoras da estrutura cristalina interna do grânulo entre as cadeias de amilose e amilopectina são rompidas, permitindo a destruição da ordem molecular e mudanças irreversíveis nas suas propriedades tais como: intumescimento (inchamento) dos grânulos de amido, derretimento (fusão) dos cristais iniciais, desenvolvimento de viscosidade, perda de birrefringência e solubilização e lixiviação do amido (SILVA et al., 2001; MATSUI, 2002; CEREDA, 2003; HUBBER et al., 2005; LIU et al., 2009).

O processamento incluindo a moagem e gelatinização do amido, que deve ocorrer antes da hidrólise enzimática, garante o melhor acesso das enzimas digestivas ao substrato (OWSLEY et al., 1981; FADEL et al., 1988; LOBO e SILVA, 2003; NIBA, 2005).

O processo de transformação do amido ou fécula infermentescível em açúcares fermentescíveis, como a glicose, é um processo de hidrólise denominado como sacarificação (LIMA, 2001). Os agentes de fermentação não possuem enzimas amilolíticas, daí a necessidade de sacarificar os amiláceos.

O xarope de glicose é “uma solução aquosa concentrada e purificada de sacarídeos nutritivos, obtida a partir de amido, com um teor de dextrose equivalente não menor que 20% m/m (expressa como D-glicose em base seca)” (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). A indústria de



xaropes recebeu grande impulso quando as enzimas glicoamilase e glicoseisomerase, a primeira responsável pela hidrólise final dos oligossacarídeos oriundos da hidrólise do amido e a segunda enzima catalisadora da isomerização da glicose em frutose, passaram a ser usadas nos anos 60 e 70, respectivamente (VITOLLO, 1988).

Espécies como *Aspergillus* e *Rhizopus* recebem destaque por serem empregadas pelas indústrias de processamento de amido, para sacarificação, com maiores teores enzimáticos obtidos a partir da FES (NOROUZIAN et al., 2006).

A sacarificação realiza-se por via química ou biológica. A primeira apresenta algumas desvantagens tais como: elevado consumo de energia, baixo rendimento e seletividade e pouca flexibilidade operacional. Em função disso, os processos enzimáticos assumiram maior importância, pois conseguiram eliminar quase que totalmente essas desvantagens (OLIVEIRA et al., 2008). A sacarificação biológica se faz por ação enzimática do malte ou pela ação de certos fungos (SURMELY et al., 2003). Além de o processo biológico ter rendimento semelhante ou maior do que o químico, não há formação de compostos indesejados, bem como se utilizam de enzimas naturais e atóxicas (SILVA, 2009).

## **2.2 Resíduos amiláceos**

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido ao alto custo dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo (CARVALHO et al., 2008). Portanto, sua otimização é de grande importância para a diminuição dos custos de produção (JOO; CHANG, 2005).

Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas (BOCCHINI et al., 2005), devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas em larga escala.

De modo geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando a cada ano (BAJPAI et al., 1989; ROMERO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2004; USTÁRIZ et al., 2004; WU et al., 2006; SOUTO, 2010).

As produções mais importantes nacionalmente são o trigo, arroz, milho, mandioca e a batata e portanto as que mais geram subprodutos (REGULY, 1996; NAGEL et al., 2002; DALSENTER et al., 2005; FREITAS, 2012; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2014).

Amido e amiláceos foram descritos como os substratos mais adequados para a produtividade de amilases com alto grau de eficácia (ALI e HOSSAIN, 1991; GOSH et al.,

1991; KILIKIAN, 1996; SCIPIONI, 2011), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para este fim (KONSULA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2004; HAQ et al., 2005; DJEKRIFF-DAKHMOUCHE et al., 2006; HASHEM et al., 2010). O ideal é explorar fontes de fácil aquisição e baixo custo com aplicabilidade industrial.

### **2.2.1 Farelo de Trigo**

O farelo de trigo é o principal subproduto das indústrias de moagem de trigo, onde cerca de 150 milhões de toneladas são produzidas anualmente. Este material de baixo valor agregado, cada vez mais tem sido alvo de interesse para o desenvolvimento de novas estratégias tecnológicas (PRÜCKLER et al., 2014).

O farelo de trigo é uma importante fonte de fibra dietética, vitaminas e minerais. Possui em sua composição aproximadamente 12% de água, 13-18% de proteína, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos (PRÜCKLER et al., 2014). De acordo com Freitas et al. (2014) o teor de nitrogênio de 13 à 18% na forma de proteína no farelo de trigo é bem superior ao farelo de mandioca que oferece apenas 2,6% de proteína.

Os tratamentos para isolar produtos de valor dependem em grande parte do tecido alvo, pois o farelo de trigo é química e histologicamente heterogêneo (APPRICH et al., 2014). Diversas formas podem ser empregadas para aumentar a aplicabilidade do farelo de trigo, como moagem, aquecimento, extrusão e fermentação. Como a obtenção de enzimas purificadas pode ser de alto custo, a produção microbiana de enzimas amilolíticas tendo este substrato como aporte, é uma via econômica de produção alternativa (PRÜCKLER et al., 2014).

Resíduos agroindustriais de baixo custo, como o farelo de trigo, foram utilizados por diversos pesquisadores em sistemas de fermentação em estado sólido (FES). Nestas foi demonstrado que este é um substrato indutor para secreção de amilases, principalmente fúngicas, e obtenção de altos níveis de produção enzimática (ELLAIAH et al., 2002; ANTO et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; HASHEMI et al., 2010; DELABONA et al., 2013).

### **2.2.2 Subprodutos do beneficiamento do arroz - Quirera de arroz**

O arroz é um alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, de acordo com estimativas, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população até o final de 2015 (EMBRAPA, 2005). O Brasil colheu 11,26 milhões de toneladas na safra 2009/2010 e ocupa o nono lugar como maior produtor mundial (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

O beneficiamento do arroz compreende etapas tais como descascamento (20% da casca e 80% de arroz integral), a brunição e o polimento, onde são retirados parcial ou totalmente, o embrião e a maior parte da película que recobre o arroz integral. Como resultado destas etapas, resulta o farelo, que possui aproximadamente 8% do volume deste produto na forma de casca. Posteriormente, ocorre a separação das frações de grãos quebrados (aproximadamente 14%) e inteiros (cerca de 58%), bem como a classificação dos grãos quebrados em grandes, médios e quirera (NITZKE & BIEDRZYCKI, 2007).

O brunimento do arroz é uma das etapas mais importantes, pois define um dos mais importantes critérios para sua comercialização. Este processo é realizado por abrasão, onde os grãos ficam em contato com uma superfície áspera em movimento (SPADARO, et al., 1980). De acordo com a quantidade de farelo removida do grão é possível medir o grau de brunimento, que em geral, é considerado como: bem brunido, razoavelmente bem brunido, levemente brunido e não-brunido, entretanto não há precisão para utilização destes termos. Dessa forma, estes graus são definidos visualmente ou mediante o uso de aparelhos óticos para determinação do perfil branquimétrico da amostra. Quanto maior a brancura, maior a aprovação dos consumidores que preferem o grau do arroz bem brunido. Para tanto, o rendimento no engenho diminui e há menor lucratividade (HOUSTON, 1972).

No país subprodutos provenientes do beneficiamento do arroz são pouco aproveitados. Ainda hoje a casca e o farelo podem ser considerados resíduos poluentes (BASSINELLO, 2004; CARVALHO, 2006). O arroz comercializado tem os grãos quebrados (quirera de arroz) separados, devido a sua aparência e características menos atraentes ao consumidor, o que reduz seu valor comercial (NICOLETTI, 2007; LIMBERGER et al., 2009, CARVALHO et al., 2011). Este fato é um problema econômico tanto para os engenhos de beneficiamento como para a indústria arroseira, visto que o valor da quirera representa apenas a quinta parte daquele obtido na comercialização do grão inteiro (SILVA & ASCHERI, 2009).

O arroz é constituído por carboidratos em quase sua totalidade, além do amido, que corresponde a 90% da matéria seca do arroz polido. Além destes constituintes estão presentes açúcares livres e fibras (WALTER et. al., 2008).

Os dados sobre a composição centesimal da quirera de arroz são mostrados, a seguir, na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição centesimal da quirera de arroz

|                        | Walter et al.<br>(2008) | Limberger<br>(2006) | Ferreira et<br>al. (2013) | Silva et al.<br>(2007) |
|------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| Amido total            | 87,58%                  | 76,35%              | ---                       | ---                    |
| Proteína bruta         | 8,94%                   | 8,13%               | 8,3%                      | 7,32%                  |
| Lipídios               | 0,36%                   | ---                 | 1,10%                     | 0,69%                  |
| Cinzas                 | 0,30%                   | 0,45%               | 0,38%                     | 0,47%                  |
| Fibra total            | 2,87%                   | 2,13%               | ---                       | 1,57%                  |
| Celulose               | ---                     | ---                 | ---                       | ---                    |
| Lignina                | ---                     | ---                 | ---                       | ---                    |
| Hemicelulose           | ---                     | ---                 | ---                       | ---                    |
| Carboidratos<br>totais | ---                     | ---                 | 90,19%                    | 79,08%                 |
| Açúcares<br>redutores  | ---                     | ---                 | 0,56%                     | ---                    |

Sabe-se que a quirera de arroz é composta de amido (87%), proteína bruta (8%), lipídios (0,36%), cinzas (0,3%), fibras (2%) e carboidratos (90%), aproximadamente.

### **2.3 Fermentação em estado sólido**

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma tecnologia amplamente estudada para a produção de enzimas de interesse industrial, e dentre as diversas possibilidades de utilização dos resíduos citados, é uma das formas mais eficientes. O potencial de FES reside no fato do micro-organismo ser cultivado nas proximidades do substrato e atingir maior concentração para a fermentação. Esse tipo de cultivo é apto para o metabolismo dos fungos, a FES lembra o habitat natural dos micro-organismos, o que frequentemente se torna a escolha preferida destes para crescer, produzir alimentos e insumos o que pode levar ao aumento do valor agregado destes resíduos (SINGHANIA et al., 2009).

A FES possui algumas vantagens em relação à fermentação submersa a qual ocorre em um ambiente com umidade igual ou superior a 70%, pois enzimas e metabólitos secundários podem ser obtidos a partir dos micro-organismos, valendo-se dos substratos sólidos com teor de umidade ideal para o seu desenvolvimento, conseqüentemente, o cultivo em suspensões aquosas pode diminuir sua eficiência metabólica (BARRIOS-GONZÁLES, 2012).

A Fermentação Submersa (FSm) possui limitantes em sua utilização como alto consumo energético e poluição. Por outro lado o controle de pH e temperatura do meio é

facilitado. Entretanto a FES assegura aspectos vantajosos como baixo custo, economia de água e energia, oferta suficiente de oxigênio, menos efluentes orgânicos e maior rendimento do produto final. Este bioprocessos pode ser realizado na ausência ou em taxas mínimas de água, contanto que o substrato possua umidade suficiente para manter o crescimento e as atividades metabólicas do micro-organismo. A matriz sólida pode ser fonte de nutrientes como o carbono, ou inerte com soluções de sais impregnadas, para dar o aporte necessário ao crescimento microbiano (THOMAS et al., 2013).

As vantagens e desvantagens dos processos de FES e FSm são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Aspectos da Fermentação em estado sólido e da Fermentação submersa.

| <b>Fermentação em Estado Sólido</b> | <b>Fermentação Submersa</b>                                             |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Aproveitamento de resíduos          | Facilidade de escalonamento                                             |
| Maior produtividade                 | Controle do pH e temperatura                                            |
| Técnica mais simples                | Aeração eficiente                                                       |
| Baixo investimento                  | Transferência de oxigênio                                               |
| Economia de água e energia          | Umidade elevada                                                         |
| Melhor recuperação do produto       | Baixa economia                                                          |
| Sem produção de espuma              | Produção de espuma                                                      |
| Requer mais etapas de purificação   | Purificação facilitada pela baixa quantidade de partículas no substrato |

A fermentação fúngica permite gerar melhor qualidade nutricional, além de possibilitar a manipulação genética das linhagens de fungos, o que amplia os horizontes para a FES em comparação com o cultivo submerso (RAIMBAULT, 1998; SINGHANIA et al., 2009, THOMAS et al., 2013). O controle da esterilidade também é um fator limitante na FSm, visto que muitos contaminantes podem competir com o organismo em meios com alta disponibilidade de água. Desta forma, adicionando o inóculo a um substrato estéril (cozido), o organismo é capaz de competir com os contaminantes, não exigindo um ambiente rigorosamente asséptico neste processo, proporcionando menos requisitos e maior economia na FES (PANDEY et al., 2000).

Tradicionalmente a FSm era utilizada para produção de enzimas industriais, cenário que vem sendo substituído gradativamente pela FES (HASHEMI et al., 2010). O emprego de fungos filamentosos nestes processos com baixa umidade vem apresentando resultados positivos,

uma vez que estes organismos possuem a capacidade de produzir diversas enzimas extracelulares que degradam substâncias celulósicas e a lignina (BÖHMER et al., 2011).

De acordo com Soccol et al. (1994) *Rhizopus ssp.* é usado em fermentações em estado sólido há vários séculos, especialmente na Ásia para preparação de alimentos fermentados como o Tempeh (RANDHIR et al., 2004). A FES é utilizada na produção de alimentos como vinagre, molho de soja, aromas e fragrâncias; proteína unicelular e fungos comestíveis; enzimas microbianas e outros metabólitos como nucleotídeos, lipídios, vitaminas e aminoácidos (CHEN, 2013).

## 2.4 Amilases

### 2.4.1 Micro-organismos produtores de amilases

Para produção de enzimas microbianas são empregados substratos apropriados em cultivo dirigido, o que possibilita uma produção ilimitada dependendo da economia do processo, valendo-se do agente microbiano e método mais eficaz para conduzir o estudo (KIELING, 2002).

Enzimas industriais são produzidas por fermentação utilizando micro-organismos tais como bactérias e fungos, em condições cuidadosamente controladas (SARROUH, 2012). Os fungos representam os micro-organismos mais promissores, pois desempenham importante papel no processo de bioconservação, visto que podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição e formar produtos de interesse às indústrias (CRUZ et al., 2011; GONZÁLEZ, 2012). Outras vantagens da utilização de fungos para a obtenção de amilases é o potencial de produtividade em larga escala e facilidade de manipulação. A importância tecnológica de enzimas amilolíticas tem recebido destaque pela produção comercial de glicose e por seus benefícios econômicos (GUPTA et al., 2003; SALEEM e EBRAHIM, 2013).

As espécies dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Bacillus* e *Penicillium* têm sido amplamente utilizadas em processos industriais como produtoras de amilases (PANDEY et al., 2000; BURHAN et al., 2003; SIVARAMAKRISHNAM et al., 2006; ALVA et al., 2007; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; FREITAS, 2012), dentre muitos outros micro-organismos. O gênero *Rhizopus* recebe a denominação GRAS (Generally Regarded as Safe) pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), classificação obtida por micro-organismos de reconhecida segurança para uso alimentar (BAKIR et al., 2001; GUPTA et al., 2003; MISZKIEWICZ et al., 2004; RANDHIR et al., 2004; VATTEM et al., 2004).

Pertencente a divisão *Zygomycota* o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* é filamentoso, de crescimento rápido e caracterizado por hifas não septadas (cenocíticas). As

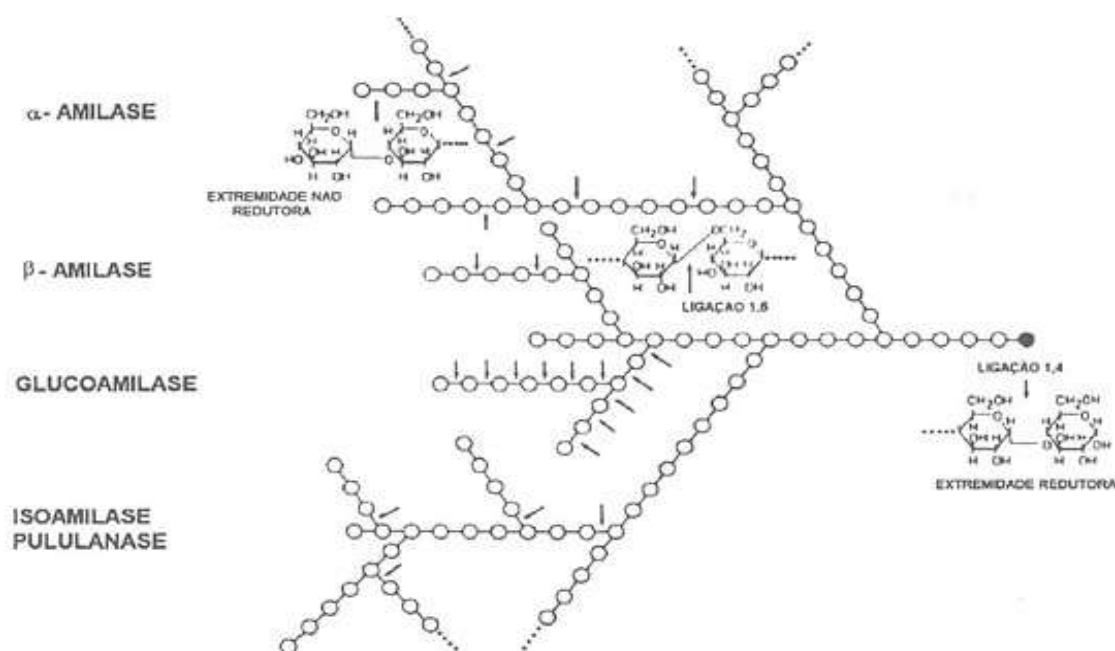
colônias têm coloração cinza-castanho pálido, e os esporangióforos com pigmentação escura ocorrem solitários ou em grupos com esporângios globosos. A literatura destaca a produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* por sua capacidade de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maior parte dos resíduos industriais (JIN et al., 2002; RAY, 2004; NOROUZIAN et al., 2006; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008). Espécies desse gênero, também são evidenciadas pela eficiência na diminuição dos níveis de contaminação pelas micotoxinas aflatoxina B1 e ocratoxina A (FURLONG, CACCIAMANI e BUFFON, 2007). Mediante o cultivo em estado sólido, Vatterm et al. (2004) reportaram propriedades antimicrobianas de extratos fenólicos obtidos a partir de *Rhizopus oligosporus*.

#### **2.4.2 Tipos e mecanismos de ação das amilases**

Dentre as enzimas produzidas por micro-organismos usadas industrialmente destacam-se: amilases, glicose-oxidases, lipases, proteases, pectinases, catalases, entre outras (BAUMER e DIEGO, 2008; SARROUH, 2012).

Com base no local onde atuam, as enzimas podem ser classificadas como extracelulares ou intracelulares. A principal função das enzimas extracelulares é executar alterações que auxiliem a penetração dos nutrientes para o interior celular. Enzimas intracelulares sintetizam o material celular, bem como catabolizam reações que suprem as necessidades energéticas da célula (PELCZAR et al., 1981).

Segundo Brenda (2013), as amilases são endoenzimas que agem especificamente para a clivagem do amido. Dentre as amilases estão as glicoamilases que liberam unidades de glicose pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 ( $\alpha$ -amilases), que originam dextrinas, e/ou  $\alpha$ -1,6 ( $\beta$ -amilases), que produzem maltose. Fazem parte da classe das hidrolases e catalisam a hidrólise do amido, liberando dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; GUANDALINI, 2007). Já as exoenzimas, hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das cadeias de amilose e amilopectina (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995). Vihinen e Mäntsälä (1989) descrevem, resumidamente, a degradação do complexo amilolítico como mostra a Figura 2.



**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura da amilopectina. Observa-se o modelo de ação de algumas amilases onde os círculos (-o-) representam unidades de glicose e as flechas (→) representam a posição que as enzimas amilolíticas podem hidrolisar. As indústrias de conversão de amidos a glicose utilizam apenas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase para hidrólise de amidos. Fonte: Vihinen e Mäntsälä (1989).

A ação coordenada de enzimas é necessária para converter eficientemente as macromoléculas de amido em compostos de baixa massa molecular, algumas destas especificidades são descritas a seguir (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989; ANTRANIKIAN et al., 1995; AQUINO et al., 2001; ELLAIAH et al, 2002; VAN DER MAAREL et al., 2002; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008):

- $\alpha$ -amilases (E.C. 3.2.1.1): correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos. Também conhecidas como dextrinas, são divididas em duas categorias de acordo com o grau de hidrólise do substrato:  $\alpha$ -amilases sacarificantes, com poder de hidrólise de 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, atuando de 30 a 40% do substrato;

- $\beta$ -amilases (E.C. 3.2.1.2): são exoenzimas (sacarificantes) que hidrolisam a penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 partindo da extremidade não redutora da molécula, liberando maltose. Não são capazes de hidrolisar ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 dos substratos ramificados;

- Glicoamilases: são exoamilases que produzem  $\beta$ -D-glicose a partir da extremidade não redutora das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. Podem



hidrolisar também ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, porém mais lentamente. Conhecidas também como enzimas de sacarificação tem capacidade de clivar completamente o amido quando incubadas por longos períodos;

- Pululanases (EC 3.2.1.41): são enzimas desramificantes que quebram as ligações  $\alpha$ -1,6 do pululano (polissacarídeo linear que consiste em matotrioses unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e que não pode ser degradado por  $\alpha$  ou  $\beta$ -amilases). O produto deste tipo de hidrólise é a maltotriose;

- Isoamilases (EC 3.2.1.68): hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 das cadeias de amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos, porém não hidrolisa a ligação  $\alpha$ -1,6 do pululano;

- As transferases clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação.

A seguir serão abordadas as características de algumas enzimas amilolíticas. Diversas variáveis e parâmetros físicos afetam suas propriedades e dessa forma, a Tabela 3 apresenta algumas propriedades importantes de enzimas de origem fúngica. É possível observar que estas enzimas apresentam uma massa molar na faixa entre 54 e 100 kDa. Em relação aos valores ótimos de pH, as amilases se encontram na faixa ácida (4,0 à 5,0). Podem ser observados, ainda, dados referentes ao ponto isoelétrico (PI) das enzimas, que se caracteriza pelo pH no qual a proteína apresenta carga líquida igual a zero, ou seja, no qual as cargas dos resíduos de aminoácidos se anulam.

**Tabela 3.** Propriedades de algumas amilases fúngicas.

| <b>Enzima/Fonte</b>                              | <b>Massa molar (kDa)</b> | <b>pH ótimo</b> | <b>PI</b> | <b>Temperatura Ótima (°C)</b> | <b>Referências</b>         |
|--------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------|-------------------------------|----------------------------|
| $\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus awamori</i> ) | 54,9                     | NR              | 4,52      | NR                            | EXPASY (2012)              |
| $\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus usamii</i> )  | 57-100                   | 4,5-5,0         | NR        | 50-65                         | SUGUNUMA et al. (2004)     |
| $\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )  | 68                       | 5,0             | NR        | 50                            | RAMACHANDRAN et al. (2004) |
| $\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus awamori</i> ) | 54                       | 4,8-5,0         | 4,2       | 50                            | BHELLA E ALTOSAAR (1985)   |
| Glucoamilase ( <i>Aspergillus awamori</i> )      | 68,3                     | NR              | 4,25      | NR                            | EXPASY (2012)              |
| Glucoamilase ( <i>Aspergillus niger</i> )        | 58-99                    | 4,0-5,0         | NR        | 55-65                         | ONO et al. (1988)          |
| Glucoamilase ( <i>Aspergillus awamori</i> )      | NR                       | 5,0             | NR        | 70                            | NEGI E BANERJEE (2009)     |
| Glucoamilase ( <i>Cortisium rolfsii</i> )        | 69-79                    | 4,5             | 3,8-4,1   | 60                            | NAGAZAKA et al. (1998)     |
| Glucoamilase ( <i>Humicula sp.</i> )             | 72,8                     | 4,7             | NR        | 55                            | RIAZ et al. (2007)         |

Obs. PI - Ponto Isoelétrico. NR: valores não reportados.

Os valores de PI estão dentro da faixa de pH ótimo, o que está relacionado com o mecanismo descrito de ação de amilases, mostrando que as cargas dos resíduos da enzima apresentam um papel fundamental na catálise (EXPASY, 2012). Em relação à temperatura ótima, a Tabela 3 fornece dados que variam de 50 a 70 °C.

A influência de íons metálicos no comportamento enzimático bem como no desenvolvimento do micro-organismo produtor de enzimas é alvo de estudos para entender melhor essa interação. Estes íons podem estar diretamente envolvidos no processo catalítico durante a reação enzimática ou participar nas reações de transferência de elétrons (NAZMI et al., 2006). O desenvolvimento inicial das hifas fúngicas e a germinação dos esporos podem ser inibidos pela presença excessiva de metais (KOOMEN et al., 1990).

A estabilidade enzimática pode ser induzida por íons divalentes como o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Em baixas concentrações, estes podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, o que confere a ela uma estabilidade maior (TOMAZIC, 1991).

A literatura aponta grande diversidade de estudos que objetivam o aumento da atividade e estabilidade enzimática mediante a utilização de íons metálicos, porém sabe-se que íons de metais pesados são fortes inibidores de  $\alpha$ -amilase. O magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) é considerado um potencializador enzimático na produção de  $\alpha$ -amilase. Já os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) são ativadores da produção enzimática por *Bacillus sp.* Potássio ( $\text{K}^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), entre outros, não apresentam efeito sinérgico, enquanto o  $\text{Ca}^{2+}$  mostra-se inibidor de *Aspergillus oryzae* (GUPTA et al., 2003). Entretanto, certas amilases não requerem obrigatoriamente nenhum tipo de íon metálico divalente para a atividade, e nem são estimuladas na presença desses íons (YANG E LIU, 2004; NAJAFI et al., 2005).

O manganês pode apresentar efeitos adversos se em excesso, entretanto os índices de tolerância a metais tóxicos são variados (WEISSENHORN et al., 1994).

### 2.4.3 Aplicações das amilases

Por suas diversas aplicações biotecnológicas e industriais, as amilases são um importante complexo enzimático, totalizando 25 a 33% da produção mundial de enzimas, ocupando o segundo lugar logo após as proteases (NGUYEN et al., 2002; EIJSINK et al., 2008; BORGIO, 2011; MARKET RESEARCH NEWS, 2011; KUMAR, SAHAI e BISARIA, 2012).

A hidrólise do amido, antes feita por via química sob alta temperatura, atualmente está sendo substituída pela hidrólise enzimática em mais de 75% dos processos (KANDRA, 2003; WANG et al., 2011). Esta é uma forma simples de produzir carboidratos com propriedades funcionais especiais (MOORE et al., 2005). A literatura aponta que a glicoamilase e a  $\alpha$ -amilase são as enzimas mais importantes utilizadas no processamento de amido (CARVALHO et al., 2008; FERREIRA-NOZAWA et al., 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; HASHEMI et al., 2010).

As amilases são um grupo de enzimas com destaque nas indústrias de detergentes, alimentícia, têxtil e química, na panificação, indústria farmacêutica, na hidrólise do amido e na produção de biocombustíveis (MOREIRA et al., 1999; NIELSEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002; SUMERLY, 2003; GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005; PANDEY et al., 2005; SOCCOL, 2005; MITIDIERI et al., 2006; ALVA et al., 2007; SOUZA e MAGALHÃES, 2010; CASTRO et al., 2010; WANG et al., 2011).

Um mercado com ótimo retorno para aplicação das amilases é na produção de hidrolisados de amido obtendo-se glicose e frutose. Este amido é convertido em xaropes de milho com alto teor de frutose e, devido a sua alta propriedade adoçante, são muito utilizados como adoçantes na indústria de refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

Outros tipos de aplicabilidades para amilases é a panificação, preparação de auxiliares da digestão, sucos de frutas, bebidas e produção de bolos (COUTO e SARNROMÁN, 2006). As  $\alpha$ -amilases são amplamente utilizadas na panificação para degradar o amido da farinha em pequenas dextrinas, que são subsequentemente fermentadas pela levedura. A adição destas enzimas na massa resulta no aumento da taxa de fermentação, bem como a redução da viscosidade, gerando um produto final com melhor volume e textura (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Na indústria têxtil, a aplicabilidade da amilase faz com que haja um redimensionamento dos tecidos mediante a hidrólise do amido (MARYAN e MONTAZER, 2013). Uma camada removível da pasta de amido aplicada ao fio é removida com a finalidade de aumentar a resistência à fricção durante o processamento. Quando não há remoção desta pasta o processamento final das roupas fica comprometido (tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento) (SPIER, 2005; GUANDALINI, 2007).

Nas indústrias de papel as amilases são utilizadas para modificar o amido que é aplicado como cobertura do papel e fornece proteção contra danos mecânicos durante o processamento, além de melhorar a qualidade do produto final (GUPTA et al., 2003).

A expansão na área de aplicações de enzimas está aumentando o desempenho dos detergentes líquidos enzimáticos, sendo a classe das proteases, a primeira a ser usada na formulação dos detergentes e as amilases o segundo tipo de enzimas empregadas para esta finalidade (MITIDIERI et al., 2006).

O fator limitante para o uso dessas enzimas é o alto custo. De acordo com a empresa SIGMA-ALDRICH (2014), o valor estimado para aquisição de  $\alpha$ -amilase de *Rhizopus sp* contendo 40 U/mg é de R\$ 1.491,00/g.

## **2.5 Purificação de enzimas**

Para produzir enzimas comercialmente, é preciso passar por etapas de produção, separação, recuperação e purificação da enzima de interesse (SPIER, 2005). Para Rodrigues (1993) os equipamentos e materiais para separação e purificação, podem representar cerca de 90% do custo final de um produto obtido por fermentação. A possibilidade do aumento da concentração enzimática associada à diminuição de processos aplicados para refino do produto bruto mostram-se

promissores economicamente para o emprego em processos fora do âmbito farmacêutico, visto que as diferentes aplicabilidades não necessitam de altos graus de pureza.

Entram em cena os processos de purificação parcial, que são economicamente vantajosos em termos financeiros e agilidade da obtenção dos resultados, bem como valorizam o produto final por seu grau de limpidez.

## **2.6 Hidrólise do amido e Mecanismo de ação química e enzimática**

Diversos trabalhos literários destacam a capacidade do *Rhizopus* em hidrolisar amido mediante a produção de amilases produzindo xarope de glicose (SOCCOL et al., 1994; JIN et al., 1999; PANDEY et al., 2000; SPIER, 2005; SIVARAMAKRISHNAM et al., 2006).

A hidrólise enzimática do amido ocorre em diversas etapas com mais de um tipo de amilase, visando sua conversão completa em xarope de glicose. Primeiramente ocorre a liquefação para solubilizar as moléculas de amido em dextrinas de cadeia curta. O produto final depende do tempo de incubação e da quantidade de enzima utilizada. Posteriormente ocorre a sacarificação do caldo de amido hidrolisado, resultando em um xarope de glicose com alta concentração (95%) e este processo é realizado utilizando uma glicoamilase, comumente, de origem fúngica. O tempo é de aproximadamente 12 a 96 h e a temperatura pode variar em torno de 60 °C. Um terceiro passo industrial é a conversão do xarope com alto teor de glicose (VAN DER MAAREL et al., 2002).

O amido pode ser hidrolisado por via química ou enzimática e apesar da hidrólise ácida ainda ser utilizada, a aplicação de enzimas tem se mostrado cada vez mais vantajosa.

As enzimas fazem parte de uma tecnologia limpa que visa substituir gradativamente muitas reações químicas utilizadas nos processos industriais atuais. Um dos aspectos positivos é que as enzimas catalíticas são específicas para a reação, consequentemente, proporcionam a obtenção de xaropes com propriedades químicas e físicas bem definidas, além da reação ser mais branda e evitar o escurecimento do produto final (BALLESTEROS et al., 2002; NIBA, 2005; SEVERO et al., 2010). Isso demonstra a capacidade de minimização de problemas ambientais oferecida pelas enzimas (FELLOWS, 2006; NOVOZYMES, 2011).

Segundo Tafarello (2004) a hidrólise enzimática teve grande contribuição ao processo industrial, com destaque aos produtos obtidos a partir de fontes amiláceas.

## **2.7 Condições de crescimento dos micro-organismos e produção de enzimas**

Entre os fatores de natureza físico-química, a aeração, umidade, o tempo, a temperatura e o pH podem influenciar tanto na atividade enzimática quanto no crescimento dos

micro-organismos (SUDHARHSAN et al., 2007; SINGHANIA et al., 2009; HASHEMI et al., 2013).

O alto teor de umidade pode induzir a contaminação bacteriana e fúngica, diminuir a porosidade, a difusão de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado, baixo teor de umidade pode levar a uma má acessibilidade de nutrientes e consequentemente a um menor crescimento (PANDEY, 2003; DALSENTER et al., 2005). O aumento do tempo de incubação pode gerar decréscimo na atividade da enzima devido a produção de co-produtos resultantes do metabolismo microbiano, além do esgotamento de nutrientes, que são consumidos, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima (ALVA et al., 2007; SHAFIQUE et al., 2009).

A geração de calor devido às atividades metabólicas dos micro-organismos é muitas vezes fatal para processos biotecnológicos, porque grande parte das enzimas produzidas durante a fermentação pode ser desnaturada pelo calor ao final do processo (SANTOS et al., 2004, PINTO, 2009). Se considerarmos que, quanto maior a temperatura a ser utilizada em uma fermentação maior é o gasto com energia para a manutenção desse processo, devemos levar em conta a relação entre maior atividade enzimática e menor temperatura de fermentação, o que responde a expectativa de aprimoramento e barateamento do processo (FREITAS, 2012).

## **2.8 Fatores que interferem na atividade enzimática**

A temperatura e o pH são dois fatores que desempenham papéis críticos na atividade enzimática. O pH ideal e a temperatura para atividade de amilase estão relacionados. Em cultivo em estado sólido, são preferidos pH baixo e alta temperatura, visto que otimizam a produção enzimática (HASHEMI et al., 2010).

De acordo com a literatura o pH ótimo para  $\alpha$ -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0, possui caráter ácido e é solúvel em água. A faixa ótima de sua atividade é de 55 a 70 °C (HARGER, 1982; REED, 1975). A  $\beta$ -amilase tem pH ótimo entre 4,0 e 6,0 e temperatura ótima de 30 a 50 °C (QUAGLIA, 1991). Já as amiloglucosidades apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 (COSTA, 1996) e entre 4,5 a 5,0 (SOCCOL et al., 2005). A temperatura ótima para esta última enzima se encontra entre 50 e 60 °C (REED, 1975; COSTA, 1996).

No que diz respeito ao pH de um meio de cultura, ele pode mudar em resposta às atividades metabólicas. A razão mais óbvia é a secreção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico, acético ou láctico, que podem levar a uma diminuição do pH, da mesma forma que o consumo de sais de amônia. Por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos que podem estar presentes em

certos meios conduzirá ao aumento do pH, assim como a hidrólise da ureia irá resultar em alcalinização.

A cinética da variação do pH depende do micro-organismo. Além disso, a natureza do substrato tem uma forte influência sobre a variável pH, visto que esse controle geralmente não é feito devido a dificuldades técnicas, e problemas são evitados devido ao efeito de tamponamento de materiais lignocelulósicos. Esses processos descrevem a fermentação submersa (LONSANE et al., 1985; RAIMBAULT, 1998; FREITAS, 2012) que, em comparação com a FES, é muito menos eficaz para o presente trabalho.

## **2.9 Produção de etanol**

### **2.9.1 Fermentação alcoólica**

A via fermentativa para produção de etanol é uma tecnologia muito desenvolvida no Brasil, que o coloca em condições favoráveis no panorama energético, principalmente se forem consideradas as constantes oscilações do preço do petróleo internacional que em décadas anteriores já era verificado (ZANIN et al., 2000) e que atualmente é fonte de preocupação pela comunidade internacional tendo em vista a inexorável escassez futura.

A utilização do etanol mostra-se benéfica, tanto do ponto de vista ambiental enfatizando seu caráter renovável e quase inesgotável, quanto pela eficiência na geração de trabalho mecânico (TROVATI et al., 2002). Segundo Oliveira et al. (2008) o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol por via fermentativa, perdendo apenas para os Estados Unidos.

A fermentação alcoólica ocorre no interior de micro-organismos capazes de converter açúcares assimiláveis (substrato oxidado) em etanol (substrato reduzido), por meio de reações bioquímicas reguladas enzimaticamente. A geração de um composto orgânico reduzido, a partir da oxidação parcial do substrato permite um mínimo de produção de energia para manutenção celular e o equilíbrio oxidativo (CINELLI, 2012).

As amilases mostram-se cada vez mais importantes em via alternativa de conversão do amido em etanol, valendo-se simultaneamente da sacarificação e da fermentação (SINGH et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1998). Esta é uma forma de solucionar a escassez de combustíveis que alguns países já apresentam. O amido, presente no meio de fermentação contendo *Saccharomyces cerevisiae*, é convertido mediante a ação conjunta das amilases em glicose, que posteriormente passa pelo processo de fermentação e é convertida em etanol (RAJOKA et al., 2004).

As leveduras são consideradas anaeróbios facultativos, portanto são capazes de crescer na presença ou na ausência de oxigênio. Entretanto, quando em meio anaeróbio ou com altas

concentrações de glicose, o etanol é o principal produto final. A levedura *S. cerevisiae*, pode alternar de respiração para fermentação alcoólica. Porém, pode ocorrer um fenômeno conhecido como Crabtree negativo (CRABTREE, 1928), onde a concentração de glicose ultrapassa um valor limite crítico, e a fermentação alcoólica ocorre mesmo na presença de oxigênio (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986)

Os subprodutos da fermentação, tais como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores, são produzidos em pequena quantidade se comparados as de etanol. A produção destes compostos em altas taxas diminui a produção de etanol. A eficiência de conversão em etanol em escala industrial, calculada tendo como referência o rendimento de 51,1% chega a 93%, isto se deve principalmente, ao crescimento celular e a produção de produtos finais do metabolismo secundário (INGLEDEW, 1999).

Biocombustíveis podem ser caracterizados como de primeira geração (G1), que são os biocombustíveis obtidos a partir de amido e açúcares, e biocombustíveis de segunda geração (G2), obtidos a partir de materiais lignocelulósicos (COPOLLA et al., 2009). As tecnologias de produção dependem da matéria-prima que entra no processo de produção; o bioetanol G1 vem, portanto do amido de trigo ou de milho (via úmida ou seca), e a partir de açúcares provenientes da cana-de-açúcar e beterraba, enquanto o bioetanol G2 vêm da fermentação de açúcares obtidos de material lignocelulósico de madeira, palha, bagaço e outros resíduos (THOMSEN et al., 2007).

O etanol de cereais é definido como álcool etílico hidratado extraído de cereais, como milho, arroz e etc. Difere do álcool etílico hidratado proveniente de outros materiais, principalmente o produzido a partir da cana-de-açúcar, já que não apresenta um padrão satisfatório de qualidade. Dessa forma, o álcool de cereais pode ser utilizado em aplicações mais nobres, como na produção de cosméticos, remédios, explosivos, tintas e bebidas. A aplicabilidade do bioetanol é ampla como combustível, como em misturas com gasolina ou como reagente para produção de biodiesel (ORTIZ, 2010). Por isso, a aplicabilidade deste da quirera de arroz em condições que agreguem valor final é muito interessante.

### **2.9.2 Processos de batelada alimentada e contínuo**

No Brasil os processos de fermentação de etanol mais utilizados são o de batelada alimentada e o contínuo. O processo de batelada alimentada surgiu no início do século XIX, na fabricação industrial de fermento para a panificação (BROWN, 1990, apud ABUD, 1997). De acordo com Almeida (1940), nesse processo há a alimentação contínua do mosto na dorna de fermentação e ao seu término, o produto fermentado é centrifugado e separado da levedura. O processo de batelada alimentada, durante a fase inicial, não permite o efeito inibitório do



açúcar, o que resulta em maior concentração de etanol em um mesmo período de tempo quando comparada com a batelada convencional (não alimentada). Existem três possíveis formas para ocorrer alimentação: pode ser realizada mediante adições intermitentes, à velocidade constante e de forma exponencial (OLIVA-NETO, 1990; WINKLER, 1991 e 1995).

No processo contínuo, o meio nutriente mais o inóculo são injetados de forma ininterrupta em reatores, com a saída da mesma quantidade de meio fermentado (WINKLER, 1995; ABUD, 1997). Este processo pode oferecer mais vantagens que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições no processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançados o estado desejado e minimização do tempo de limpeza e sanitização das dornas (CYSEWSKI e WILKIE, 1978). Por outro lado, as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição, essa é a maior desvantagem do processo que além de exigir um conhecimento apurado para aperfeiçoar as condições do processo para alcançar o rendimento desejado, principalmente durante a adição de produtos químicos, alterações da taxa de fluxo e a mistura dos nutrientes, ou alterações nos parâmetros estimados (INGLEDEW, 2003 apud BAYROCK e INGLEDEW, 2005). O total conhecimento desses parâmetros quando a planta do processo contínuo é desenhada ou operada é importante (BAYROCK E INGLEDEW, 2005).

### **2.9.3 Micro-organismo e Condições operacionais**

Tradicionalmente *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais utilizado para a produção de bebidas alcoólicas e etanol, tendo açúcares como sacarose e glicose como substratos. Este micro-organismo também é capaz de produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos (MARTÍN et al., 2002; PALMQVIST E HAHN-HAGERDAL, 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi utilizada neste trabalho, apresenta maior aplicabilidade na produção industrial devido à sua boa capacidade fermentativa, por ser menos sensível a alguns fatores, tais como temperatura elevada, toxicidade ao etanol e outros inibidores, assim como a capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas que são características estabelecidas em fermentações em larga escala (OSMAN et al., 1985; BARBOSA et al., 1994; KNAUF E KRAUS, 2006; MOREAU et al., 1997; THANONKEO et al., 2007).

O potencial hidrogeniônico do meio é um fator importante para a produção de etanol, tanto para o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de produtos, quanto para o controle da contaminação bacteriana (ALVES, 1994). As bactérias não tem muita resistência

ao pH ácido e em tal situação, tem menor velocidade de crescimento que as leveduras. Dorta et al. (2006) verificou que o tratamento ácido inferior a 3,8% junto aos outros fatores estressantes dos meios induziu uma diminuição significativa no crescimento celular da linhagem, cerca de 10%. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcoólica em pH acima de 3,8, enquanto que para as bactérias lácticas o pH ideal é na faixa de 6,0 (KANDLER e WEISS, 1986).

Em leveduras a principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise, através da qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (MADGAN, MARTINKO E PARKER, 2000).

A possibilidade de utilizar fontes renováveis de energia e resíduos antes inutilizados, para agregar valor a estes e poupar a natureza dos efeitos maléficos dos poluentes, além de reduzir o custo do produto final, demonstram a importância do desenvolvimento deste tipo de bioprocessos. O desenvolvimento de tecnologias para produção de glicose e etanol a partir de resíduos amiláceos constitui uma das formas de contribuição para a produção de biocombustíveis de baixo custo sem o aumento da expansão de áreas agrícolas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

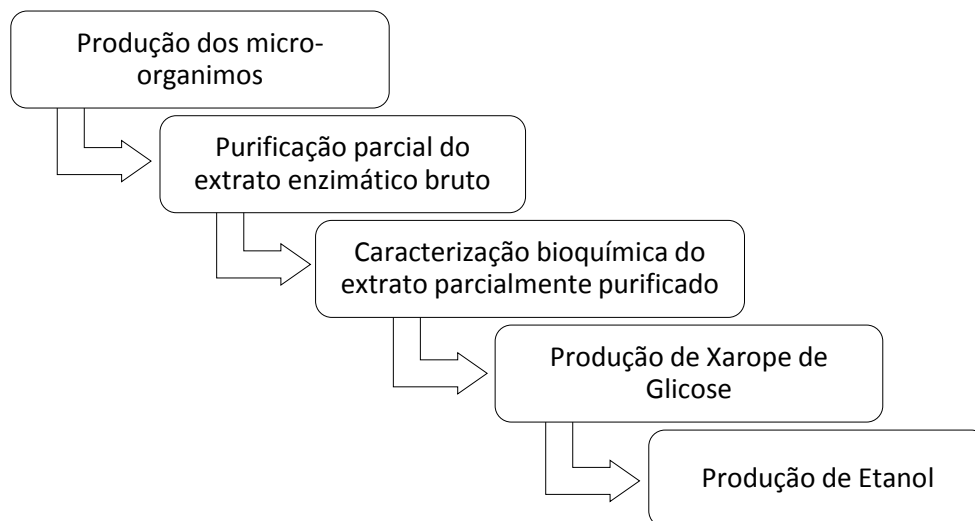
Produção e purificação parcial de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e sua aplicação na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir da hidrólise enzimática de quirera de arroz.

#### 3.2 Específico

1. Produção de amilases por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação em estado sólido (FES), utilizando farelo de trigo como substrato.
2. Pré-purificação do caldo fermentado por filtração a vácuo, centrifugação refrigerada, e concentração tangencial através de cartucho de fibra oca e métodos cromatográficos.
3. Caracterização bioquímica quanto ao pH e temperatura ótimos e de estabilidade, e influência de íons no extrato parcialmente purificado.
4. Utilização do extrato bruto para sacarificação do amido da quirera de arroz e obtenção de xarope de glicose.
5. Produção de etanol a partir da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se xarope de glicose obtido mediante a sacarificação enzimática da quirera de arroz.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho envolveu cinco etapas gerais:



**Figura 3.** Fluxograma de representação das etapas gerais do presente estudo.

### 4.1 Produção de amilases de Rhizopus oligosporus

#### 4.1.1 Micro-organismo e manutenção das cepas

A linhagem do fungo *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* (CCT 3762) foi adquirida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas – SP, e mantida em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), por incubação de 7 dias à 30 °C. Após o crescimento, foi preparada uma suspensão de esporos com concentração de  $10^7$  esporos/mL, adicionada de glicerol de modo a se obter uma suspensão a 20% de glicerol. Essa suspensão foi acondicionada em criotubos e mantida à -20 °C. A linhagem também foi mantida repicando-a em tubos *slant* contendo meio BDA, sob refrigeração à 4 °C.

A linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* M-26, que foi isolada por pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Industrial da FCLA-UNESP - Assis/SP da Usina Raízen, na época da coleta denominada Usina Nova América, Município de Tarumã/SP, e uma linhagem de fermento Fleishmann fresco foram utilizadas nos testes de fermentação deste trabalho. As leveduras foram armazenadas à -75 °C em Eppendorfs com meios YM (com 10% de glicerol) a pH 5.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram autoclavados a 121 °C, 1 atm, durante 20 min.

#### **4.1.2 Produção da enzima em Fermentação em Estado Sólido (FES)**

A linhagem de *Rhizopus oligosporus* foi repicada em frascos Erlenmeyer 250 mL contendo meio BDA e mantidos a 30 °C por 7 dias. Após o crescimento, a superfície foi lavada com uma solução 0,01% (v/v) de Tween 80 estéril para remoção dos esporangiósporos (esporos), visando o preparo de uma suspensão contendo  $10^7$  esporos/mL, a ser inoculada sobre o substrato sólido. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato seco, cujo inóculo foi 1 mL da suspensão previamente descrita. O substrato utilizado foi o farelo de trigo, obtido da empresa de processamento de trigo: Moinho Nacional, Assis/SP.

A solução de sais utilizada foi composta por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,5% - m/m),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,25% - m/m), e ureia (1,25% - m/m), todos calculados como porcentagem da massa de substrato. A umidade empregada foi de 55% e os frascos foram mantidos a 30 °C por 120 h (FREITAS et al., 2014).

Após a fermentação a enzima foi extraída adicionando-se 5 mL de água destilada por grama de substrato, seguido de agitação em *shaker* (180 rpm, 30 min, 30 °C), e prensagem manual. O sobrenadante, chamado de extrato bruto líquido, foi utilizado para a purificação parcial e caracterização das amilases, bem como para os testes de hidrólise da quirera de arroz.

### **4.2 Purificação parcial do extrato enzimático bruto**

#### **4.2.1 Pré purificação do extrato enzimático**

Mediante a fermentação em estado sólido obteve-se um extrato enzimático bruto que foi submetido à filtração a vácuo e centrifugação refrigerada a 6.000 x g a 4 °C, durante 20 min. Após esses processos, o volume total foi concentrado por um sistema de filtração tangencial (Flex Stand Benchtop System), com cartucho de fibra oca de 10 kDa (GE).

#### **4.2.2 Cromatografias de troca iônica**

A amostra bruta concentrada, foi aplicada à cromatografia de troca iônica em coluna Tricorn 5/50 (GE) empacotada com 1 mL de resina aniônica Source 15Q (GE) e equilibrada com

tampão Tris-HCl a 30 mM, pH 7,0. A amostra foi diluída com este mesmo tampão, na proporção 1:1,5 mL. A eluição foi com fluxo de 0,4 mL/min e gradiente salino de 0 a 2,0 M de NaCl (5 volumes de coluna). Foram coletadas frações de 1,5 mL. Essa etapa cromatográfica foi realizada utilizando-se o sistema ÄKTA Purifier Box 900 (GE) e as frações foram coletadas utilizando-se o coletor de frações (GE Frac-920).

#### ***4.2.3 Cromatografias de interação hidrofóbica***

A amostra obtida na cromatografia de troca iônica com atividade enzimática, foi aplicada à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Tricorn 5/50 (GE) empacotada com 1 mL de resina Phenyl Sepharose Fast Flow (GE) e equilibrada com tampão Hepes a 100 mM + 2,5 M de NaCl, pH 7,0. A amostra foi diluída com este mesmo tampão, na proporção 1,25:1,25 mL. A eluição foi com fluxo de 0,4 mL/min. Como a CIH separa proteínas de acordo com a hidrofobicidade de sua superfície utilizando uma interação reversível entre as proteínas e a matriz da coluna, foi feito gradiente com tampão Hepes 100 mM (5 volumes de coluna), para que a interação hidrofóbica fosse enfraquecida. Foram coletadas frações de 1,5 mL. Essa etapa cromatográfica também foi realizada utilizando-se o sistema ÄKTA Purifier Box 900 (GE) e as frações foram coletadas utilizando-se o coletor de frações (GE Frac-920).

#### ***4.2.4 Concentração da amostra***

O volume obtido na cromatografia de interação hidrofóbica que apresentou atividade enzimática, foi concentrado usando o sistema de concentração Amicon com membrana de 10 kDa (Millipore Ultracel). O processo ocorreu lentamente em banho de gelo, sob pressão de ar comprimido.

#### ***4.2.5 Cromatografias de exclusão molecular (gel filtração)***

A amostra concentrada foi aplicada à cromatografia de exclusão molecular (gel filtração), em coluna de vidro 1m/5cm empacotada com resina Sephadex G-50 (GE) e equilibrada com tampão acetato de sódio a 50 mM + 50 mM NaCl, pH 5,5. O fluxo foi de 0,6 mL/min, coletando frações de 5 mL. Essa etapa cromatográfica foi realizada utilizando-se o coletor de frações (GE Frac-920).

#### **4.2.6 Eletroforese**

As amostras coletadas das etapas de cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970). As proteínas foram visualizadas pelo método de prata (BLUM et al., 1987) e coloração com coomassie brilliant blue. O gel utilizado para a separação continha 12% (m/v) de poliacrilamida e o gel de empilhamento 4% (m/v).

As proteínas submetidas à eletroforese foram misturadas ao tampão Tris- HCl 50 mM, pH 6,8, contendo 0,2% de SDS, 10% de glicerol, 0,002% de azul de bromofenol e DTT. Antes de aplicar em SDS-PAGE, cada amostra foi desnaturada (fervida por cinco minutos em banho seco).

### **4.3 Caracterização Bioquímica do extrato enzimático parcialmente purificado**

#### **4.3.1 Efeito do pH na reação enzimática e estabilidade**

A determinação do pH ótimo foi feita utilizando como substrato para a reação enzimática o amido solúvel 1% em água. Os tampões utilizados foram: Glicina 100 mM (pH 3, 3,5 e 4); Acetato de sódio 100 mM (pH 4,5 e 5); MES 100 mM (pH 5,5, 6 e 6,5); Hepes 100 mM (pH 7, 7,5 e 8) e Bicine 100 mM (pH 8,5 e 9). O extrato enzimático parcialmente purificado foi submetido aos diferentes valores de pH, variando de 3 até 9. As misturas foram incubadas a 60 °C e os açúcares redutores (AR) determinados conforme descrito no item 4.6.1 a seguir.

Para os ensaios de estabilidade ao pH, o extrato enzimático purificado foi incubado nos diferentes valores de pH, variando de 3 a 9, com os mesmos tampões já citados acima a 25 °C por uma hora. Então, o tampão determinado como ideal foi utilizado para a reação enzimática padrão de determinação da atividade residual, já citada.

#### **4.3.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica**

O efeito da temperatura foi estudado mediante a incubação do extrato enzimático parcialmente purificado com a solução de amido solúvel 0,5% em tampão e pH pré-determinados, em diferentes temperaturas: 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75 e 80 °C por 30 min. Os AR foram determinados como citados no item 4.6.1.

Os ensaios de estabilidade térmica foram feitos expondo apenas o extrato enzimático parcialmente purificado, sem a presença do substrato, nas diferentes temperaturas descritas acima. Em intervalos de 15, 30 e 60 min, uma alíquota de 0,1 mL de enzima foi retirada e acrescida da

solução de amido 0,5% em pH ótimo. A seguir, a mistura foi incubada a temperatura ótima por 30 min, e novamente o protocolo de determinação de açúcares redutores foi seguido.

#### ***4.3.3 Estabilidade de íons na atividade enzimática***

A estabilidade de íons foi verificada incubando o extrato enzimático purificado junto a diferentes soluções de íons, por 5 min na temperatura determinada como ótima. Os seguintes sais foram testados:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaCl}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{BaCl}_2$ ;  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{KCl}$ ;  $\text{LiCl}$ ;  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , todos na concentração de 10 mM. Após esse período, a solução de amido solúvel 0,5% em tampão e pH ótimos foi adicionada, e seguiu-se o protocolo de determinação de AR padrão para determinar atividade amilolítica.

#### ***4.3.4 Efeito do manganês em diferentes concentrações na atividade enzimática***

Para o teste com o íon manganês foram utilizadas as concentrações de 2; 5; 7; 10; 12; 15; 17 e 20 mM. Nas diversas reações, foi adicionado o íon  $\text{Mn}^{+2}$ , em diferentes concentrações, junto ao extrato enzimático parcialmente purificado, e incubados por 5 min em banho-maria na temperatura ótima. Após esse período, foi adicionada uma solução de amido solúvel 0,5% em tampão e pH determinados como ideais para prosseguir com o protocolo para determinação de AR, para determinação da atividade amilolítica.

#### ***4.4 Produção do xarope de glicose***

A hidrólise enzimática foi empregada na sacarificação da quirera de arroz e do pó de brunição do arroz, que são subprodutos das indústrias de processamento de arroz, para a obtenção de glicose, utilizando as melhores condições de pH e temperatura (55 °C). Para o processo biocatalítico foram preparadas soluções de resíduos amiláceos a 10% (m/v) gelatinizadas, como substratos em tampão acetato de sódio, 0,05 mol/L, pH 5,5. As soluções foram incubadas juntamente com 1,2 U/mL de extrato enzimático bruto, obtido em etapas anteriores, em biorreator de bancada (Tecnal – modelo Tec-Bio Plus) com capacidade para 2 L e frascos Erlenmeyer de 250 mL, pelo período necessário para que a hidrólise de 90% do amido disponível ocorresse (FREITAS, 2012).

Os experimentos ocorreram em períodos de 24 h, sendo que amostras de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 24 h para leitura do AR.



Nos testes realizados com o biorreator a agitação foi mecânica, variando entre 600 e 150 rpm, de acordo com a densidade das amostras ao passar do tempo; nos ensaios realizados em frascos Erlenmeyer a agitação foi manual.

#### **4.5 Produção de etanol**

##### **4.5.1 Produção de Saccharomyces cerevisiae**

As leveduras da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* M-26 cultivadas no laboratório, bem como o fermento comercial fresco Fleishmann (*S. cerevisiae*), foram utilizadas no processo de fermentação alcoólica.

##### **4.5.2 Meios de cultivo**

###### **4.5.2.1 Meio para a propagação das leveduras e Produção do inóculo**

O meio de cultivo para as leveduras foi o: Meio Formulado por Dorta et al. (2006) (m/v): 2% de sacarose, extrato de levedura 0,5%, sulfato de amônio 0,10%, fosfato bipotássico 3 H<sub>2</sub>O 0,1140%, sulfato de magnésio 7 H<sub>2</sub>O 0,024%, sulfato de manganês H<sub>2</sub>O 0,0012%, sulfato de zinco 7 H<sub>2</sub>O 0,0028% (pH 5).

###### **4.5.2.2 Meio para a Fermentação Alcoólica**

O meio utilizado foi o mesmo descrito para a propagação das leveduras para produção do inóculo, porém com 12% de concentração final de glicose via xarope produzido na etapa anterior e aqui denominado mosto.

##### **4.5.3 Multiplicação dos micro-organismos e Produção do inóculo**

A obtenção do inóculo para os processos fermentativos das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* M-26 foi feito de forma asséptica por meio de seus sucessivos cultivos no Meio Formulado em tubos de ensaio e posteriormente em frascos Erlenmeyer de 250 mL e 1000 mL, sucessivamente, sob agitação constante de 135 rpm em shaker com refrigeração à temperatura de 30 °C, por 24h. Após atingirem a concentração celular desejada no cultivo, as leveduras foram centrifugadas a 4 °C durante 25 min a 3500 x g.

#### **4.5.4 Ensaio de fermentação alcoólica**

Os ensaios de fermentação foram realizados empregando-se o processo Fed-batch (Batelada Alimentada) de acordo com a metodologia descrita por Dorta et al. (2006) com algumas modificações. As leveduras *S. cerevisiae* M-26 cultivadas neste trabalho, bem como o fermento comercial fresco Fleishmann foram utilizados nos ensaios. Um total de 18 g de massa úmida de fermento foi suspensa em 41,25 mL de água destilada estéril, acrescida de 18,75 mL de mosto, obtendo-se um volume de 60 mL inicialmente, em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A alimentação asséptica do fermentado foi feita mediante 5 alimentações de 20 mL de mosto nos tempos 2, 3, 4, 5 e 6 horas de fermentação. O volume final nos frascos foi de 160 mL. A incubação foi feita em incubadora orbital com controle de temperatura a 32 °C, 80 rpm, por 12 e 24 horas. Após o período de fermentação foi feita a centrifugação do mosto fermentado em centrífuga refrigerada a 4 °C, 3500 x g, por 25 min. Amostras foram retiradas no final para análises.

#### **4.6 Procedimentos analíticos**

##### **4.6.1 Determinação de açúcares redutores e atividade enzimática**

A dosagem de açúcares redutores (AR) liberados durante a reação enzimática foi realizada pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959). Para a reação, foram adicionados 0,1 mL de solução enzimática a 0,65 mL de solução 0,5% (m/v) de amido em tampão acetato pH 5,5 (0,05 mol/L). Os tubos foram colocados em banho-maria a 60 °C, durante 10 minutos. Para interromper a reação enzimática foram adicionados 0,5 mL do reagente DNS e a mistura foi levada ao banho de ebulição por 5 minutos. Em seguida, os ensaios foram resfriados em banho de gelo e o conteúdo acrescido de 3,75 mL de água destilada. Os tubos foram agitados por inversão e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

O valor obtido na leitura foi utilizado no cálculo da concentração de açúcares redutores, a partir de uma curva padrão relacionando concentração de glicose com densidade óptica. O controle da reação foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação e expressa em U/g de substrato seco.

#### **4.6.2 Determinação de proteínas**

De acordo com o método de Bradford (1976), a dosagem de proteínas foi realizada utilizando o reagente Coomassie Blue G e soro-albumina bovina (BSA), como padrão para curva de calibração. A concentração de proteínas foi estimada com leituras de absorbância a 595 nm.

#### **4.6.3 Crescimento e viabilidade das leveduras**

A determinação do crescimento e viabilidade celular foi realizada após 10 h de fermentação, mediante a contagem de células vivas/mL do extrato através da adição de 1 mL de cada amostra em 1 mL de solução corante de azul de metileno (azul de metileno 0,01 g e 2,0 g de citrato de sódio diluídos em 100 mL de água destilada) (LEE et al., 1981). Após homogeneização foi feita a contagem de células vivas (não coradas) em Câmara de Neubauer, e a determinação da viabilidade celular determinada pela razão de células vivas/células totais por mL de extrato (DORTA et al. 2006; SHINYA, 2012). A determinação da quantidade foi encontrada segundo as equações:

$$\text{n}^{\circ} \text{ células/mL} = \sum \text{ dos quadrantes} \times 5 \times 10^4 \times \text{FD}$$

Onde:  $\sum$  dos quadrados = somatória do número de células contadas nos cinco quadrantes;  $10^4$  = ajuste de volume na câmara; FD = fator de diluição da amostra.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células vivas} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células (vivas + mortas)}}$$

#### **4.6.4 Determinação da concentração de etanol e açúcares por CLAE**

A concentração de etanol foi calculada por meio de análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por cromatógrafo Agilent 1100 series equipado com coluna Aminex HPX-87H. O solvente utilizado na fase móvel foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mM, o fluxo foi de 0,6 mL/min, a coluna foi mantida a 45 °C e volume de amostra no injetor de 20 µL. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (Minisart) de 0,2 µm. O tempo total de cada corrida foi de 25 min.

A curva de calibração padrão foi feita com concentrações de etanol de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 g/L. Para os padrões de glicose, xilose e arabinose, foram utilizadas concentrações de açúcares de 0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 g/L.

#### **4.6.5 Refratometria na escala Brix**

Este método físico foi utilizado para medir a quantidade de sólidos solúveis presentes nas amostras antes e após a fermentação alcoólica. Baseia-se em um sistema de graduação de aparelhos especialmente para ser utilizado na indústria açucareira, mais precisamente na análise de açúcares em geral que estejam em solução (SPENCER, MEADE, 1945). As amostras foram aplicadas diretamente no aparelho refratômetro para obter a leitura em °Brix (%) a uma temperatura de 20 °C.

#### **4.6.6 Eficiência de hidrólise**

A eficiência dos processos foi calculada como a concentração de glicose obtida pela quantidade de substrato ofertado e dada em porcentagem (%).

$$E \text{ hidrólise} = \frac{\text{massa de glicose obtida}}{\text{massa de substrato ofertado}}$$

#### **4.6.7 Cálculos da eficiência e a produtividade etanólica**

A eficiência da produção do etanol foi calculada através da seguinte fórmula:

$$E \text{ etanólica} = \frac{(M_f - M_0)}{M \text{ Teórica}} \times 100$$

Onde,

E etanólica – eficiência etanólica expressa (%).

M teórica =  $(S_0 - S_f) \times 0,511$ .

$S_0$  = massa de substrato inicial (g) (tempo 0).

$S_f$  = massa de substrato final (g).

$M_f$  = massa de etanol produzida (g) ao final da fermentação.

$M_0$  = massa de etanol inicial (g) (tempo 0).

0,511 = coeficiente de transformação de ART em etanol (m/v).

O cálculo de produtividade etanólica é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção da referida substância, sendo calculada da seguinte forma:

$$Pe = \frac{(M_f - M_0)}{t \times V} \quad (g \times L^{-1} \times h^{-1})$$

Onde,

$M_f$  = massa de etanol produzida (g) ao final da fermentação.

$M_0$  = massa de etanol inicial (g) (tempo 0).

$t$  = tempo de fermentação (h)

$V$  = volume (L).

$Pe$  = produtividade do etanol expressa em  $g \times L^{-1} \times h^{-1}$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de amilases por Rhizopus oligosporus em fermentação em estado sólido

A produção do extrato enzimático bruto foi feita nas condições padrões já descritas no item 4.1.2 da metodologia de acordo com Escaramboni (2014). Foram realizados 27 ensaios de fermentação e obteve-se um total estimado em 2.400 mL de extrato com 39,8 U/mL o que equivale a 358 U/g de substrato.

A razão pela qual foi escolhida essa metodologia é devido a resultados prévios realizados por outros pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Industrial e dados de literatura. A produção de amilases de *Rhizopus oryzae* foi feita comparando-se o cultivo em estado sólido (FES) com o cultivo submerso (FSm), sendo que a maior produção enzimática foi verificada no primeiro cultivo. O extrato enzimático obtido por FES apresentou atividade amilolítica mais expressiva à temperatura de 60 °C (391,0 U/g) e muito superior ao obtido por FSm, além de ter maior produtividade (1.086 UE/mL.h) (OLIVA-NETO et al., 2013). Testes realizados por Freitas et al. (2014) comparam a produção de amilases durante o mesmo período e condições, realizada por *R. oryzae* e *R. oligosporus*, demonstrando um aumento na produção de 28,6% pelo segundo micro-organismo em relação ao primeiro, tornando-o mais vantajoso.

A FES tem como vantagens sobre a FSm, uma abordagem favorável ao ambiente e a fisiologia de fungos e demais micro-organismos (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). As características do meio sólido proporcionam ao fungo um ambiente muito similar ao encontrado na natureza, assegurando a atividade metabólica eficiente por sua alta porosidade e difusão de oxigênio (ESCARAMBONI, 2014). Estes resultados corroboram os obtidos neste estudo, e justificam a opção pela metodologia adotada utilizando o farelo de trigo como um substrato promissor, a FES e *Rhizopus oligosporus* como micro-organismo.

O volume líquido extraído de extrato bruto foi concentrado e utilizado para aplicação em todas as fases de purificação determinadas.

### 5.2 Etapas de purificação parcial do extrato enzimático bruto

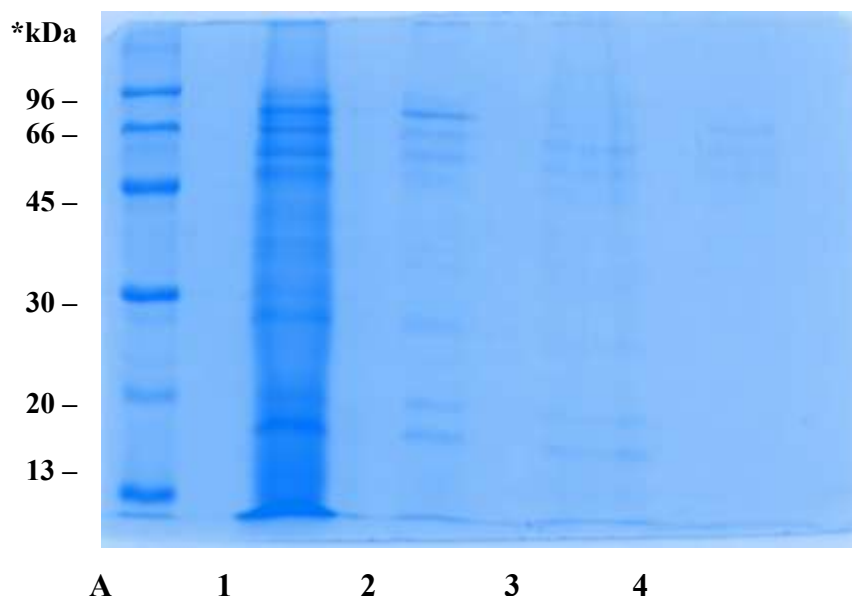
Para definição do protocolo de purificação parcial do caldo enzimático, foram aplicadas diversas técnicas, e as que apresentaram os melhores resultados foram utilizadas no estudo em questão.

O extrato enzimático bruto foi pré-purificado através de etapas de filtração, centrifugação e concentração, para que fosse possível submetê-lo aos demais processos posteriores.

O extrato bruto antes da concentração apresentava uma atividade de 39,8 U/mL ou 358 U/g. Após a concentração de 2.400 para 236 mL (11,27 vezes) através de ultrafiltração tangencial utilizando cartucho de fibra oca de 10 kDa, foi possível atingir 66,2 U/mL, valor que foi utilizado inicialmente para as etapas de purificação. As razões pelas quais se obteve apenas 66,2 U/mL, após a concentração do extrato, são ainda desconhecidas. A purificação enzimática é um processo complexo de eliminação de constituintes indesejáveis, e utilizando-se a FES este pode tornar-se dificultado devido a grande quantidade de partículas e impurezas, o que compromete a atividade catalítica da enzima bem como encarece o processo de purificação devido ao aumento das etapas de separação a serem empregadas (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

A figura 4 demonstra as etapas de purificação através da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com coomassie brilliant blue, com as etapas sucessivas demonstradas. A aplicação do extrato bruto na coluna de troca iônica foi a primeira fase no processo cromatográfico, o volume com atividade foi então submetido à coluna com resina de interação hidrofóbica. Após estes ciclos, o volume avaliado com atividade enzimática resultante foi concentrado e então aplicado à cromatografia de gel filtração, para retirada do sal. A sequência cromatográfica apresentada, bem como todos os métodos empregados no sentido de obter a máxima purificação do extrato bruto, foram estudados de acordo com as melhores condições para a amilase em questão e seu processo fermentativo.

De acordo com a eletroforese em gel podemos verificar a presença de duas a três bandas, e mediante testes de atividade amilolítica foi possível determinar que a(s) amilase(s) continua(m) presente(s) no extrato parcialmente purificado. A massa molecular das amilases de *R. oligosporus* estão na faixa entre 60 e 96 kDa (Figura 4). Provavelmente trata-se de amiloglucosidase pois em testes feitos anteriormente com este tipo de extrato foi obtida apenas a produção de glicose a partir do amido disponível (Freitas et al., 2014). Segundo a literatura a amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) é uma enzima que rompe ligações dos tipos  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora, até glicose (LIN et al., 1998; PANDEY et al., 2005). De acordo com Zanin (1989) a amiloglucosidase é encontrada na forma de duas isoenzimas, o que conferem especificidades diferentes, e é essencialmente fúngica (*Aspergillus* e *Rhizopus*).



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com coomassie brilliant blue. (A) Marcador de massa molecular. (1) Extrato enzimático bruto. (2) Amostra da cromatografia de troca iônica. (3) Amostra da cromatografia de interação hidrofóbica. (4) Amostra da cromatografia de exclusão molecular – filtração em gel.

Outras diferentes técnicas cromatográficas foram testadas para a purificação do extrato enzimático, como por exemplo, a etapa de gel filtração sendo a primeira a ser empregada com a resina sephadex G-50, ou outras resinas de gel filtração como a superdex 75 (GE), resina catiônica source 15S aplicada na cromatografia de troca iônica, testes de precipitação com etanol e sulfato de amônio, testes de diálise em tampão e água destilada, emprego de diferentes tampões nas amostras e colunas de cromatografia, entre outros. Todos os testes foram feitos com a finalidade de estabelecer o protocolo mais adequado ao trabalho em questão. Entretanto, houve uma queda da atividade amilolítica expressiva no decorrer destas etapas, inviabilizando possíveis cálculos de rendimento e fator de purificação das etapas. (Dados não apresentados).

Os testes de diálise não se mostraram eficientes, visto que o caldo possui celulasas que possivelmente danificaram a membrana de diálise que é de celulose, e por esta razão boa parte das enzimas amilolíticas foram perdidas no filtrado. Resultados mostrados por Escaramboni (2014) determinaram atividade celulolítica neste tipo de extrato enzimático.

Estudos encontrados na literatura demonstram que enzimas produzidas a partir da FES demandam mais etapas e recursos para alcançar altos índices de purificação. No presente trabalho, não foi possível alcançar 100% de purificação do extrato bruto inicial, provavelmente também pela presença de duas ou mais amilases. Para obter um estudo melhor detalhado de quantas amilases

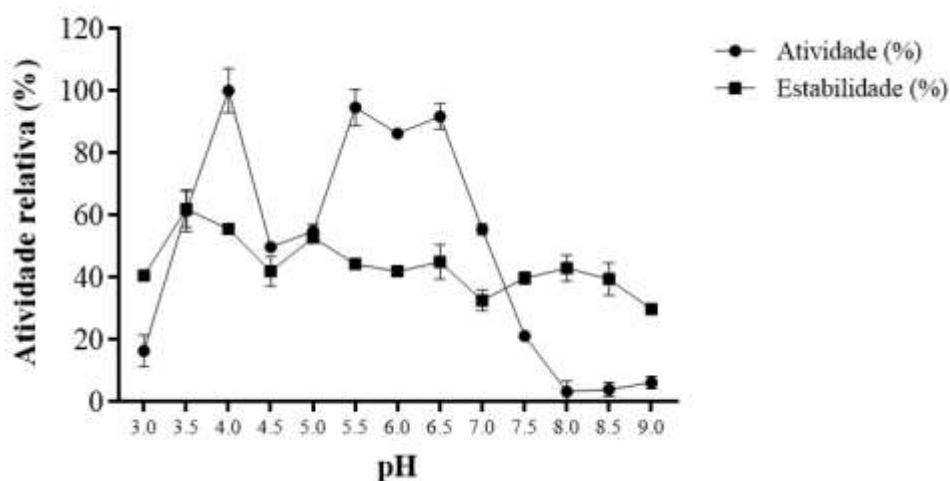


estão presentes no extrato e quais são suas características individuais, novos e diferentes testes devem ser feitos futuramente.

### 5.3 Caracterização bioquímica do extrato enzimático parcialmente purificado

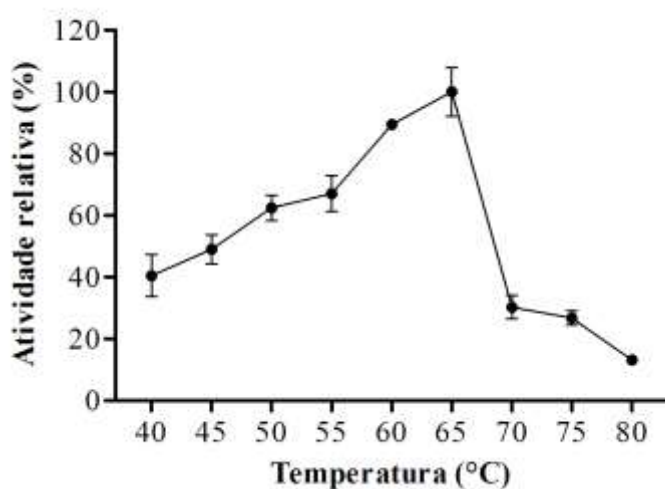
O ensaio preliminar realizado para a caracterização bioquímica do extrato enzimático parcialmente purificado foi a faixa de pH ótimo para a atividade enzimática. Verificou-se que as regiões ótimas foram as de pH 4,0 e pH 5,5 a 6,6 (Figura 5). O fato de apresentar mais de uma faixa de pH ótimo pode ser indicação de que mais de uma enzima amilolítica estava presente no extrato corroborando os resultados da Figura 4. A caracterização bioquímica foi feita com o pH 5,5. As amilases acidófilas são usadas nas indústrias, principalmente de amido, onde o pH natural da suspensão de amido é geralmente em torno de 4,5 (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006; GOYAL et al., 2005; SARIKAYA et al., 2000).

O teste de estabilidade frente a diferentes pHs mostrou que essa amilase apresenta estabilidade elevada, principalmente do pH 3,5 até o pH 8,5. No pH 3,5 foi encontrada cerca de 40 a 60% de atividade relativa mantendo a estabilidade, chegando a aproximadamente 50% no pH 8,5, como apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Ensaio para determinação da melhor faixa de pH para atividade enzimática e estabilidade frente a diferentes pHs. (-●-) pH ótimo e (-■-) estabilidade.

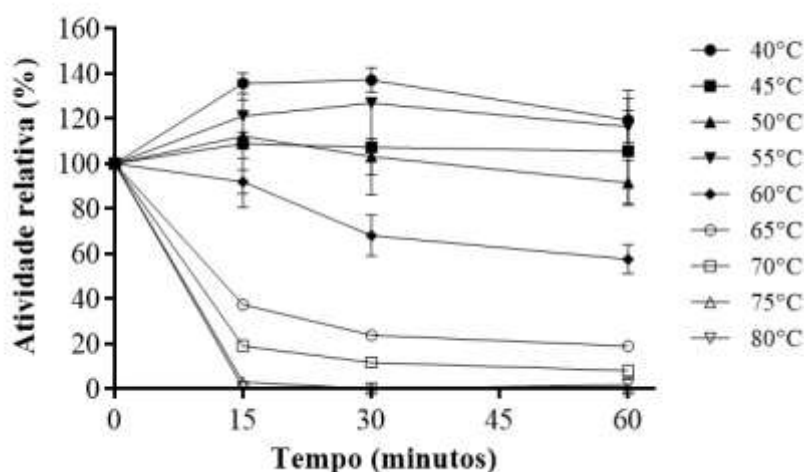
O presente estudo mostrou que a temperatura ótima para a reação enzimática foi de 65 °C. Entretanto, a faixa utilizada em todos os experimentos foi de 60 °C, o que permite uma segurança térmica para a enzima em questão, como mostra a Figura 6. Estes resultados concordam com a temperatura ótima encontrada por Freitas et al. (2014) nos ensaios feitos com o extrato bruto.



**Figura 6.** Temperatura ótima de atividade enzimática da amilase produzida por *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato em pH 5,5.

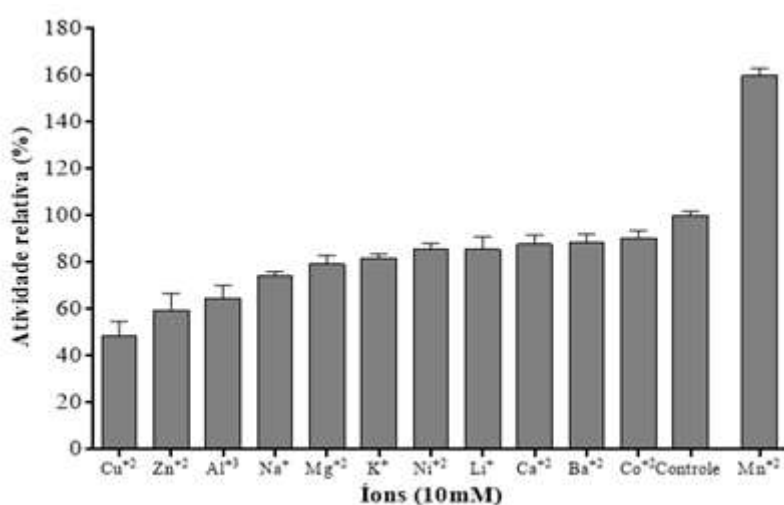
As amilases termoestáveis são alvo de grande interesse (SARIKAYA et al., 2000; BANERJEE et al., 1999). São inúmeras suas vantagens nas indústrias, dentre as quais podemos salientar a diminuição do risco de contaminação e custos de resfriamento externo, melhor solubilidade dos substratos, bem como uma menor viscosidade (LIN et al., 1998). De acordo com a Figura 7 este tipo de enzimas foi encontrado no presente trabalho, pois foi comprovada uma termoestabilidade muito significativa com índices de atividade enzimática em temperaturas variadas. O destaque está na temperatura de 60 °C que permite 100% da atividade enzimática no intervalo de tempo de 15 min. A atividade cai para cerca de 80% após 30 min e foi decaindo ao passar do tempo.

A(s) amilase(s) em questão não permitiu uma atividade ótima em temperaturas acima de 60 °C, preferindo temperaturas abaixo deste valor (Figura 7). Este resultado de termoestabilidade concorda com a utilização da temperatura de 60 °C como ótima para a realização dos experimentos.



**Figura 7.** Estabilidade de temperatura em atividade enzimática da amilase produzida por *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

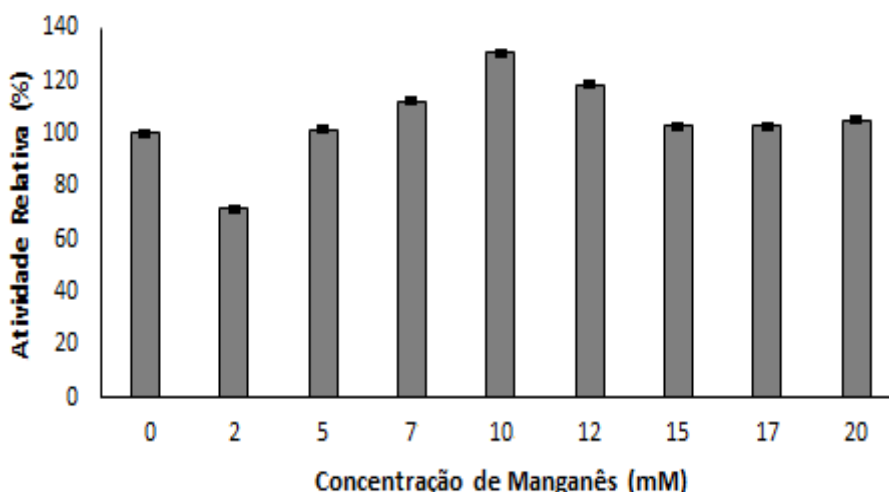
Um estudo sobre o efeito de inibição ou de potencialização da reação enzimática por diferentes íons na concentração de 10 mM foi realizado, como mostra a Figura 8. O íon  $Mn^{+2}$  potencializou cerca de 60% a reação enzimática, enquanto o íon  $Cu^{+2}$  inibiu cerca de 50% a ação da enzima. Estudos apontam que para diferentes tipos de micro-organismos e meios de fermentação, os íons podem agir de formas variadas. As conclusões de Nguyen et al. (2002) corroboram os resultados deste experimento quanto a inibição da atividade amilolítica causada pelo íon  $Zn^{+2}$ , bem como, por outro lado a potencialização causada pelos íons  $Mn^{+2}$  quando adicionados ao meio de reação.



**Figura 8.** Efeito de íons na atividade enzimática da amilase produzida por *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

A importância de alguns íons na estabilidade das enzimas deve ser ressaltada. Ainda que o cálcio não tenha exercido efeito estimulante na atividade das amilases no presente trabalho, o efeito deste íon sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase foi investigado por Ronaszek et al. (2000), e os resultados mostraram quase 100% de aumento na atividade da enzima quando 75 mM do íon foi acrescentado ao meio de reação. Na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo, as amilases são mais termoestáveis do que na ausência dos mesmos (GUPTA et al., 2003). Prakash e Jaiswal (2010) sugerem que o papel do íon cálcio seria principalmente estrutural, visto que é situado longe do sítio ativo, não participando diretamente da catálise.

Por outro lado, devido a potencialização da atividade pela presença de íons manganês, um novo estudo com variações nas concentrações deste íon foi realizado (Figura 9).

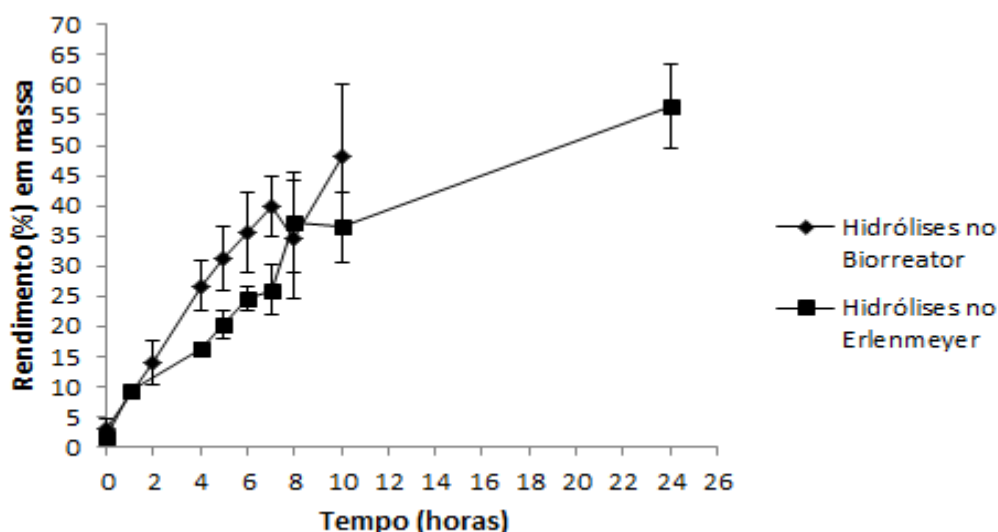


**Figura 9.** Efeito do manganês em diferentes concentrações aplicadas à reação enzimática da amilase produzida por *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

De acordo com os resultados apresentados pela Figura 9, a melhor concentração do íon manganês para potencialização da reação amilolítica foi de 10 mM, confirmando o teste anterior. As demais concentrações não atingiram um resultado tão expressivo. A literatura destaca o íon manganês como um co fator enzimático que pode inibir ou induzir a atividade enzimática dependendo da presença de outros componentes e de suas concentrações (BASSO et al., 1996).

#### 5.4 Sacarificação de substratos amiláceos para produção de xarope de glicose

Para produção do xarope de glicose foram testados diferentes substratos e a sacarificação se deu mediante o uso do extrato enzimático bruto. A Figura 10 mostra os rendimentos médios de cada tipo ensaio, de acordo com o tempo de sacarificação que variou de 10 a 24 horas.



**Figura 10.** Experimentos de sacarificação utilizando quirera de arroz como substrato. Rendimento (%) em massa de açúcar nos tempos de 0 a 24 horas de hidrólise.

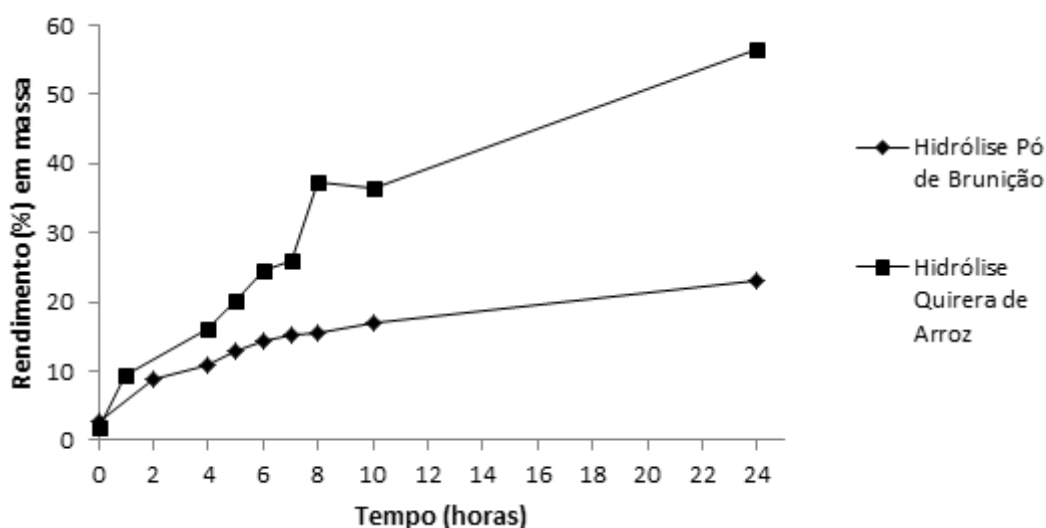
A conversão do amido em açúcar redutor com rendimento em torno de 45% foi possível a partir de 6 h de reação como mostra a Figura 10. A aplicação de amilases produzidas por *R. oligosporus* para produção de glicose é explicada por Freitas et al. (2014) pelo rendimento elevado de glicose e a qualidade do produto, sem a presença de outros açúcares, uma vez que alcançaram 96% de conversão do amido solúvel puro em glicose em 7 h. Neste trabalho o amido proveniente da quirera de arroz foi utilizado.

A sacarificação de diferentes tipos de amido pela isoamilase de *Rhizopus oryzae* PRT MTCC 9642 foram realizadas (GHOSH E RAY, 2010). Um percentual máximo de 43% de sacarificação após 1 hora de incubação utilizando 1% de amido de batata foi observado. Liu e Xu (2008) testaram a capacidade de digestão de amido cru por  $\alpha$ -amilase a partir de *Bacillus sp.* YX-1. Estes autores constataram que a taxa de degradação de grânulos de batata, trigo e milho preparados com concentração de 1% foram, respectivamente, de 45,1%, 53%, 57,5% em 8 horas de hidrólise e de 48,6%, 56,4% e 63,2% em 12 horas. A hidrólise de amido granular foi estudada por Nagasaka et al. (1998) em diversas fontes a 40 °C, a partir de glucoamilase purificada de *Corticium rolfsii* tendo

sido obtido bom desempenho (entre 65% e 90% de hidrólise) para milho e arroz em 24 h, respectivamente.

Outro dado importante avaliado através da Figura 10 foi o rendimento obtido nos ensaios levando-se em conta os volumes e os tipos de agitação durante a sacarificação. Foram feitas alterações no volume e na forma de agitação dos ensaios. A agitação mecânica, de maior volume, e a manual, de menor volume, não influenciaram os rendimentos que foram semelhantes principalmente após 6 h de incubação das amostras, com destaque para a maior eficiência de 59,4% em massa obtido após 10 horas. É possível determinar que após esse período, o aumento da porcentagem de glicose no meio não foi expressivo.

A comparação entre os diferentes substratos, quirera de arroz e pó de brunição do arroz e seus respectivos rendimentos são mostrados na Figura 11.



**Figura 11.** Influência da quirera e do pó de brunição do arroz na sacarificação enzimática. Comparação entre o rendimento (%) em massa de açúcar nos tempos de 0 a 24 horas de hidrólise utilizando estes substratos amiláceos.

De acordo com o gráfico é possível perceber que apesar da metodologia empregada ter sido a mesma para ambos os substratos, a hidrólise da quirera de arroz manteve índices mais elevados de rendimento em todos os tempos de reação. Em 10 horas de hidrólise foi possível obter um rendimento de aproximadamente 38% com quirera de arroz, enquanto apenas 17% de rendimento para o pó de brunição. Em 24 h de experimento o aumento do rendimento é evidentemente maior quando analisamos os resultados do primeiro substrato (56,5%) em relação ao segundo (23,1%).

## 5.5 Fermentação alcoólica e produção de etanol

### 5.5.1 Crescimento e viabilidade celular

O processo de fermentação alcoólica teve duração total de 24 horas. Após as alimentações assépticas do meio com mosto e obtenção do volume total de 160 mL, foram retiradas alíquotas com 10 h de fermentação para o cálculo do número de células de levedura (Tabela 4) e da sua viabilidade celular (Tabela 5).

**Tabela 4.** Número de células de leveduras em 10 horas de fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

| Amostras   | nº de células/mL   |
|------------|--------------------|
| M-26       | $9,14 \times 10^7$ |
| Fleishmann | $51,6 \times 10^7$ |

Apesar de ter sido padronizada a massa úmida de fermento em 12% inicialmente, houve uma diferença do número de células das duas linhagens de leveduras utilizadas, no caso o Fleishmann apresentou maior número em 10 horas de fermentação, provavelmente pela maior concentração do fermento no início do processo, porém ambas apresentaram concentração próxima ou superior a  $1 \times 10^8$  células por mL.

A taxa de viabilidade celular, também em 10 h de fermentação alcoólica, foi similar, por volta de 94%, o que sugere que não houve inibição do mosto formulado com a quirera de arroz hidrolisada e concentrada (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índice de viabilidade celular (%) de *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

| Amostras   | Viabilidade celular (%) |
|------------|-------------------------|
| M-26       | 94,5                    |
| Fleishmann | 94,4                    |

### 5.5.2 Análises do consumo de açúcares redutores e produção de etanol

Mediante a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as amostras de açúcares utilizados para este estudo foram analisadas e detectou-se uma concentração significativa de glicose, como era esperado, com taxa de 9,4% na quirera de arroz hidrolisada e concentrada. Níveis próximos a 0,3% de xilose foram encontrados no tempo 0, após 12 h de fermentação já não havia mais disponibilidade significativa de nenhum destes açúcares. Já na amostra frente ao padrão de arabinose não foi encontrada em nenhuma das etapas do processo (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de açúcares durante o processo de fermentação alcoólica utilizando *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

| Amostras   | Tempo de Reação (h) | °Brix (%) | CLAE        |            |               |
|------------|---------------------|-----------|-------------|------------|---------------|
|            |                     |           | Glicose (%) | Xilose (%) | Arabinose (%) |
| Mosto      | 0                   | 15,8      | 9,4         | 0,3        | 0             |
| M-26       | 12                  | -         | 0,020       | 0,010      | 0             |
|            | 24                  | 7,13      | 0           | 0          | 0             |
| Fleishmann | 12                  | -         | 0,022       | 0,017      | 0             |
|            | 24                  | 7         | 0           | 0          | 0             |

Obs. (-) valores não analisados.

Para análises comparativas a leitura em escala de °Brix foi utilizada como parâmetro nos tempos 0 e 24 horas de fermentação alcoólica. Foram obtidas porcentagens de sólidos solúveis de 15,8 e 7 °Brix, respectivamente. A diferença entre esta leitura e os resultados obtidos por técnica cromatográfica são explicados devido à precisão de cada tipo de equipamento utilizado, bem como o fato de que dentre os sólidos solúveis contabilizados, pois nem todo o material era composto de monossacarídeos. A diferença de 6,4% entre o °Brix e a porcentagem de glicose por CLAE pode ser explicada pela presença de proteínas e outros componentes da quirera de arroz.

Componentes que não são convertidos em glicose podem ser lidos como sólidos solúveis pelo método de leitura em refratômetro, dessa forma justifica-se a presença de 7% (°Brix) após 24 horas de fermentação.

A produção de etanol foi de 43,9 e 45,7 g/L nas linhagens de M-26 e Fleishmann. A Tabela 7 também mostra que em 12 h esse índice foi muito pouco inferior, demonstrando que 12 h



de fermentação alcoólica foi tempo suficiente para degradar quase totalmente a glicose disponível no meio e convertê-la em etanol.

**Tabela 7.** Produção de etanol (g/L) durante o processo de fermentação alcoólica utilizando *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

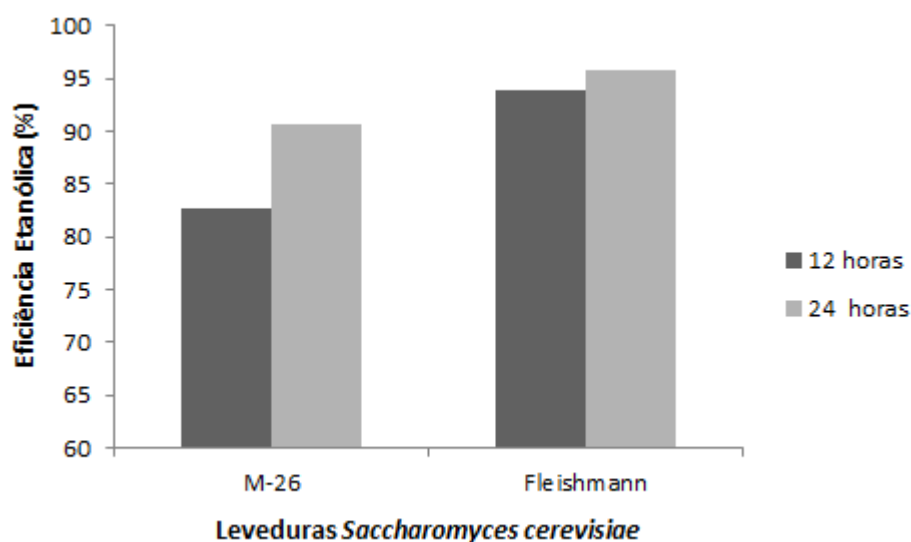
| Tempo de fermentação<br>alcoólica (horas) | Produção de etanol (g/L) |            |
|-------------------------------------------|--------------------------|------------|
|                                           | M-26                     | Fleishmann |
| 0                                         | 15,7                     | 15,7       |
| 12                                        | 41                       | 45         |
| 24                                        | 43,9                     | 45,7       |

Os resultados obtidos no sistema de produção empregado neste estudo corroboram os alcançados por Ülgen et al. (2002), que utilizando cepa de *S. cerevisiae* YPG/AB a qual expressa  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* e glucoamilase de *Aspergillus awamori*, obtiveram produção e etanol de 47,5 g/L em sistema descontínuo.

### 5.5.3 Eficiência e produtividade etanólica

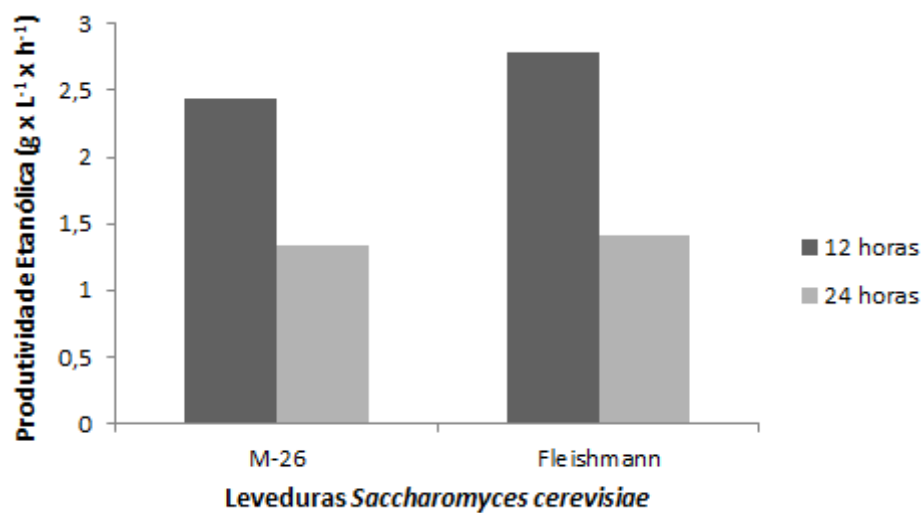
A realização da fermentação com 12 h utilizando *S. cerevisiae* M-26 resultou em 82,6% de eficiência alcoólica enquanto a linhagem *S. cerevisiae* Fleishmann foi encontrado valor inferior 93,8%. Os mesmos organismos, em 24 h de produção de etanol alcançaram 90,7% e 95,8%, respectivamente. Estes resultados evidenciam o potencial da metodologia utilizada para obtenção do xarope de glicose com eficiência etanólica elevada (Figura 12). A partir do método em escala laboratorial adotado nesse trabalho, foi possível a junção do baixo custo e alta produtividade em apenas 12 horas, utilizando apenas uma enzima, superando os padrões encontrados na indústria onde o tempo de hidrólise é de 24 horas e são empregadas duas enzimas para obtenção do produto final.

A eficiência de conversão em etanol na indústria, calculada tendo como referência o rendimento de 51,1%, chega de 90 a 93%, principalmente, devido ao crescimento celular e à produção de produtos finais de metabolismo secundário (INGLEDEW, 1999).



**Figura 12.** Eficiência etanólica (%) em 12 e 24 horas de fermentação por *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

A maior produtividade alcoólica foi verificada em 12 horas e para a linhagem Fleishmann ( $2,78 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ). No tempo de 24 h houve queda para as duas linhagens (Figura 13). Isso demonstra que, juntamente com os dados de açúcares e etanol produzidos, a maior atividade fermentativa ocorreu em 12 horas. Estes resultados são inferiores aos produzidos pela fermentação alcoólica industrial com melaço e/ou caldo de cana que tem eficiência etanólica por volta de 95% e a produtividade em torno de  $5 \text{ a } 7 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  (ROGERS et al., 1982). Segundo Viegas (2002), quando o melaço de cana é utilizado como matéria prima a eficiência é de 87% e a produtividade de etanol de  $7,9 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ . Porém, é provável que a produtividade etanólica via amido de quirera possa ser aumentada se uma maior concentração de glicose for obtida, tendo em vista que não houve qualquer inibição das leveduras com as concentrações utilizadas e a elevada viabilidade celular obtida em 12 h.



**Figura 13.** Produtividade etanólica ( $\text{g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) em 12 e 24 horas de fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* M-26 e Fleishmann.

## 6. CONCLUSÃO

- No presente estudo foi aplicado com sucesso o processo de fermentação em estado sólido para o cultivo do fungo *Rhizopus oligosporus*, utilizando-se farelo de trigo como substrato, para produção de amilases. O extrato bruto obteve 39,8 U/mL o que equivale a 358 U/g de substrato.
- A pré purificação parcial do extrato enzimático bruto ofereceu as condições necessárias para que o extrato enzimático, nesse momento com grau de pureza maior, fosse empregado em etapas subsequentes de purificação que devem ser melhor estudadas e, novos protocolos e metodologias devem ser testados futuramente para que a purificação obtenha 100% de efetividade e dados relevantes como o rendimento e o índice de purificação obtido em cada etapa sejam incluídos.
- De acordo com a caracterização bioquímica do extrato parcialmente purificado ficou demonstrado uma faixa ótima de atividade amilolítica no pH 4,0 e pH 5,5 até 6,5, indicando as condições ácidas como as melhores para hidrólise. A estabilidade da enzima ao pH foi ampla variando do pH 3,5 ao pH 8,5, com cerca de 60 % de atividade relativa. A melhor combinação entre temperatura ótima e termoestabilidade indicou uma temperatura 60°C para uso em reações enzimáticas. Os íons  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+2}$  e  $\text{Na}^{+2}$  foram inibidores da atividade. O íon  $\text{Mn}^{+2}$  destacou-se por potencializar em cerca de 60 % a atividade enzimática em concentração específica.
- Os ensaios de sacarificação a partir do extrato enzimático bruto, utilizando a quirera de arroz como substrato se mostraram eficientes tendo em vista que houve uma produção máxima de 594 kg de glicose por tonelada de quirera. Este substrato após concentração demonstrou ótima capacidade fermentativa para *S. cerevisiae* obtendo-se eficiência alcoólica compatível com os padrões para a cana-de-açúcar e/ou melaço.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, C.L. **Avaliação de uma população de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas**. Dissertação (Mestrado). I.Q. UNESP-Araraquara, 1997.
- ADITIVOS & INGREDIENTES. **Amidos: Fontes, Estruturas e Propriedades Funcionais**. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/124.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/124.pdf)>. Acesso em 10 de outubro de 2014.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3. ed. Darmstadt: **Wiley-vch**. 516p. 2007.
- ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terrus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 2, p. 144-146, 1991.
- ALMEIDA, J.R. **Álcool e destilaria**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Nathanael dos Santos. Mimeografado. 333p. 1940.
- ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA J.; CHIU, Y.Y.; VYSHALL, P; SHRUTI, M. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp*. JGI 12 in solid state culture. **Afr J Biotechnol**; 6(5):576-81. 2007.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado). ESALQ. Piracicaba, pgs.199. 1994.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.B.; PATEL, K.C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.
- ANTRANIKIAN, G.; RUDIGER, A.; CANGANELLA, F.; KLINGEBERG, M; SUNNA, A. Biodegradation of polymers at temperatures up 130-degrees-C. **J. Macromol. Sc. Pure and Appl. Chem.**, v. 32, p. 661-669, 1995.
- APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 222-231, 2014.
- AQUINO, A.C.M.M., JORGE, J.A., TERENCE, H.F., POLIZELI, M.L.T.M. Thermostable Glucose-Tolerant Glucoamylase Produced by the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiologica**, v. 46, p. 11-16, 2001.
- BABU, K.R.; SATYANARAYANA, T.  $\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. 30:305-309. 1995.

- BAJPAI, P.; BAJPAI, P. High-temperature alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, n. 1, p. 72-78, 1989.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo-E-1,4- xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BALLESTEROS, I.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 187-192, 2002.
- BANERJEE, U.C.; SANI, R.K.; AZMI, W.; SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**. 35:213-219. 1999.
- BARBOSA, M.F.S.; YOMANO, L.P.; INGRAM, L.O. Cloning, sequencing and expression of stress genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*: the groESL operon. **Gene**, v. 94, p. 51-57, 1994.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.
- BASSINELLO, P.Z.; CASTRO, E.M. Arroz como alimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.25, n.222, p.101-8, 2004.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Processos de produção de álcool – Controle e monitoramento**, 2ª ed. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ – USP. Piracicaba, 1996.
- BAUMER, J.D.; DIEGO, S.M.M. **Enzimas**. Estágio em docência (Pós Graduação em Engenharia Química) – UFSC. Florianópolis, 2008. Disponível em: <[www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/apostilas/Apostila\\_enzimas\\_ja\\_si.pdf](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/apostilas/Apostila_enzimas_ja_si.pdf)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.
- BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p. 83-88, 2005.
- BHELLA, R.S. e ALTOSAAR, I. Purification and some properties of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, 2012/01/10, p.149-153. 1985.
- BLUM, H., BEIER, H. and GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8, 93-99. 1987.

BOCCHINI, D.A. et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.

BÖHMER, U.; FRÖMMEL, S.; BLEY T.; MÜLLER, M.; FRANKENFELD, K.; MIETHE, P. Solid-state fermentation of lignocellulotic materials for the production of enzymes by the white-rot fungus *Trametes hirsuta* in a modular bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, v.11, p. 395-401, 2011.

BORGIO, J.F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.

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

BRENDA Database: **The Comprehensive Enzyme Information System**. 2013. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2015.

BROWN, A. Fermentation- a practical approach. In: Abud, C.L. **Avaliação de uma população de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas**. Dissertação (Mestrado). I.Q. UNESP-Araraquara, 1997.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1397-1403, 2003.

CAMACHO, I.A.O. **Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para produção de bioetanol e sua utilização na alimentação de aves**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Universidade Estadual Paulista, 62 p. Botucatu, 2009.

CARVALHO J.L.V.; BASSINELLO P.Z.; Aproveitamento industrial. En: Santos AB, Stone LF, Vieira NRA. **A cultura do arroz no Brasil 2ª ed**. Santo Antônio da Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. p. 1007-42. 2006.

CARVALHO, R.V. et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(2): 380-386, abr.-jun. 2008.

CARVALHO, W.T.; REIS, R.C.; VELASCO, P.; SOARES JUNIOR, M.S.; BASSINELLO, P.Z.; CALIARI, M. Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 422-429, 2011.

CASTRO, A.M.; CARVALHO, D.F.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2010.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Propriedades gerais do amido. São Paulo: **Fundação Cargill**. V.1, cap. 6, p. 530-575. (Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas). 2003.

CHEN, H. **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer, 2013.

CINELLI, B.A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial/** Bernardo Alves Cinelli. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Sugars 1 - Codex Stan 212** - 1999. Disponível em: <[www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)>. Acesso em 11 de fevereiro de 2015.

COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **Eur J Clin Nutr**; 46(2 Suppl): S17-S32. 1992.

COPOLLA, F. et al. Sustainability of bioethanol production from wheat with recycled residues as evaluated by Emergy assessment. **Biomass and bioenergy** 33 1626-1642. 2009.

CORONADO, M.J.; VARGAS, C.; HOFEMEISTER, J.; VENTOSA, A.; NIETO, J. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**. 183:67-71. 2000.

COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 203 p. 1996.

CRABTREE, H.G. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. **The Biochemical journal**, v.22, n.5, p.1289-98. 1928.

CRUZ, E.A.; MELO, M.C; SANTANA, N.B, et al. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* I em resíduo de cascas de mandioca. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**; 13(4):245-9. 2011.

CYSEWSKI, G.R. e WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnol. and Bioeng.** v. 20, p.1421-1430, 1978.

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



DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

DEMIRKAN, E.S. et al.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2629-2636, 2005.

DJEKRIF-DAKHOUCHE, S. et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 2, p.190-197, 2006.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P. de; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N. e NAGASHIMA, A.I. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22, 177-182, 2006.

EIJSSINK, V.G.H., VAAJE-KOLSTAD, G., VARUM, K.M., HORN, S.J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends Biotechnol** 26: 228-235. 2008.

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

EMBRAPA. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. Embrapa Clima Temperado, 2005. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap01.htm>> Acesso em 10 de novembro de 2014.

ESCARAMBONI, B. **Produção de Amilases pelo cultivo em estado sólido de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro/SP, 2014.

ESCARAMBONI, B., inventor; OLIVA-NETO, P., inventor; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” UNESP, cessionário. **Processo para obtenção de xarope de glicose via hidrólise por extrato amilolítico**. Brasil, BR 10 2014 031591-8. 17 de Dezembro de 2014.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C., MAÑAS, E., GARCÍA-DÍAZ, L.; SAURA- CALIXTO, F. Resistant starch formation: A standardization of a high-pressure autoclave process. **J Agric Food Chem**; 44:924-28. 1996.

EXPASY. ProtParam tool. SIB **Bioinformatics Resource**. Portal Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>> Acesso em: 30 de janeiro de 2015. Swiss Institute of Bioinformatics. 2012.

FADEL, J.; NEWMAN, C.W.; NEWMAN, R.K. et al. Effects of extrusion cooking of barley on ileal and fecal digestibilities of dietary components in pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, p. 891-897, 1988.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 602p. 2006.

FERREIRA, S.M.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M.S.; BELEIA, A.P. Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 383-390, 2013.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; REZENDE, J.L.; GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 344-352, 2008.

FREITAS, A.C. **Desenvolvimento de Novas Tecnologias para Produção de Xarope de Glicose a partir de Amido**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro/SP, 2012.

FREITAS, A.C.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA, V.M.G.; OLIVA-NETO, P. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. **Chemical Papers**, v. 68, p. 442-450, 2014.

FURLONG, E. B.; CACCIAMANI, J. L. M.; BUFFON, J. G. Fermentação fúngica: enriquecimento protéico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B1 e ocratoxina A. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 233-239, 2007.

GHOSH, B.; RAY, R. R. Saccharification of raw native starches by extracellular isoamylase of *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology**, v. 9, p. 224-228, 2010.

GONZÁLEZ, J.B. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry** 47 175–185. 2012.

GOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 2, p. 162-169, 1991.

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

GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP, 2007.

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

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

HAQ, I. et al. Pearl millet, a source of alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 10, p. 1201-1204, 2005.

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

HASHEM, M.; DARWISH, S.M.I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass & Bioenergy**, Saudi Arabia, p. 953-959. 2010.

HASHEMI, M. et al. Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus sp.* KR-8104  $\alpha$ -amylase at different pH and Temperature. **Industrial Crops and Products**. Elsevier. 43 661– 667. 2013.

HASHEMI, M. et al. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 110 No. 3, 333–337, 2010.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n.3, p.253-267. 2001.

HOUSTON, D.F. Rice – Chemistry and technology. St. Paul: **American Association of Cereal Chemists**. p. 113-115. 1972.

HUBER, K.C.; MCDONALD, A.; BeMILLER, J.N. Carbohydrate Chemistry. In: HUI, Y. H. (Ed.). Handbook of food science, technology, and engineering: Carbohydrate Chemistry. Boca Raton: **CRC Press**, cap.1, p. 1-23. (Food Science and Technology). 2005.

INGLEDEW, W.M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. 1999.

INGLEDEW, W.M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: how does the technology affect yeast. 2003. In: BAYROCK, D.P. E INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*- contaminated continuous, and batch fermentations. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p. 83-88, 2005.

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

JIN, B.; YAN, X.Q.; YU, Q.; VAN LEEUWEN, J.H. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p.179-189, 2002.

JIN, F.; LI, Y.; ZHANG, C.; YU, H. Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain. **Process Biochemistry**. 36:559-564. 2001.

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

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular nonsporing Gram positive Rods. In: SNEATH et al. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. **Willians e Wilkens**, v.2, p. 1208-1234, 1986.

KANDRA, L.  $\alpha$ -amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, v. 666-667, p. 487- 498, 2003.

KIELING, D.D. **Enzimas: aspectos gerais**. Disciplina de Engenharia Bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2002.

KILIKIAN, B.V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. *Revista de Microbiologia*, v. 27, n. 2, p. 137-141, 1996.

KNAUF, M.; KRAUS, K. Specific yeasts developed for modern ethanol production. **Sugar Industry**, v. 131, p. 753-758. 2006.

KOBAYASHI, F. et al. Sacharification and alcohol fermentation in starch solution of stream-explodet potato. **Appl. Bioch. Biotechnol.**, v. 69, p. 177-189, 1998.

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

KOOMEN, I.; McGRATH, S.P. & GILLER, I. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. **Soil Biol. Biochem.**, 22:871-873. 1990.

KRISHNA, S.H.; REDDY, T.J.; CHOWDARY, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 193-196, 2001.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124-128, 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**.227:680-685, 1970.

LEE, S.S.; TOBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LEONEL, M. O farelo, subproduto da extração da fécula de mandioca. In: Cereda, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

LIMA, U.A. de; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. de. **Produção de etanol. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos** (vol.3). São Paulo – SP. Editora EdgardBlucher, 1ª edição, cap-1:1-43. 2001.

LIMBERGER, V.M. **Modificação física e química do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos**. Dissertação (Mestrado). Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

LIMBERGER. V.M.; COMARELA, C.G.; PATIAS, L.D.; EMANUELLI, T.; BRUM, F.B.; SILVA, L.P.; Produção de extrusado de quirera de arroz para uso na indústria de alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.9, p.2590-2594, dez, 2009

LIN, L.L.; CHYAU, C.C.; HSU, W.H. Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 28:61-68. 1998.

LIU, Q.; DONNER, E.; TARN, R.; SINGH, J; CHUNG, H. J. Advanced Analytical Techniques to Evaluate the Quality of Potato and Potato Starch. In: SINGH, J.; KAUR, L. (Ed.). *Advances in Potato Chemistry and Technology*. New York: **Elvesier**, Cap. 8, p. 221-248. 2009.

LIU, X. D.; XU, Y. A novel raw starch digesting  $\alpha$ - amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4315-4320, 2008.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**. Vol. 16, n. 2. Campinas April/June, 2003.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Nutrition and metabolism. **Brock biology of microbiology**. 9th ed. NJ: Prentice-Hall. 2000.

MARKET RESEARCH NEWS. In: Report - **Global Industrial Enzymes Market: An Analysis**. 2011.

MARTÍN, C.; GALVE, M.; FREDRIK WAHLBOM, C.; HAGERDAL, B.H.; JONSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xilose – utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MATSUI, K.N. **Desenvolvimento de materiais de biodegradáveis a partir do bagaço de mandioca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos - Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. 87 p. Florianópolis. 2002.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Arroz**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em 10 de novembro de 2014.

MISZKIEWICZ, H.; BIZUKOJC, M.; ROZWANDOWICZ, A.; BIELECKI, S. Physiological Properties and Enzymatic Activities of *Rhizopus oligosporus* in Solid State Fermentations. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.7, 2004. Disponível em <<http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue1/biotechnology/art-03.html>>. Acesso em 13 de dezembro de 2014.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A.H.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217–1224, 2006.

MOORE, G.R.P.; DO CANTO, L.R.; AMANTE, E.R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. **Química nova**, v. 28, n.4, p. 596-600, 2005.

MOREAU, R.A.; POWELL, M.J.; FETT, W.F.; WHITAKER, B.D. The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. **Current Microbiology**, v. 35, p. 124–128, 1997.

MOREIRA, F.G., LIMA, F.A., PEDRINHO, S.R.F., LENARTOVICZ, V., SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Rev Microbiol**; 30:157-62. 1999.

- MURADO, M.A.; GONZÁLEZ, M.P.; TORRADO, A.; PASTRANA, L.M. Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. **Process Biochemistry**. 32:35-42. 1997.
- MUSSATO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. **Instituto Ciência Hoje**. 41:28-33. 2007.
- MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectin Crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.
- NAGASAKA, Y., KUROSAWA, K., YOKOTA, A. e TOMITA, F. Purification and properties of the raw-starch-digesting glucoamylases from *Corticium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, n.3, p.323-330. 1998.
- NAGEL, F.J.; VAN AS, H.; TRAMPER, R.; RINZEMA, A. Water and glucose gradients in the substrate measured with NMR imaging during solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Biotechnol Bioeng**; 79:653-63. 2002.
- NAJAFI, M.F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expr. and Purif.** 41, 349-354. 2005.
- NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 91-96, 2004.
- NAZMI, A.R., REINISCH, T., HINZ, H.J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ - amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 453:16-23. 2006.
- NEGI, S. e BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v.42, n.4, p.443-448. 2009.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, 4ª ed., São Paulo: Editora Savier, 2006.
- NELSON, N.J. A photometric adaptation of the somogy method for the determination of glucose. **Biological Chemistry**, (S.I.), v. 153, p. 375-379, Feb. 1944.
- NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enz. Microbial Tecnol.** v. 31, p. 345-352, 2002.
- NIBA, L. In: HUI, Y.H. (Ed.). Handbook of food science, technology, and engineering: Carbohydrates – Starch. Boca Raton: **CRC Press**. Cap. 1, p. 1-23. (Food Science and Technology). 2005.

NICOLETTI, A.M. **Enriquecimento nutricional de macarrão com uso de subprodutos agroindustriais de baixo custo**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria. 2007.

NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. **Biochimistry Biophysic Acta**, v. 1543, n. 2, p. 253-74, 2000.

NITZKE, J.A.; BIEDRZYCKI, A. **Terra de arroz**. Porto alegre: ICTA-UFRGS, 2007.

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

NOVOZYMES. **Enzimas e o Meio Ambiente**. Disponível em <[http://www\\_novozymes\\_com-images.htm](http://www_novozymes_com-images.htm)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos- Unicamp- Campinas, pgs.190, 1990.

OLIVA-NETO, P.; CABRAL, G.; ESCARAMBONI, B.; FREITAS, A.; CARVALHO, A.F.A. Comparação entre a produção de amilases por inoculação de *Rhizopus oryzae* por esporos e micélio em fermentação em estado sólido e submersa. **CCNExt**, Santa Maria, Brazil. 2013 (in press).

OLIVA-NETO, P.; LUDWIG, K.M.; DORTA, C.; CARVALHO, A.F.A.; SILVA, D.F. da; LIMA, V.M.G. E- Cap. “Contaminação microbiana na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante”. In *Ebook: Bioenergia: Desenvolvimento, pesquisa e inovação*. Lemos, E.G.M. e Stradiotto, N.R. (Organizadores). Cultura Acadêmica – Editora UNESP eds. ISBN: 978-85.7983.256-7. Pg. 407-488. 1069 p. 2012. Disponível em: <[http://www.culturaacademica.com.br/catalogo-detalle.asp?ctl\\_id=220](http://www.culturaacademica.com.br/catalogo-detalle.asp?ctl_id=220)>. Acesso em 10 de setembro de 2014.

OLIVEIRA, R.H.A; SUDO, J.T.C. **Estudo dos processos de sacarificação, fermentação e destilação de cascas e pontes de mandioca no processo de obtenção de aguardente**. VIII Encontro Interno. XII Seminário de Iniciação Científica. Universidade Federal de Uberlândia. 2008.

ONO, K., SHINTANI, K., SHIGETA, S. e OKA, S. Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. **Agricultural and Biological Chemistry** v.57, n.7, p.1699-1706. 1988.

ORTIZ, S. **Produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado). Blumenau, Universidade Regional de Blumenau. 2010.

OSMAN, Y.A.; INGRAM, L.O. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. **Journal of Bacteriology**, v. 164, p. 173–80, 1985.



OWSLEY, W.F. KNABE, D.A.; TANKSLEY Jr, T.D. Effect of sorghum particle size on digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 557-566, 1981.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760 p. 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13 81–84. 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 329-334, 2008.

PELCZAR, M. REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. Vol. 1, 1ª Ed. São Paulo: Ed. Makron books, 1981.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri: **Manole**, p. 1-196. 2005.

PINTO, M.P. **Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica), Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

PRAKASH, O. e JAISWAL, N.  $\alpha$ -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.8, p.2401-2414. 2010.

PRIMO-YÚFERA, E.; GIL-TORTOSA, C.I.; GARCÍA-BREIJO, F.J. Hydrolysis of corn-cob lignocellulosic residue from pentose preparation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 52, p 1-4, 1995.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization, **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 211-221, 2014.

QUAGLIA, G. Ciencia y Tecnologia de la Panificación. Zaragoza: **Editorial Acribia**, 485 p. 1991.

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

RAJOKA, M.I. et al. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamilase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Appl. Microbiol.**, v. 39, p. 13-18, 2004.

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A.K., NAMPOOTHIRI, K.M., CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R. e PANDEY, A. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.309-317. 2004.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 235-244, 2004.

RAUPP, D.S.; MARQUES, S.H.P.; ROSA, D.A.; CALDI, C.M.; CREMASCO, A.C.V.; BANZATTO, D.A. Arraste via fecal de nutrientes da ingestão produzido por bagaço de mandioca hidrolisado. **Sei. Agri. (Piracicaba, Bz)**, v. 59, n.2, p. 1-14, Piracicaba, 2002.

RAY, R.C. Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. **Journal of Environmental Biology**, v. 25, p. 489-495, 2004.

RÉCZEY, K.; KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial waste for the production of etanol. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 103-110, 2004.

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

REGULY, J.C. Biotecnologia dos processos fermentativos: Matérias-primas agrícolas, processos e produtos. Pelotas: **Universitária/UFPEL**. V.1. 330p. 1996.

RIAZ, M., PERVEEN, R., JAVED, M.R., NADEEM, H. e RASHID, M.H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, n.5, p.558-564. 2007.

RODRIGUES, M.I. **Modelagem, Simulação e Controle de um Processo Contínuo de Purificação de Enzimas**. (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1993.

ROGERS, P.L.; LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 23, p. 37-84, 1982.

ROMERO, F.J. et al. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 507-515, 2001.

RONASZEK, G.; NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABO, J.M.; HOSCHKE, A.; BHAT, M.K. Screening the strains of thermofilic fungus *Thermomyces lanuginosus* for amylolytic activities. **Acta Alimentaria**, v.29 (1), p.71-79, 2000.

SAITO, I.M.; CABELLO C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia na Agricultura**, Botucatu, vol 21, n. 3, p. 34-44, 2006.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M.K.H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, 2013.

SANTANA, N.B. **Eficiência da hidrólise do amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SANTOS, M.M., ROSA, A.S.; DAL'BOIT, D.A.; KRIEGER, M.N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes. **Bioresour. Technol.** 93 261–268. 2004.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase on raw starch granules. **Process Biochemistry**. 35:711-715. 2000.

SARROUH, B., SANTOS, T.M., MIYOSHI, A., DIAS, R., AZEVEDO, V. Up-To- Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **J Bioprocess Biotechniq** S4:002 doi:10.4172/2155-9821.S4-002. 2012.

SCIPIONI, G.C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Processos, RS, 2011.

SEVERO, M.G.; MORAES, K.; RUIZ, W.A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.2, p. 345350, 2010.

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

SHARIFFA, Y.N., KARIM, A.A., FAZILAH, A. e ZAIDUL, I.S.M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.2, p.434-440. 2009.

SHINYA, T.Y. **Produção, purificação e ação antimicrobiana do extrato fúngico do *Trichosporon asahii***. São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, 94 f. (Dissertação em Microbiologia – Universidade Estadual Paulista). 2012.

SIDHU, G.S.; SHARMA, P.; CHAKRABARTI, T.; GUPTA, J.K. Strain improvement for the production of thermostable  $\alpha$ -amylase. **Enzyme and Microbial Technology**. 21:525-530. 1997.

SIGMA-ALDRICH. 2014. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2015.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J. L. R. Extrusão de quirera de arroz para uso como ingrediente alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 190-199, 2009.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.R.; PEREIRA, R.G.F.A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Alimento e Nutrição**, v.18, n.3, p. 325-330, 2007.

SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; ALENCAR, A.L.S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J.M.O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**. Vol 24, n. 4. São Paulo July/Aug, 2001.

SILVA, T.M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP – FFCLRP. Ribeirão Preto, 2009.

SINGH, D.; DAHIYA, J.S.; NIGAM, P. Simultaneous raw starch hydrolysis and ethanol fermentation by glucoamylase from *Rhizocolonia solini* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic. Microbiol.** V. 35, p. 117-121, 1995.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SINGH SODHI, N. e SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p.219-231. 2003.

SINGHANIA, R.R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 44 13–18. 2009.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173-184, 2006.

SOCCOL, C.R. et al. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230. 2005.

SOCCOL, C.R.; ILOKI, I.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. Comparative production of  $\alpha$ -amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. **Journal of Food Science and Technology**, 31, p. 320-323, 1994.

SOUTO, B.M.; QUIRINO, B.A. Metagenômica na prospecção de enzimas para etanol celulósico. Embrapa: **Imprensa** (Artigos 2010), Brasília, 17 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/a-metagenomica-na-prospeccao-de-enzimas-para-etanol-celulosico-1/>>. Acesso em 10 de setembro de 2014.

SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – A review. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.

SPADARO, J.J.; MATTHEUS, J.; WADSWORTH, J.I. Milling. In: LUH, B.S. Rice: production and utilization. Connecticut: **AVI Publishing**. p. 360-402. 1980.

SPENCER, G.L.; MEADE, G.P. Special Reagents. **Cane Sugar Handbook**, New York, Wiley, 1945.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardia* sp. Endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**. 76:137-141. 2001.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **Afr. J. Biotechnol.**, 6:430-435. 2007.

SUGANUMA, T., FUJITA, K. e KITAHARA, K. Some Distinguishable Properties between AcidStable and Neutral Types of  $\alpha$ -Amylases from Acid-Producing Koji. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.104, n.5, p.353-362. 2007.

SUN, Y.; CHENG, J. hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.83, p. 1-11, 2002.

SURMELY, R. et al. Hidrólise do Amido. **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Vol. 3, cap. 15. p. 377-395. 2003.

TAFARELLO, L.A.B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações  $\alpha$ -amilase termo-estável produzida por bactérias**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2004.

- THANONKEO, P.; SOOTSUWAN, K.; LEELAVACHARAMAS, V.; YAMADA, M. Cloning and transcriptional analysis of groES and groEL in ethanolproducing bacterium *Zymomonas mobilis* TISTR548. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 13–22, 2007.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.
- THONSEN, A.B.; THOMSEN, M.H.; VANMAARSCHALKERWEERD, C.; SKYTTE, K.; OLSEN, H.S.; CHRISTENSEN, B. BH, et al. Energy supply technologies. Bioethanol for transport. **Risø energy report**; p. 49–53. 2007.
- TOMAZIC, S.J. Protein stabilization. In: Biocatalysts for industry. **Topic in Applied chemistry**. Ed. Plenum Press, New York and London. 330p. 1991.
- TROVATI, J.; GALVÃO, C.M. e GIORDANO, R.L.C. Produção Contínua de Etanol a partir de Amido, utilizando Amiloglicosidase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em geral de Pectina. **Anais do XIV COBEQ (CD)**, Natal, 2002.
- ÜLGEN K.; Ö., SAYGILI B.; ÖNSAN Z.I.; KIRDAR B. “Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB”. **Process Biochemistry**, v.37, p.1157-1168, 2002.
- USTÁRIZ, F.J. et al. Fermentation of individual proteins for protease production by *Serratia marcescens*. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 19, n. 3, p. 147-153, 2004.
- VACLAVIK, V.A.; CHRISTIAN, E.W. Essentials of Food Science: **Starches in Food**. 3 e. Cap. 3, p. 49-67. Texas (US): Springer, 2008.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal Biotechnology**, v. 94, p. 137–155, 2002.
- VAN DIJKEN, J.P. e SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.32, n.3-4, p.199-224. 1986.
- VATTEM, D.A.; LIN, Y.-T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1939-1946, 2004.
- VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. Use of tower reactors for continuous ethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2, 17-173, 2002.
- VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial Amylolytic Enzymes. **Issue**, v. 24, p. 329-418, 1989.

VITOLO, M. Imobilização de células e enzimas. **Biotecnologia**. N. 1, p. 2, janeiro, 1988.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 745–750, 2011.

WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. **Plant Soil**, 167:189-196. 1994.

WINKLER, M.A. In Genetically-Engineered Proteins and Enzymes from Yeast: Production Control. Ed. Wiseman, A., **Ellis Horwood**, pp. 96-146. 1991.

WINKLER, M.A. In HandBook of Enzyme Biotechnology. Ed. Wiseman, A. **Ellis Horwood**, p. 9-30. 1995.

WU, J.R. et al. *Beijerinckia indica* L3 fermentation for the effective production of heteropolysaccharide-7 using the dairy by product whey as medium. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 289-292, 2006.

YANG, C.H.; LIU, W.H. Purification and properties of a maltotrioseproducing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme and Microbial Technology** 35, 254–260. 2004.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C.  $\alpha$ -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in a external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. 5:115-121. 2000.

ZANIN, G.M. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZANIN, G.M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. Tese de Doutorado, Campinas, 1989.