



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E  
BIOPROCESSOS

**EMANUELE CARDOSO DIAS**

**ANÁLISE DA SINTETIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

SUMÉ - PB  
NOVEMBRO/2015

EMANUELE CARDOSO DIAS

**ANÁLISE DA SINTETIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Michelle Rossana Ferreira Vaz**

SUMÉ - PB

2015

D541a Dias, Emanuele Cardoso.

Análise da sintetização da enzima invertase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais / Emanuele Cardoso Dias. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

88 f.

Orientador<sup>a</sup>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Rossana Ferreira Vaz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Enzima. 3. Fermentação. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

EMANUELE CARDOSO DIAS

ANÁLISE DA SINTETIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Engenharia de Biotecnologia e  
Bioprocessos do Centro de  
Desenvolvimento Científico do  
Semiárido, da Universidade Federal de  
Campina Grande, como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Biotecnologia e  
Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

Michelle Rocco Ferreira Vas

Prof. Dr. Michelle Rocco Ferreira Vas  
UATEC/CBSA/UFG  
Orientadora

Cecy Barbosa de Almeida Farias

Prof. Dr. Cecy Barbosa de Almeida Farias  
UATEC/CBSA/UFG  
Examinadora 1

Sérgio Dantas de Oliveira Jr

Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Júnior  
UFRN  
Examinador 2

Aprovado em 24 de maio de 2015.

SUMÉ - PB

*Aos meus pais, Maria das Graças Mousinho e Manoel Cardoso Dias (in memoriam), que com muito esforço e amor, me incentivaram e proporcionaram uma educação maravilhosa.*

*À minha irmã, Graciele Mousinho Dias, por acreditar e ser a minha principal inspiração.*

*Dedico.*

*11 Vidas – Lucas Lucco*

*“Me pareço tanto com você  
Olhando dá pra ver  
Seu rosto lembra o meu  
Desde o primeiro aniversário  
O primeiro passo  
Sempre pronto pra me defender*

*Sempre que brigou comigo  
Pra eu não correr perigo  
Um herói pronto pra me salvar  
E com você eu aprendi todas lições  
Eu enfrentei os meus dragões*

*E só depois me deixou voar*

*Mas eu só quero lembrar  
Que de 10 vidas, 11 eu te daria  
E foi vendo você  
Que eu aprendi a lutar  
Mas eu só quero lembrar  
Antes que meu tempo acabe  
Pra você não se esquecer  
Que se Deus me desse uma chance de viver outra vez  
Eu só queria se tivesse você*

*Pai  
Eu sei o tempo é implacável  
Afasta nossos corpos  
Mas aproxima o coração  
O seu nome sempre lembrado  
Converso e falo de você sempre na oração*

*Pai  
Foi muito chato crescer  
Passei a não ter você contando histórias para eu dormir  
Mesmo o mundo querendo me derrubar  
Ao meu lado você sempre está*

*Pra me levantar quando eu cair...”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a um ser maravilhoso, o qual me proporcionou toda a força, saúde, paciência e sabedoria necessária para o bom desempenho deste trabalho, e também por ter me dado muita força nos momentos em que ajoelhei perante os desafios vividos.

Aos meus amores, meus tesouros, meu alicerce... entre tantas palavras, não há como decifrar o amor incondicional que carrego no peito e tenho orgulho em dizer para todos que eu tenho a melhor mãe do mundo e eu tive o melhor pai do mundo. Maria das Graças Mousinho e Manoel Cardoso dias (*in memorian*), esse aqui é de vocês! O meu muito obrigado! Amo vocês.

Aos meus irmãos, que mesmo na distância, a cada reencontro, me fizeram refletir e amadurecer. Mas em especial, agradeço a Graciele Mousinho Dias, com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre. Você é o meu orgulho!

Aos meus avós paternos e principalmente os maternos, os quais tive a oportunidade de conviver e aprender que a simplicidade da vida nos ensina muita coisa e também por acreditar no amor diante da alegria e tristeza, na riqueza e na pobreza, na saúde e na doença. Aqui fica o meu muito obrigado, Seu Mané Chico e Dona Juvina!

Aos meus tios, em especial o Tio Aluísio, por tentar minimizar a falta que o meu pai faz em algumas situações. Aos primos-irmãos, que tive o prazer de conviver e compartilhar experiências essenciais. Muito obrigada Leonardo Camargo, Eduardo Soares e Camila Lionardo, entre muitos que sempre estarão em meu coração.

A Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Michelle Vaz, com quem partilhei o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho. Nossas conversas durante e para além dos grupos de estudos foram fundamentais. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial os professores: Fabiana Pimentel, Jean Queiroz, Franklin de Farias Nóbrega, Magnólia Campos, Demerson Sanglard, Cecir Almeida, Aldre Jorge, Glauciane Danusa, Ranoel Gonçalves, Rafael Maia, entre outros.

A minha cúmplice/amiga/parceira/best, Gérsia Gonçalves, vulgo “gata do batom vermelho”, que com seu jeitinho bem meigo, sua inteligência oriental e aquele ar de otimismo “forever”, me fizeram levantar diversas vezes nestes últimos cinco anos. Você é a minha irmãzinha que escolhi proteger o resto da minha vida, seja de perto ou de longe. Muito obrigada, minha amiga-irmã.

Ao queridíssimo amigo, Édipo da Silva Almeida, que participou assiduamente dos momentos felizes e tristes durante a minha estadia em Sumé e mostrou que amizade verdadeira jamais morrerá mesmo que o tempo e a distância esteja presente. Muito obrigada por tudo, Edipinho!

A lindeza da Miss prata, Analu Freitas, que também partilhou diversos momentos importantíssimos na minha formação e que jamais esquecerei. Né, “23Ni3” ? Muito obrigada pela confiança, amizade e companheirismo nesta jornada.

Ao amigo charmoso Vinícius Costa Amador, dono de uma inteligência nível hard, o Batman nas horas vagas e que me conquistou rapidamente. Obrigada por somar na minha vida de uma forma mais doce, algumas críticas construtivas e por me fazer enxergar algumas situações com outros olhos. Muito obrigada, gatão!

Aos queridos da turma de 2010.1, Eudócia Carla, Fernanda Cristina, Isabella da Rocha, José Dênis, Luiz Gustavo, Maria Lúcia, Natasha Lorena, Hemerson Viana, Ozires Talysson, Yuri Vinícius, Caroline Desireé, Tamilyes Silva, Tamara Ramos, entre outros que tomaram um rumo diferente, e também aos agregados e queridíssimos da turma Rayane Abreu, Luana Vilar, Felipe Douglas, Neto Marreiro e Leandro Costa obrigada por viverem momentos inesquecíveis dentro e fora da sala de aula.

Agradeço a Biraine Conge, por todo o carinho e atenção devotos à mim nos momentos mais difíceis e fáceis que vivi e que jamais serão esquecidos. Como a captura da Aragogue e quando você me abraçava sempre que escutava uma notícia boa. Muito obrigada por conseguir me aturar diariamente e fazer parte do meu amadurecimento pessoal. Te amo.

À Monalisa Farias, por todo o apoio e companheirismo nos dois últimos e mais decisivos anos da Engenharia. Por me fazer acreditar que era possível enfrentar de cabeça erguida os meus maiores medos, as minhas maiores angústias. Por me fazer rir, mesmo estando com raiva. Muito obrigada.

Ao meu paizão adotivo, amigo, parceiro, taxista, moto-taxista... Dodinha. Que sempre me ajudava nas horas mais difíceis e que esteve comigo desde o início. Que tem como único defeito, ser flamenguista. Obrigada por todos os ensinamentos na correria diária! Valeu, dodinha!

Aos amigos que ganhei em sumé e que tiveram/têm um papel especial na minha vida e que sentirei e já sinto saudades: Luana Mota e Sá, Amanda Barros, Geiza Mariana, Arthur Holanda, Ezequiel Sóstenes, Sílvia Maria Dantas, Thyago Dias, Aline Queiroz, Fernanda Santos, Pâmela Caroline, Darlyson Guimarães, Caroline Freitas, Élder Miguel, Luan Lima, Luana Camilla, Iracema Paiva, Alanny Larissa, Priscila Costa e tantos outros. Os meus sinceros agradecimentos.

À Jo Tonks, por sua amizade verdadeira, carinho e amor prestados ao longo desses anos. Muito obrigada por me acompanhar, aconselhar e acalmar diariamente desde 2008. Esse título não seria possível sem você. Te amo, amiga!

Aos amigos fora do meu meio acadêmico que contribuíram direto e indiretamente e também foram espelhos na minha trajetória vivida: André Aires, Renan Maravalhas, Fabíola Lopes, Flaviana Moreira, Catarine Formiga, Leonardo Lucas, Gerbeson Dantas, Ivanna Carla, Mariana Lira, Patrícia Araújo, Ivelda Souza, Taynan Araújo, Ísis Cavalcante, Clara Cartaxo, Alisson Nunes, Ewerton Thiago, entre outros. Muito obrigada!

Aos amigos que conquistei nos laboratórios visitados durante os estágios acadêmicos e por disponibilizarem o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada ao pessoal da Universidade Federal de Viçosa - MG, Universidade Federal da Paraíba - PB, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - RN e da Universidade Federal de Campina Grande - PB.

Registro aqui os meus sinceros votos de agradecimento para todas as pessoas que em algum momento, ajudaram o mínimo possível para que eu possa estar aqui. Muito obrigada, de coração.

## RESUMO

A enzima invertase pode ser conhecida como  $\beta$ -D frutofuranosidase e, por conseguinte uma hidrolase que pode ser descoberta em uma ampla variedade de organismo procarioto e eucarioto. Na indústria é a principal enzima utilizada na hidrólise da sacarose e também na obtenção do xarope de açúcar invertido. Para esta produção de enzima, a fermentação mais utilizada nas produções científicas é a fermentação em estado sólido. Logo, este trabalho objetivou-se em analisar o rendimento da FES na produção de enzimas invertases utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003 como agente transformador utilizando dois resíduos (Farelo de algaroba e Farelo de arroz) como substrato. A fermentação ocorreu em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo o meio inoculado juntamente com os substratos escolhidos, onde todo o processo foi mantido sob incubação a temperatura ambiente. No que se refere ao período deste processo ao todo foram de sete dias, e a cada 24 horas era coletado um *Erlenmeyer* de cada substrato contendo a fermentação. Do caldo extraído de cada *Erlenmeyer* por filtração à vácuo foi analisado o pH, consumo de substrato, atividade enzimática, umidade percentual e quantidade de proteína bruta. O crescimento celular foi analisado por peso seco, onde tirava a diferença dos pesos dos *ependorfs* contendo a biomassa seca e os *ependorfs* vazios previamente esterilizados e secos em estufa. Neste sentido, a produção de invertase pelo *Aspergillus niger* IOC 4003 mostrou-se satisfatória por fermentação em estado sólido utilizando os resíduos escolhidos. Foi observado que em ambas as fermentações, os níveis de atividade invertásica foram aumentando durante o período estabelecido e mostraram-se diretamente proporcionais ao crescimento celular e a sua produtividade. Já os níveis da quantificação de proteína por Bradford mostraram-se condizentes mesmo com uma oscilação na fermentação utilizando a algaroba. Os valores do pH se mantiveram com um caráter ácido, possibilitando um bom desempenho do fungo. Neste viés, a produção de invertase por fermentação em estado sólido propicia uma melhor viabilidade mais acessível, agregando valor ao resíduo que seria descartado, e fortalecendo a sustentabilidade e viabilidade econômica do processo de produção enzimática.

**Palavras-chave:** Invertase, fermentação em estado sólido, *Aspergillus niger* IOC 4003, farelo de algaroba, farelo de arroz e sustentabilidade.

## ABSTRACT

Invertase can be known also as  $\beta$ -fructofuranosidase D, and hydrolase, that can be detected in a wide variety of eukaryote and prokaryote organism. In the industry, it is the main enzyme used in the hydrolysis of sucrose, and also in obtaining the invert sugar syrup. For this enzyme production, the most widely way of fermentation in scientific production is the solid state fermentation. This study aimed to analyze the performance of the SSF in the invertase enzyme production, using the filamentous fungus *Aspergillus niger* IOC 4003 as an agent, using two waste (bran and rice bran mesquite) as a substrate. The fermentation took place in 250 ml Erlenmeyer flasks containing the inoculated medium with the chosen substrate, where the whole process is kept under incubation at room temperature. As regards the period of the whole process was seven days. For every 24 hours were collected a erlenmeyer flask containing the fermentation of each substrate. The extracted broth from each flask by vacuum filtration had each pH, substrate consumption, enzymatic activity, percent moisture and amount of crude protein analyzed. Cell growth was analyzed by dry weight, which took the difference of the weights eppendorf tubes containing the dried biomass and sterilized empty eppendorf tubes dried in an oven. According to this, the *Aspergillus niger* invertase IOC 4003 production was satisfactory by using of the solid state fermentation and the chosen residues. It was observed that in both fermentations, the invertase activity levels increased during the established period and shown to be directly proportional to the cell growth and productivity. Since the Bradford protein quantification levels shown to be consistent even with a fluctuation in fermentation using mesquite. The pH values maintained an acid character, allowing a good performance of the fungus. In this way, the invertase production by solid state fermentation provides a better more affordable viability, adding value to the waste that would be discarded, and strengthening the sustainability and economic viability of the enzyme production process.

Keywords: Invertase, solid state fermentation, *Aspergillus niger* IOC 4003, mesquite meal, rice bran and sustainability.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**FES** – Fermentação em Estado sólido

**µm** – Micrometro

**U** – Unidade de atividade enzimática

**[S]** – Concentração de substrato

**w** – Teor percentual de umidade

**BSA** – Albumina Bovina Sérica

**DNS** – Ácido dinitrosalicílico

**DO** – Densidade ótica

**MS** – Matéria seca

**FSm** – Fermentação Submersa

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**Aa** – Atividade de água

**UR%** = Umidade relativa do equilíbrio

**Pa** = Pressão de vapor de água do substrato

**Pa<sub>0</sub>** = Pressão de vapor de água pura

**kDa** – Unidade de Massa Atômica

**BDA** – Batata Dextrose Ágar

**w** = Teor de umidade (%)

**M<sub>w</sub>** = Massa da água da amostra ( $M_w = M_t - M_s$ ) em g

**M<sub>s</sub>** = Massa seca referente a cada amostra (nesse caso as médias das *M<sub>s</sub>'s*) (g)

**M<sub>t</sub>** = Massa total referente as amostras úmidas/antes da secagem (nesse caso as médias das *M<sub>t</sub>'s*) (g).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mecanismo de reação catalisada pela invertase .....	23
<b>Figura 2</b> – Mecanismo do complexo proposto para invertase-sacarose .....	24
<b>Figura 3</b> - Reprodução Sexuada e Assexuada dos fungos filamentosos.....	27
<b>Figura 4</b> – Estrutura do grão de arroz (JOSAPAR, 2008).....	33
<b>Figura 5</b> – Análise comparativa entre a FSm e FES.....	36
<b>Figura 6</b> – Detalhamento dos resíduos em placas de petri.....	44
<b>Figura 7</b> – Manutenção dos esporos de <i>Aspergillus niger</i> IOC 4003.....	46
<b>Figura 8</b> – A: Meio de cultivo sem o inóculo. B: Meio de cultivo com o inóculo (Pré-inóculo ou solução de esporos).....	48
<b>Figura 9</b> – Erlenmeyers na câmara de fluxo laminar preparados para o inóculo da solução de esporos.....	48
<b>Figura 10</b> – Obtenção do extrato enzimático via filtração com funil de <i>büchner</i> .....	48
<b>Figura 11</b> – <i>Eppendorfs</i> contendo os extratos enzimáticos referentes ao tempo de fermentação.....	50
<b>Figura 12</b> – Tubos de ensaios prontos para a leitura da absorbância.....	52
<b>Figura 13</b> – Após a adição da solução de Bradford no extrato enzimático.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais classes de enzimas .....	20
<b>Tabela 2</b> - Comparação das características entre catalisadores químicos e enzimas .....	21
<b>Tabela 3</b> - Enzimas comercializadas de acordo com a demanda.....	22
<b>Tabela 4</b> – Composição química pertencente ao farelo de algaroba.....	32
<b>Tabela 5</b> – Caracterização dos resíduos sólidos na fermentação por FES.....	55
<b>Tabela 6</b> – Unidades das atividades invertásicas em função do tempo de fermentação.....	58
<b>Tabela 7</b> – pH das amostras enzimáticas em função do tempo de fermentação.....	63

## GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Atividade da enzima invertase obtida da FES por <i>Aspergillus niger</i> IOC 4003 utilizando farelo de algaroba (S1) e farelo de arroz (S2) como substrato.....	56
<b>Gráfico 2</b> – Análise entre a atividade enzimática e o seu percentual de aumento da FES utilizando farelo de algaroba .....	57
<b>Gráfico 3</b> – Análise entre a atividade enzimática e o seu percentual de aumento da FES utilizando farelo de arroz.....	57
<b>Gráfico 4</b> – Curva de crescimento celular do <i>Aspergillus niger</i> por FES utilizando como resíduo o farelo de algaroba (Crescimento Cel 1) e farelo de arroz (Crescimento Cel 2).....	58
<b>Gráfico 5</b> – Curvas de análise entre Produtividade 1 (Farelo de algaroba) e Produtividade 2 (Farelo de Arroz).....	59
<b>Gráfico 6</b> – Análise comparativa do consumo de substrato do fungo filamentoso na fermentação em estado sólido em função do tempo.....	60
<b>Gráfico 7</b> – Relação entre Consumo 1 e Atividade enzimática 1 (Farelo de algaroba).....	60
<b>Gráfico 8</b> – Relação entre Consumo 2 e Atividade enzimática 2 (Farelo de Arroz).....	61
<b>Gráfico 9</b> – Teor de água (Umidade) das amostras em função do tempo.....	62
<b>Gráfico 10</b> – Relação entre pH e atividade invertásica utilizando o farelo de algaroba em função do tempo.....	64
<b>Gráfico 11</b> – Relação entre pH e a atividade enzimática utilizando o farelo de arroz em função do tempo.....	64
<b>Gráfico 12</b> – Análise da quantidade de proteínas presentes nas amostras enzimáticas em função do período de fermentação da FES.....	66
<b>Gráfico 13</b> – Análise comparativa entre a quantidade de proteína presente na amostra e a atividade enzimática (substrato 1 – Algaroba).....	66
<b>Gráfico 14</b> - Análise comparativa entre a quantidade de proteína presente na amostra e a atividade enzimática (substrato 2 – Arroz).....	67

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 - ENZIMAS.....	19
2.2 - FUNGOS FILAMENTOSOS .....	25
2.3 - MEIOS DE CULTURA E SUBSTRATOS.....	29
2.4 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	35
2.5 - PURIFICAÇÃO/PRECIPITAÇÃO DA INVERTASE .....	40
2.6 - FATORES DE INFLUENCIAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	41
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	43
3.1 – OBJETIVO GERAL .....	43
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4 - METODOLOGIA</b> .....	44
4.1- PREPARO DO RESÍDUO .....	44
4.2 – MICRO-ORGANISMO .....	45
4.3 – OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS (MEIO DE CULTURA).....	46
4.4 – PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	47
4.5 – EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....	48
4.6 – QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	49
4.7 – CONSUMO DE SUBSTRATO .....	49
4.8 – DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE UMIDADE DAS AMOSTRAS .....	50
4.9 – DETERMINAÇÃO DO PH .....	51
4.10 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE POR DNS .....	51
4.11 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA POR BRADFORD .....	53
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	55
5.1 – Caracterização dos resíduos secos.....	55
5.2 – Determinação da atividade invertásica do processo fermentativo .....	56
5.3 – Análise do crescimento celular e a sua produtividade .....	58
5.4 – Consumo de substrato pelo <i>Aspergillus niger</i> .....	60
5.5 – Umidade relativa na fermentação em estado sólido .....	62
5.6 – Análise da variação de pH no extrato enzimático da FES.....	63
5.7 – Estudo da quantificação de proteína no extrato enzimático .....	66
<b>6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
SUGESTÕES .....	70
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71

## 1 - INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, tendo como carro chefe a produção de café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros. No entanto, a sintetização destes produtos agrícolas geram uma grande quantidade de resíduos. Mas, sua disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição e com isso, nos anos, houve um aumento significativo nas pesquisas com o intuito de minimizar ou tornar mais eficiente à utilização desses resíduos (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Como aplicação em potencial destes resíduos destaca-se a sua utilização como principal fonte de carbono em bioprocessos para a obtenção bioprodutos com valor agregado, entre eles: enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólicos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (Uenojo & Pastore, 2007). Nos processos biotecnológicos, a fermentação em estado sólido vem sendo a técnica mais utilizada e contribuindo fortemente para esta utilização (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido emprega-se em processos onde há o desenvolvimento de micro-organismos sobre ou dentro de partículas sólidas, onde a presença de água é um fator determinante no andamento do processo fermentativo para garantir o crescimento e um melhor metabolismo (PINTO *et al.*, 2006).

A fermentação em estado sólido apresenta diversas vantagens quando comparada a submersa, principalmente quando os agentes de transformação são os fungos filamentosos. Para estes micro-organismos, é de extrema importância a semelhança do meio de cultivo e seu meio natural para que possam crescer e excretar maior quantidade de enzimas (PANDEY, 2003). A concentração de produtos originados deste processo é maior que os obtidos na fermentação submersa e gera menos resíduos líquidos. O processo estimula o setor econômico em regiões com abundância em biomassa e resíduos agroindustriais por ser acessível e farto (CASTILHO *et al.*, 2000).

A algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, originária das Américas (encontrada desde a América

do Norte a Central e Sul) e África Tropical. Chegou no Brasil há mais de 50 anos, estando difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subespontâneas (SILVA *et al.*, 2002). A utilização do farelo é recomendada, pois no processamento térmico e físico das vagens, além da incorporação de todos os componentes, torna-se mais susceptível ao ataque de enzimas e micro-organismos, reduz o ataque de insetos no armazenamento, agrega-se valor ao produto que iria ser descartado definitivamente, entre outros (SILVA *et al.*, 2002a).

Para muitos países em desenvolvimento o arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância e é o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas no mundo, atinge na Ásia, uma produção e consumo da ordem de 90% (EMBRAPA, 2004). No Brasil, o arroz se destaca como maior produtor fora do continente asiático e está entre os dez principais produtores mundiais, segundo os estudos realizados pela FIESP com o apoio do Ministério da Agricultura (ARROZ BRASILEIRO, 2008). Há bastante interesse em pesquisas biotecnológicas, uma vez que o farelo de arroz possui uma alta carga nutritiva e apresenta uma relativa disponibilidade e baixo custo. Este subproduto tem sido evidenciado em diversos trabalhos nos quais soa reaproveitados como suplemento na composição de meios de cultivo para diferentes micro – organismos, como relata os trabalhos que enfocam a produção de xilitol em açúcar álcool de várias aplicações terapêuticas (FELIPE, 2004).

A invertase (EC 3.2.1.26), também pode ser conhecida como  $\beta$ -D frutofuranosidase. É uma hidrolase que pode ser descoberta em uma ampla variedade de organismos procariotos e eucariotos, estando entre estes os fungos e leveduras como os dos gêneros *Aspergillus* e *Saccharomyces*, respectivamente (PIETRO & SAID, 2004). As invertases são enzimas com alto poder industrial devido a sua utilidade na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como a matéria-prima (RUBIO, RUNCO & NAVARRO, 2002).

O que limita a produção em massa da enzima invertase tem sido basicamente o elevado custo em sua produção e o baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da enzima. Mas, há técnicas naturais de imobilização de enzimas sob condições do ambiente manipuladas e oferecem uma alternativa para melhoria do processo, oferecendo grande estabilidade operacional à enzima e possibilitando

inúmeras reutilizações sem perda significativa de atividade enzimática (COUTINHO FILHO *et al.*, 1999).

Os fungos do gênero *Aspergillus* se destacam não apenas na produção de enzimas, mas também na produção de metabólicos secundários. Em destaque, na produção de metabólicos secundários, os fungos *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* são responsáveis por intoxicação cancerígenas em várias espécies de animais (TANIWAKI, 1993).

Os fungos do gênero *Aspergillus niger*, é bastante empregado na produção da enzima invertase, como também das enzimas pectinolíticas (OLIVEIRA, 2013), com destaque para a poligalacturonase (PG) (CASTRO, 2009). O *A. niger* também possui participação especial na biossíntese de ácido cítrico para uso em indústrias de alimentos, refrigerantes e biofármacos (LEONEL & CEREDA, 1995).

Devido a estes fatores, este trabalho teve como principal intuito, a produção da enzima invertase por meio da fermentação em estado sólido impondo valor a resíduos agroindustriais como farelo de algaroba e farelo de arroz, tendo como principal agente transformador o fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Enzimas

O manuseio das enzimas é originário há bastante tempo, antes mesmo das suas funções e micro – organismos reconhecidos. O pão, foi o primeiro alimento obtido à partir deste processo fermentativo. Em observação, Pasteur notou que havia a interação das leveduras no processo de fermentação alcoólica e também observou a ação das enzimas nesse processo metabólico (CABRAL *et al.*, 1981).

As enzimas, em sua maioria, são proteínas globulares compostas por aminoácidos vinculados por ligações peptídicas. São biocatalisadores que possuem função de diminuir a energia de ativação, termodinamicamente acelerando uma reação possível, sem modificar a sua constante de equilíbrio e a sua energia livre de ativação (ENGINEER *et al.*, 2000; GÜRSEL *et al.*, 2003; ISIK *et al.*, 2003).

De acordo com Harger (1982), as enzimas possuem estrutura protéica na forma terciária ou quaternária, são termolábeis e não dialisáveis, e facilitam bastante a velocidade da reação química possível, logo, reduzem rapidamente qualquer limitação energética destas reações. Na célula viva, as enzimas realizam processos metabólicos. Ocorrem em todos os organismos vivos, desde os mais simples, aos mais desenvolvidos. As enzimas, na sua maioria são endocelulares, mas há algumas exocelulares e são excretadas, a exemplo disto, temos as amilases fúngicas.

Uma das peculiaridades das enzimas que podemos notar, quando comparadas com catalisadores químicos, são a especificidade pelo substrato e a peculiaridade em promover somente uma reação bioquímica ao seu substrato, em condições brandas de reação e menores problemas no ambiente e toxicológicos. São divididas em seis grandes classes, fundamentadas de acordo com a reação que catalisam. Dentre as classes estão: Oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

**Tabela 1** – Principais classes das enzimas.

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada	Atuação
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons	CH-OH
		C=O C=O- CH-NH <sub>2</sub> CH-NH- NADH, NADPH
Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas	Grupos com um carbono Grupos aldeído ou cetona Grupos acil Grupos glicosil Grupos fosfatos Grupos contendo enxofre
		Esteres Ligações glicosídicas Ligações peptídicas Outras ligações C-N Anidridos ácidos
Hidrolases	Reações de hidrólise	
Liasas	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico	=C=C=
		=C=O =C=N-
Isomerasas	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	racemases

Fonte: MARIOTTO, 2006.

**Tabela 2** – Comparação das características entre catalisadores químicos e enzimas.

Característica	Enzimas	Catalisadores químicos
Especificidade ao substrato	Alta	Baixa
Natureza da estrutura	Complexa	Simples
Sensibilidade à temperatura	Alta	Baixa
Condições de reação	Suaves	Drástica (geralmente)
Custo de obtenção	Alto	Moderado
Consumo de energia	Baixo	Alto
Formação de subprodutos	Baixa	Alta
Separação catalisador/produto	Difícil e cara*	Simples
Atividade em temperatura ambiente	Alta	Baixa
Presença de cofatores	Sim	Não
Estabilidade	Baixa*	Alta
Energia de ativação	Baixa	Alta
Velocidade de Reação	Alta	Baixa

\* enzimas solúveis. Enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas e apresentam alta estabilidade (ZANIN e MORAES, 2004).

Fonte: ZANIN e MORAES, 2004.

As células microbianas são reconhecidas por ter facilidade na produção de enzima, oferecendo diversas vantagens, como: facilidade na ampliação da escala da produção, apresenta natureza diversa permitindo a produção de várias enzimas, possuem a facilidade em seu cultivo de acordo com as variáveis controladas em um ambiente favorável e são altamente sensíveis à alterações genéticas, permitindo assim a obtenção de linhagens modificadas quanto à síntese e a qualidade da enzima. O processo fermentativo também inclui baixos valores na fabricação do mesmo (NOSB, 1999).

### 2.1.1- Aplicação de Enzimas na Indústria

As enzimas são úteis em um vasto campo de aplicações, seja melhorando um produto, ajudando a sua obtenção ou até mesmo sintetizando um intermediário, de difícil aquisição. A exemplo disto, temos a manufatura de queijos, onde a lipase possui a função de aceleração da cura do produto (LUCARINI, *et al.*, 2000).

Embora tenha inúmeras enzimas conhecidas, são poucas as que chegam ao mercado, destacando-se as hidrolases e entre elas, as amilases, lípases e proteases. Além das citadas, podemos ressaltar a glicose isomerase utilizada para obtenção de frutose a partir da glicose (BORZANI, 2001).

**Tabela 3** – Enzimas comercializadas de acordo com a demanda.

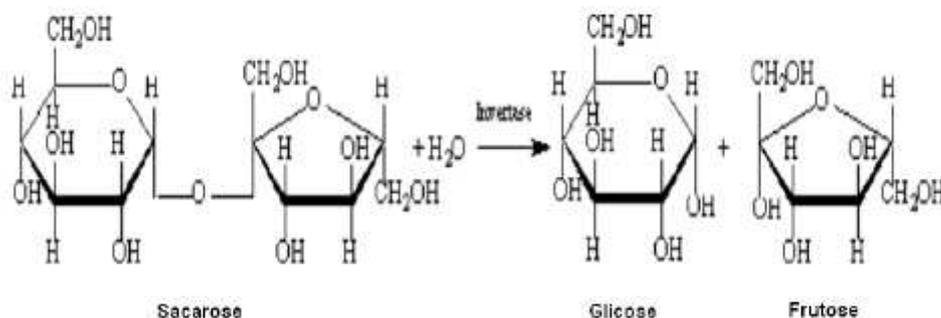
Enzimas	Vendas em %
Protease de <i>Bacillus</i>	30 – 35
Amilase de <i>Bacillus</i>	10 – 12
Renina bovina	10 – 12
Glicoamilase	8 – 10
Glicose isomerase	5 – 7
Renina microbiana	2 – 4
Pectinase	4 – 5
Pancreatina	2 – 4
Papaína, bromelina	4 – 6
Lipase	2 – 3
Outras ( $\beta$ -amilase, amilase fúngica, glicose-oxidase, invertase, lactase, lisozima, penicilina acilase, pululanase)	5 – 10

Fonte: BORZANI, 2001.

### 2.1.2 – Invertases

A invertase (EC 3.2.1.26), também pode ser conhecida como  $\beta$ -D frutofuranosidase. É uma hidrolase que pode ser descoberta em uma ampla variedade de organismo procariotos e eucariotos, estando entre estes os fungos e leveduras como os dos gêneros *Aspergillus* e *Saccharomyces*, respectivamente (PIETRO & SAID, 2004). Agem exclusivamente na hidrólise da ligação  $\beta$ -D-frutofuranosídica atuando, portanto, sobre a sacarose para compor a D-Frutose (que possui composição líquida não cristalizável) e D-glicose (que é um açúcar redutor) (**Fig. 1**).

**Figura 1** – Mecanismo de reação catalisada pela invertase (PIETRO & SAID, 2004).



Fonte: (PIETRO & SAID, 2004).

A permutação equimolar desses monossacarídeos é conhecida como açúcar invertido, sendo este, muito empregado nas indústrias alimentícias devido a sua disposição adoçante comparado a sacarose. Hidrolisa a sacarose, preferencialmente, além de hidrolisar a rafinose e estaquiose (SHAHEEN *et al.*, 2007).

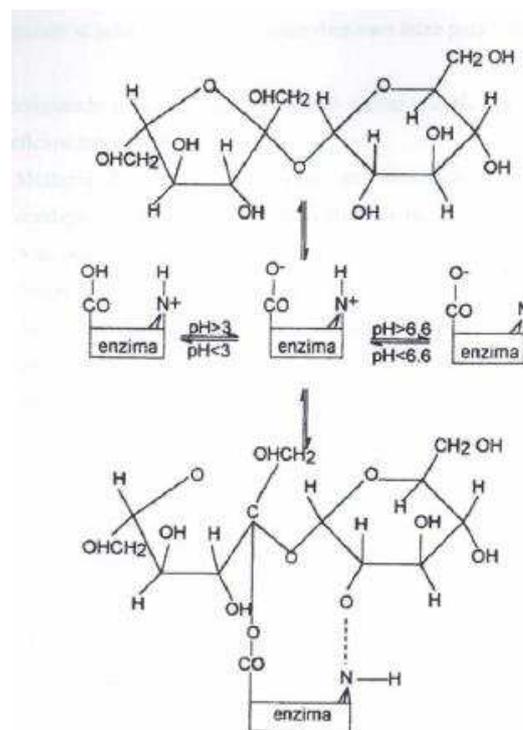
As invertases empregadas industrialmente possuem, principalmente, origem das leveduras, sendo que 80% destas enzimas são externas e 20% intracelulares. Em sua forma externa é constituída por 50% de carboidratos, ao passo que a interna é deposta dos mesmos. Suas atividades catalíticas são similares, mas é diferente a sua composição de aminoácidos, sendo que a invertase externa contém cisteína enquanto que a interna não possui (MARQUEZ, 2007).

As invertases são enzimas com alto poder industrial devido a sua utilidade na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como a matéria-prima (RUBIO *et al.*, 2002). Tomatoni & Vitolo (2007) enfatizaram o uso da invertase na produção de xarope com a enzima imobilizada em um biorreator de membrana. No âmbito do setor industrial, o xarope possui diversas finalidades, entre eles podemos citar: Na indústria alimentícia, indústria farmacêutica e também é usado para obter frutose cristalina (ASHOKKUMAR *et al.* 2001). Não pode deixar de ressaltar outros empregos da invertases, como a sua utilização em produtos para higiene bucal com o objetivo de evitar a formação de placas bacterianas, na hidrólise da rafinose, inulina e gentianose para obtenção melibiose, D-Frutose e gentibiose, respectivamente, nos biosensores em preparo de meios de cultivo para a propagação de micro-organismos não produtores de invertase (SAID & PIETRO, 2004).

Na adição de invertase ao suco de fruta, ocorre o aumento do teor de glicose e frutose. A hidrólise da sacarose a 30-40 °C diminui os custos de produção quando a imobilizada é empregada, devido à reutilização da enzima e o uso de um processo contínuo (TOMATONI & VITOLO, 2007). Apresentaram um aumento na produção de invertase por FES por uma linhagem de *A. niger* isoladas por cruzamento parasexual entre duas linhagens mutantes melhoradas, quando comparadas a outras linhagens selvagens (CARVALHO, 1999).

Não é totalmente conhecido o mecanismo de ação das invertases, mas estudos revelam o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (MARQUEZ, 2007). Foi proposto um mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose por Iaidler (1958) citado por Marquez (2007), que está representado na **Fig. 2**. Observa-se a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos.

**Figura 2** – Mecanismo do complexo proposto para invertase-sacarose (MARQUEZ, 2007)



Fonte: MARQUEZ, 2007.

A sacarose é um dissacarídeo não redutor, que por hidrólise com ácidos, resinas de troca iônica ou a enzima invertase, providencia proporções equimolares de D-glicose

e D-frutose (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000). A sacarose é bastante empregada em alimentos e bebidas como o adoçante, e também, como nutriente em processos fermentativos. Provém da beterraba ou da cana-de-açúcar, sendo esta última sua fonte natural mais importante (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

A produção do bioproduto em questão, açúcar invertido, pode ser alcançada por meio da hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise pode gerar acidez devido à ação direta de um ácido (hidrólise homogênea) ou à liberação de  $H^+$ . O processo é considerado limpo, uma vez que, não gera resíduos ácidos e subprodutos tóxicos, sendo desnecessária uma neutralização. Hidrólise enzimática por intermédio da invertase, possui um alto grau de hidrólise, originando assim, produto com alta qualidade, com baixos teores de cinzas, cor (RODRIGUES *et al.*, 2000).

O que limita a produção em massa da enzima invertase tem sido basicamente o elevado custo em sua produção e o baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da enzima. Mas, há técnicas naturais de imobilização de enzimas sob condições do ambiente manipuladas e oferecem uma alternativa para melhoria do processo, oferecendo grande estabilidade operacional à enzima e possibilitando inúmeras reutilizações sem perda significativa de atividade enzimática (COUTINHO FILHO *et al.*, 1999).

## **2.2 – Fungos filamentosos**

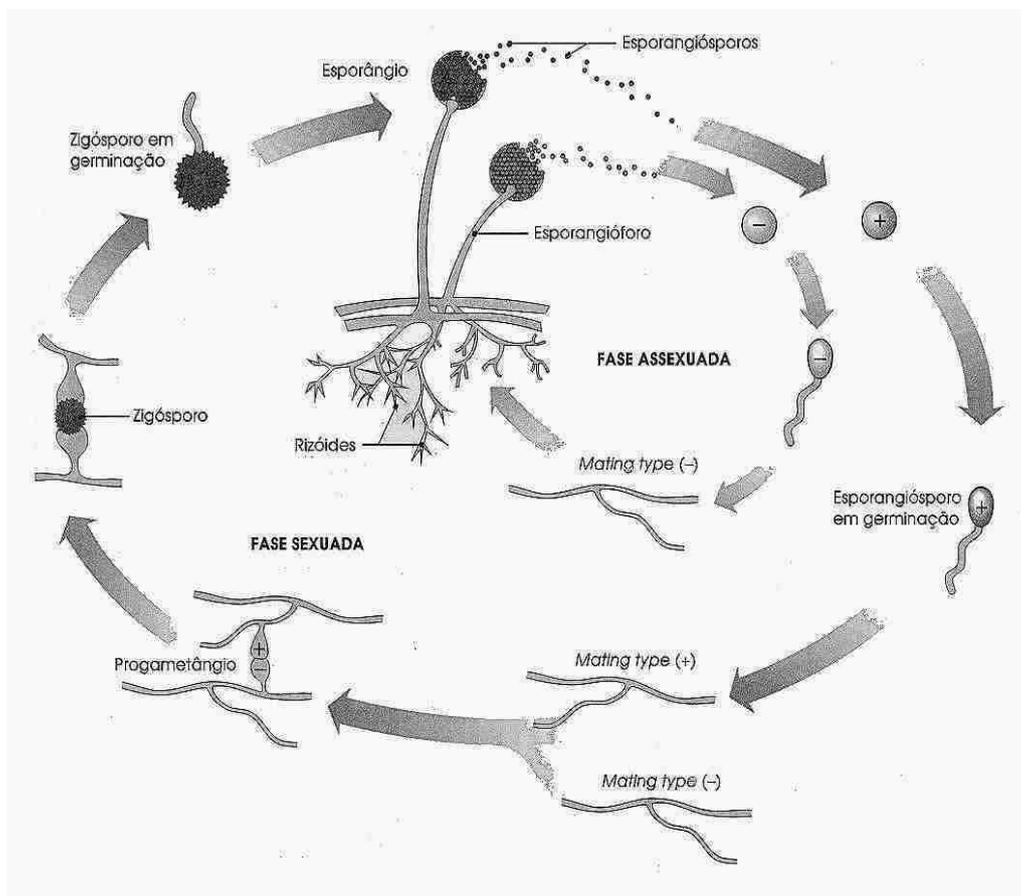
Os fungos são seres eucarióticos e heterotróficos que executam a decomposição de matéria orgânica. Apresentam parede celular rígida e composta por polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que mantém uma certa resistência as pressões osmóticas e mecânicas. Há a ausência da fotossíntese, uma vez que os mesmos são desprovidos de clorofila. Como material de reserva, possuem o glicogênio e podem ser encontrados no ar, solo, água, vegetais e animais. Outra característica importante dos fungos, é que suas células têm membrana citoplasmática lipoprotéica, que apresenta função de regular as trocas com o meio externo (BORZANI *et al.*, 2001).

Consiste em filamentos longos de células conectadas, o talo, no caso de fungos filamentosos. Estes, são denominados hifas, as quais podem ser septadas ou cenocíticas. Onde há nutrientes é chamada hifa vegetativa e a parte envolvida com a reprodução é chamada de hifa reprodutiva ou mesmo hifa aérea, a qual suporta os esporos. Em condições ótimas de ambiente, as hifas crescem e formam uma massa filamentosa, chamada de micélio (TORTORA *et al.*, 2003).

Como principal meio de disseminação da espécie, os fungos filamentosos podem se reproduzir através da fragmentação de suas hifas ou pela formação de esporos assexuadamente, e também de maneira sexuada. Após um fungo formar seus esporos, este se separa da célula parental dá origem a um novo indivíduo (**Fig. 3**) (TORTORA *et al.*, 2003; BORZANI *et al.*, 2001).

Os fungos são de grande importância para a saúde pública, uma vez que são objetos de estudos para a busca da cura ou alternativas que possam amenizar sintomas de certas enfermidades por eles causadas e também como ferramenta de controle biológico e biotecnologia (MORAES *et al.*, 2015). Na ampla área de conhecimento biotecnológico, os fungos apresentam diversas atuações em setores diferentes, como: panificação, fabricação de cerveja e álcool, produção de antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos, processamento de frutas e legumes, clarificação de sucos de frutas, extração de café e na produção de adoçantes. Podemos citar os principais fungos filamentosos utilizados no setor industrial: incluem os generos *Aspergillus*, *Mucor* e *Trichoderma* como, por exemplo, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *M. michie* e *T. reesei* (BENNETT, 1998; VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997).

**Figura 3** - Reprodução Sexuada e Assexuada dos fungos filamentosos.



Fonte: <http://alumnobioe.blogspot.com.br/2013/08/reino-fungi.html>

Embora o conhecimento sobre a patogenicidade dos fungos seja restrita e limitada, são considerados patogênicos. Alguns fungos são patógenos primários, capazes de iniciar uma infecção em um hospedeiro. Todos os patógenos fúngicos primários são agentes de infecção respiratória e nenhum deles é um parasita obrigatório (MURRAY *et al.*, 2011).

Em destaque na produção de diferentes biomoléculas, os fungos filamentosos podem ser uma alternativa viável tornando o processo de fabricação de enzima, em um projeto mais barato e ecologicamente correto. Estes micro-organismos se ajustam melhor sob condições da fermentação em estado sólido, quando comparados aos micro-

organismos unicelulares, uma vez que possuem uma considerável tolerância a baixa atividade de água e elevada pressão osmótica (KRISHNA, 2005).

Na agricultura, o conhecimento das práticas com fungos empregadas nos campos promove uma melhora na qualidade de trabalho e principalmente nos produtos. Além disso, a diversidade fúngica torna-se uma alternativa bastante interessante na busca de uma agricultura sustentável, que permita a conservação da diversidade biológica nos solos (BORGES, *et al.*, 2011).

### 2.2.1 – *Aspergillus niger*

Existem por volta de 200 espécies de *Aspergillus* e são comumente encontrados no solo, plantas em decomposição e no ar. Estes, são de grande importância para a produção de enzimas extracelulares com interesses industriais (WAINWRIGHT, 1995).

Dentre as diversas espécies, podemos destacar: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Os *Aspergillus* spp. é pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Fazem parte também do grupo dos hyalohyphomycetes os quais formam esporos (McGinnis & Rex, 2002) citados por PRADO (2002)..

O *Aspergillus niger*, é um fungo filamentosamente popularmente conhecido como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2000) citado por PRADO (2002), o *A. niger* apresenta algumas características particulares como colônias brancas até amarelo pálido, e rapidamente formam milhares de esporos. Os esporos são esféricos e medem aproximadamente de 3 a 5  $\mu\text{m}$  e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *Aspergillus niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas que são protegidas por conídios negros (PRADO, 2002).

PANDEY *et al* (1999) descrevem que o *A. niger* pode produzir até 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase,  $\beta$ -glucosidase, protease ácida. A enzima de interesse também depende diretamente do tipo de substrato da fermentação. Outros autores também descrevem

produtos do *A. niger* como: amiloglucosidase ou glucoamilase (REED, 1975; BRUCHMANN, 1980; KNORR, 1987; WARD, 1989; SMITH, 1991; PANDEY & RADHAKRISHNAN, 1992; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996); pectinases, hemicelulases, poligalacturonase (WARD, 1989); ácido cítrico; (WAINWRIGHT, 1995; PRADO, 2002); pectinases, proteases, celulases, invertase, lactase, hemicelulase, glucose oxidase, catalase, ácido glucônico (SMITH, 1991; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995); pectina esterase, pectina liase (SMITH, 1991).

Os fungos do gênero *Aspergillus* se destacam não apenas na produção de enzimas, mas também na produção de metabólicos secundários. Em destaque, na produção de metabólicos secundários, os fungos *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* são responsáveis por intoxicação cancerígenas em várias espécies de animais (TANIWAKI, 1993).

Os fungos do gênero *Aspergillus niger*, é bastante empregado na produção da enzima invertase, como também das enzimas pectinolíticas (OLIVEIRA, 2013), com destaque para a poligalacturonase (PG) (CASTRO, 2009). O *A. niger* também possui participação especial na biossíntese de ácido cítrico para uso em indústrias de alimentos, refrigerantes e biofármacos (LEONEL & CEREDA, 1995).

## **2.3 – Meio de cultura e Substratos**

### *2.3.1 – Meio de cultura*

Nos meios de cultura, é imprescindível a adição de nutrientes essenciais e específicos para estimular a produção do bioproduto de interesse. Uma vez sintetizado, este material é purificado por diferentes procedimentos (CORREIA, 2004).

Acompanhada ao meio de cultivo, as células microbianas são capazes de responder aos estímulos químicos e físicos do meio externo, que por meio de mecanismos bioquímicos que regulam a expressão gênica e a fisiologia do microrganismo, formando assim, o produto (CORREIA, 2004).

Podemos citar algumas características dos meios de cultivo, entre elas: custo, fornecimento de suporte nutricional para os micro-organismos, não ter problemas na purificação/recuperação do produto, entre outras (BON *et al.*, 2008).

O meio de cultura é formado por substratos sólidos na FES, com um determinado teor de umidade. Logo, a água é um fator primordial para ser analisado, já diferentemente da fermentação submersa (SANTOS, 2007). Os substratos mais utilizados na FES são, geralmente, oriundos da agroindústria. Esses possuem como características: servirem de matriz sólida, fornecimento de carbono e outras fontes de energia, e são de baixo custo. A escolha do substrato é muito importante, pois este, precisa atender algumas funções, destacando-se o tamanho, porosidade e formato de partículas, para que o processo seja bem sucedido.

A aplicação destes resíduos agroindustriais, é uma maneira de utilizar substratos alternativos e solucionar problemas de poluição e minimizar os custos na produção de enzimas (CORREIA, 2004).

Muitos substratos necessitam de um pré-tratamento, a fim de fornecer novas características físicas, principalmente o aumento da porosidade e da capacidade de retenção de água adequando as condições necessárias ao crescimento e a produção de metabólitos pelo micro-organismo (CORREIA, 2004).

Obtém-se na literatura, uma gama de opções para utilizar como fonte de carbono e suplementar o meio de cultivo, como: farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, torta de coco, torta de soja, torta de babaçu, celulose, palha de trigo, grãos de milho, farinha e farelo de soja, grãos de soja, peixe, mandioca, entre outros. Em alguns casos, fontes de nitrogênio complementar são utilizadas: licor de milho, extrato de levedura, uréia, etc. Logo, a escolha da cada meio, logicamente, irá depender do produto final que se deseja obter (SCHMIDELL, 2001).

Castilho *et al.* (2000) utilizaram como fonte de carbono, resíduos da indústria de babaçu para produção de lipase por *Penicillium restrictum* a fim de estudar uma análise comparativa econômica entre os dois tipos de fermentação, e concluíram que a fermentação em estado sólido era o processo mais acessível.

Kronbauer *et al.* (2007) tiveram grandes resultados na produção de xilanase utilizando algumas fontes de carbono, como: resíduo ou bagaço de cevada, bagaço de

cana, casca de amendoim, resíduo fibroso da mandioca, gérmen de trigo, bagaço de milho verde e casca de laranja. A fonte mais produtora da enzima, foi o bagaço de cevada seguido pela casca de amendoim com atividade de 9,22 U/mL e 4,55 U/mL de proteína, respectivamente.

### 2.3.2 – *Substratos utilizados na FES*

#### 2.3.2.1 – *Farelo de algaroba*

A algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, originária das Américas (encontrada desde a América do Norte a Central e Sul) e África Tropical. Chegou no Brasil há mais de 50 anos, estando difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subespontâneas (SILVA *et al.*, 2002).

De acordo com Lima (1988), o interesse e a grande difusibilidade desse gênero no semiárido nordestino pode ser atribuída as suas diversas características como: adaptar-se a solos e climas severos; rápida taxa de crescimento; alta palatabilidade como forragem; produtividade; capacidade de rebrotar e resistir a podas e ao pastejo; e resistência a pragas e doenças.

Uma característica que se destaca e que desperta o interesse econômico e científico é a época da sua frutificação. No geral os pontos de máxima floração e posterior frutificação se caracterizam na primavera – de setembro a novembro – quando se observam menores precipitações (Lima, 1994). O mesmo autor relata que há ainda um outro período de frutificação, menor que o supracitado, entre os meses de abril e julho.

As vagens de algaroba, quando maduras, possuem elevado teor de sacarose e matéria seca de aproximadamente 84,0%. Silva *et al.* 2001, relata que essa produção comprova o potencial dessas vagens como aditivos em silagens de capim. Os mesmo autores, reportaram ainda grande aceitabilidade da algaroba, por possuir teores de 25 a 28% de glicose, 11 a 17% de proteínas e 14 a 20% de ácidos orgânicos, pectinas entre

outras substâncias. O farelo é obtido a partir da secagem das vagens em temperaturas que variam entre 60 a 80 °C, desintegradas e posteriormente moídas.

O resíduo da algaroba é classificado com concentrado energético, pois possui alto teor de sacarose, e é bastante aceito na suplementação alimentar dos animais pelo seu aroma agradável (MAGALHÃES, 2007). Carvalho *et al.* (2006) estudaram as opções de alimentos alternativos de maior valor nutritivo e que possam vir futuramente como alternativa na substituição de alimentos de alto custo financeiro, como o milho e a soja.

**Tabela 4** – Composição química pertencente ao farelo de algaroba.

Item	Em % da MS
Matéria seca	96,16
Extrato etéreo	0,70
Fibra bruta	13,36
Cálcio	0,21
Fósforo	0,16
Matéria mineral	3,45
Matéria bruta	10,46
Fibra em detergente ácido	16,10
Fibra em detergente neutro	29,32

Fonte: RIOCON (2012).

O resíduo propõe uma alta disponibilidade de energia, alto teor de açúcares solúveis, excelente aceitabilidade animal, boa composição de proteínas e fibras de boa digestibilidade, e também possui a vantagem de ser estocado por longos períodos, chegando até a seis meses de armazenamento (RIOCON, 2012).

A utilização do farelo é recomendada, pois no processamento térmico e físico das vagens, além da incorporação de todos os componentes, torna-se mais susceptível ao ataque de enzimas e micro-organismos, reduz o ataque de insetos no armazenamento,

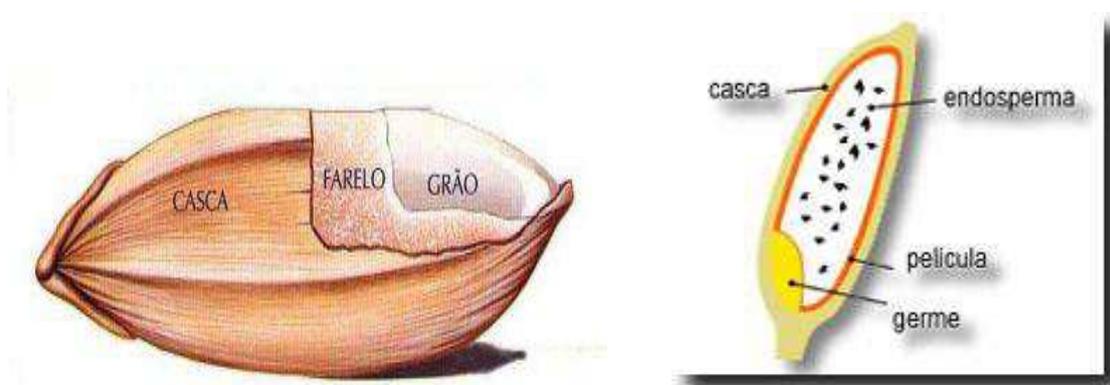
agrega-se valor ao produto que iria ser descartado definitivamente, entre outros (Silva *et al.*, 2002a).

### 2.3.2.2 – Farelo de arroz

Para muitos países em desenvolvimento o arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância e é o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas no mundo, atinge na Ásia, uma produção e consumo da ordem de 90% (EMBRAPA, 2004). No Brasil, o arroz se destaca como maior produtor fora do continente asiático e está entre os dez principais produtores mundiais, segundo os estudos realizados pela FIESP com o apoio do Ministério da Agricultura (ARROZ BRASILEIRO, 2008).

O farelo de arroz se destaca, segundo o Instituto Rio Grandense do Arroz, porque vem sendo aproveitado no montante de mais de um milhão de toneladas/ano (IRGA, 2008). A obtenção do arroz é a partir do processo de brunição, onde o arroz já descascado, integral, é lixado por máquinas compostas por pedras abrasivas que têm a função de retirar o farelo, o qual é composto pelo gema e película (**Figura 4**) e separam o arroz branco, posteriormente, o arroz passa pelo processo de polimento e a partir daí se torna um dos principais componentes da alimentação de milhões de brasileiros (EMBRAPA, 2004).

**Figura 4** – Estrutura do grão de arroz (JOSAPAR, 2008).



Do grão de arroz, cerca de 5-8% é pertencente ao farelo e apresenta uma das partes mais nutritivas do grão, pois possui fonte de proteína, fibras dietéticas, compostos funcionais como o orizanol e tocotrienos, além de lipídeos (JULIANO, 1994; ORTHOEFER, 1996; McCASKILL; ZHANG, 1999).

O farelo de arroz integral se destaca por ser uma excelente fonte de vitamina B e E, sendo pobre em vitamina A e ausente de vitamina D. O nível de proteína bruta do farelo de arroz varia entre 10 a 15%, sendo superior do valor da proteína do trigo e do milho. Já a sua composição mineral, este é extremamente rico em fósforo e manganês, além dos níveis de cobre, ferro e zinco em comparação com os valores do milho (CONTE, 2000). O farelo de arroz é rico em fósforo e deficiente em cálcio, segundo os estudos de Freeman (2006).

O orizanol e tocoferóis são componentes antioxidantes que estão presentes no farelo de arroz, assim como o ácido ferúlico, que fornecem hidrogênio para a neutralização de radicais livres relacionados ao envelhecimento celular (IRGA, 2008). Segundo Qureshi *et al.* (2002), o farelo ainda possui os tocotrienos que são capazes de reduzir os níveis de colesterol em humanos com uma dose de 100 mg/dia de TRF (Fração rica em tocotrienos).

Há bastante interesse em pesquisas biotecnológicas, uma vez que o farelo de arroz possui uma alta carga nutritiva e apresenta uma relativa disponibilidade e baixo custo. Este subproduto tem sido evidenciado em diversos trabalhos nos quais são reaproveitados como suplemento na composição de meios de cultivo para diferentes micro-organismos, como relata os trabalhos que enfocam a produção de xilitol em açúcar álcool de várias aplicações terapêuticas (FELIPE, 2004).

A suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com nutrientes como farelo de arroz, tem sido bastante utilizada para a formulação de meios de cultivo na produção de xilitol por *Candida guilliermondii* (SILVA, 2001). O autor relata que a produtividade de xilitol durante fermentação em batelada utilizando *C. guilliermondii* foi bastante favorecida quando o preparo do farelo de arroz foi feito em separado do hidrolisado, ou seja, na forma de um extrato de farelo de arroz.

Rossi *et al.* (2001), em seu trabalho, realizaram uma suplementação com farelo de arroz no bagaço de cana-de-açúcar, com o propósito de enriquecer o meio de cultivo para a produção de “semente” de shiitake (*Lentinula edobes*). Logo, observaram que as

suplementações com 25 a 30% de farelo de arroz proporcionaram maior estimulação do vigor micelial e aumentaram o valor da biomassa estimada. Cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentaram uma eficiência biológica e rendimento avaliados por Santos *et al.* (2000), que observaram o incremento do rendimento de 18 para 23,5% em termos de peso seco, com a suplementação do substrato palha de bananeira com farelo de arroz (5% p/p), o que levou à recomendação de sua utilização principalmente por causa do seu baixo custo.

Há várias pesquisas para o incremento da produção de diversas enzimas utilizando este resíduo como suplemento ou o próprio substrato em meios de cultivo, como pode ser constatado em trabalhos para a seleção de linhagens de *Rhizopus* sp. com vistas à produção de protease neutra (SUMANTHA *et al.*, 2006), onde avaliaram o favorecimento desta enzima quando o substrato (farelo de arroz) foi suplementado como uma fonte de carbono. Já para a produção de xilanases, a hemicelulose do farelo de arroz substrato foi a única fonte de carbono para *Paenibacillus* sp (HARADA, 2008). Para a produção de amilase, o farelo de arroz presente no meio de cultivo foi essencial para o bom desenvolvimento do fungo *Macrophomina phaseolina* (FERNANDES *et al.*, 2007).

#### **2.4 - Fermentação em Estado Sólido**

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual ocorre sem a presença de água livre ou próximo da ausência e é compreendida como qualquer processo de fermentação efetuada sobre um material não solúvel, ou sólido natural, que atua como suporte físico e também é fonte de nutrientes, os chamados substratos. Esta baixa quantidade de água significa que a fermentação pode ser feita apenas por um número limitado de micro-organismos, destacando-se leveduras e fungos, embora algumas bactérias também possam ser utilizadas (COUTO & SANROMÁN, 2006).

Existem diversas vantagens na FES e entre podem ressaltar: Condições da cultura muito próxima a condição natural, meios de cultura simples, índice de contaminações baixos, redução dos efluentes líquidos a tratar, estabilidade nos resíduos

sólidos, produção concentrada de metabólitos e ausência de espuma por eliminação (RODRIGUES, 2006).

**Figura 5** – Análise comparativa entre a FSm e FES.

Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Profundidade do meio limitada	Profundidade do meio variável como biorreator
Consumo limitado de água, baixa $a_w$ , sem efluentes	Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Aeração requer elevado fluxo	Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Condições estáticas	Boa homogeneização
Necessita projetos	Equipamentos industriais disponíveis
Inoculação de esporos em batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

Fonte: RODRIGUES, 2006.

Em comparação dos dois processos de fermentação, FSm (Fermentação submersa) e FES (Fermentação em estado sólido), a FES oferece melhor transferência de oxigênio, pouco controle de assepsia do processo, maior acessibilidade quanto aos substratos, menor controle dos parâmetros durante a fermentação (HASAN, 2002).

Como desvantagem, a fermentação em estado sólido possui: uso de micro-organismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para a remoção do calor produzido pelo processo de respiração do micro-organismo, poucos dados e projetos para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, ajuste do pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, entre outras desvantagens (PANDEY, 1991).

Os processos de fermentação no estado sólido têm um grande potencial econômico considerável na produção de produtos destinados à indústria alimentícia, para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Leva-se em consideração, a facilidade com que pode-se obter no auxílio suplementação da fermentação, uma vez que estes suplementes são oriundos de agroindústrias e possuem baixo custo. Podemos citar alguns resíduos, como: bagaço de mandioca, polpa e casca de café, polpa de maçã, soja e resíduo de batata. (Castilho *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 1992, citados por MACIEL, 2006).

Segundo Pandey *et al.* (2000), desde os anos 90, houve um aumento considerável no interesse em relação à FES para o desenvolvimento de bioprocessos, como na biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação e aumento de nutrientes de culturas e de resíduos de culturas, aquisição de produtos com grande valor agregado, tais como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento de plantas, etc. Destaca-se também a produção de enzimas ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustível e compostos aromáticos

Outro fator bastante importante, está no custo total da produção utilizando a fermentação em estado sólido. Castilho *et al.* (2000), avaliando o custo entre as duas fermentações na produção da enzima lipase, concluiu que o total de capital preciso para a produção de 100 m<sup>3</sup>/ano de concentrado da enzima foi equivalente a 78% maior para o processo submerso, sendo que o custo unitário foi de 68% maior que o preço de venda. Já para a FES, o custo unitário foi de 47% menor que o preço de venda.

#### 2.4.1 – Fatores que influenciam na FES

As condições especiais para uma boa fermentação requer um melhor cuidado com os seguintes fatores, entre eles: pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Na FES, este controle das condições ambientais se torna mais complexo devido à heterogeneidade da suspensão de células microbianas e das soluções utilizadas. A ausência de água na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato, ajudando assim na separação do produto. Mas, existem alguns

problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos como consequência da heterogeneidade do sistema (SANTOS, 2007).

#### 2.4.1.1 – *Tamanho do substrato*

O tamanho da partícula e a sua forma são de extrema importância. Afetam diretamente a relação área/superfície e o volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas (MITCHELL *et al.*, 2000). Na maioria das vezes, as partículas menores do substrato apresentam área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula pequena pode juntar e se aglomerar interferindo assim a respiração microbiana, podendo resultar em um baixo crescimento. Já partículas grandes, oferecem uma melhor aeração devido aos espaços criados entre as partículas, mas limitam a superfície para ataque microbiano (PANDEY *et al.*, 1999). Segundo MITCHELL *et al.* (2000) o tamanho ideal da partícula deve beneficiar o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho entre 1 mm a 1cm são frequentemente utilizadas na fermentação em estado sólido (SOUZA, 2008).

#### 2.4.1.2 – *Temperatura*

Os processos fermentativos na produção de enzimas se caracterizam por apresentarem caráter exotérmico. Durante a FES, grandes quantidades de calor são liberadas, e são diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente na germinação dos esporos, no crescimento e formação de produtos. Em todo processo de fermentação, a temperatura é um fator extremamente crítico, devido ao acúmulo do calor gerado. Logo, o aumento da temperatura pode dificultar a mistura do meio sólido e a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2006).

#### 2.4.1.3 – *pH*

O pH é um fator relevante para a otimização do processo, e seu controle e monitoramento, não é fácil (PANDEY, 2003). Geralmente os valores ótimos de pH para

os fungos fica entre (4,5 – 5,0), valor considerado baixo, e pode afetar o metabolismo dos micro-organismos por comprometer o conjunto enzimático. A variação do pH pode acarretar variações devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas dos micro-organismos. Quando ácidos orgânicos são secretados, causam o decréscimo do pH, entretanto, o consumo destes, quando presente no meio causam o aumento do pH (SANTOS, 2007).

Os fungos *Aspergillus niger*, segundo CASTILHO (1997), são bastante baixos (pH igual a 4) o que aumenta sua ampla utilização no processamento de frutas.

#### 2.4.1.4 – Aeração

Os sistemas de fermentação possuem um caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é restringida por um filme líquido na superfície do substrato. Na ausência da água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio torna-se fatores cruciais. A transferência de oxigênio em duas instâncias: Na transferência interpartículas e intrapartículas. A maioria dos cultivos neste tipo de fermentação (FES), possibilita o livre acesso do oxigênio atmosférico ao substrato, já que o oxigênio é capaz de se difundir, em alta velocidade, pelo filme líquido superficial constituído nas partículas do substrato (SANTOS, 2007).

Embora a passagem de ar possibilite elevadas taxas de crescimento e produtividade, pode levar ao desenvolvimento do fenômeno de secagem que faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos sejam lentas ou nulas. Para diminuir ou dominar este problema, o ar deve ser saturado em vapor de água ou próximo da saturação. A taxa de aeração ótima para o processo de fermentação é estabelecida pela natureza do micro – organismo utilizado, do requerimento particular de oxigênio para o crescimento e síntese de produtos, da quantidade de calor metabólico gerado no processo, do grau de CO<sub>2</sub> e outros metabólicos voláteis que devem ser eliminados, e principalmente, da espessura e densidade aparente do meio e da umidade (SANTOS, 2007).

#### 2.4.1.5 – Umidade e Atividade de água

Entre tantos parâmetros a serem analisados em um processo de fermentação, a água precisa ser destacado na FES, por causa do seu grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. A umidade, é a porcentagem de água na massa

total do meio, logo, é um dos parâmetros avaliados. Outro parâmetro, se diz respeito a atividade de água (Aa), definida de acordo com a fórmula 1, que abrange todas as moléculas de água envolvidas na vizinhança das partículas do substrato para o micro-organismo. A atividade de água afeta diretamente no crescimento microbiano e a síntese de metabólicos (PINTO *et al.*, 2006).

$$Aa = \frac{UR\%}{100} = \frac{Pa}{Pa0} \quad (1)$$

Onde:

UR% = Umidade relativa do equilíbrio

Pa = Pressão de vapor de água do substrato

Pa<sub>0</sub> = Pressão de vapor de água pura

Quando o nível da umidade é muito alto ocorre a diminuição dos poros, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Níveis de umidade muito baixo levam a um crescimento baixo relacionando o ótimo e baixo grau de substrato utilizado (SANTOS, 2007).

A umidade presente no processo de FES é geralmente entre 30%-40%. A umidade ótima o cultivo do micro-organismo está sujeita à capacidade do substrato reter água. No cultivo de *Aspergillus niger* em arroz é de 40%, mas já na polpa do café é de 80%. Logo, é notável a insegurança ao usar a umidade como parâmetro principal para o crescimento microbiano (SANTOS, 2007).

## 2.5 – Purificação/precipitação da invertase

O sucesso da fabricação industrial de enzimas está ligado ao grau em que a atividade dos micro-organismos é atingida e quando se reduz os custo do substratos utilizados, da incubação e da recuperação da enzima. Para purificação de enzimas, assim como para muitos outros produtos biotecnológicos, não há um processo de aplicação geral. Este procedimento, é comumente utilizado em 4 etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração

e/ou purificação de baixa resolução (precipitação fracionada com adição de sais ou solventes orgânicos); purificação de alta resolução (cromatografias) e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto (cristalização e liofilização) (KILIKIAN & PESSOA JR, 2005).

A precipitação é o processo no qual uma alteração química ou física, em uma solução protéica provoca uma formação de partículas insolúveis de proteínas. Usualmente ela é considerada um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (KILIKIAN & PESSOA JR, 2005). A precipitação por sulfato de amônio é usada para uma etapa de pré-purificação de várias enzimas. A influência dos sais neutros com a solubilidade das proteínas é uma função de sua força iônica, que se submete a concentração como da valência de cátions e ânions que formam o sal. Em elevadas forças iônicas, com grandes adições de sais muito solúvel ( sulfato de amônio) a uma solução de proteína, pode ocorrer a diminuição ou a total retirada das moléculas de água, acarretando assim, a desidratação da molécula da proteína, o que leva à predominância das interações proteína-proteína, resultando em precipitação, fenômeno este, conhecido como *salting-out* (SLIVINSKI, 2007).

A invertase extracelular foi purificada por Guimarães *et al*, (2007), neste trabalho realizado o fungo utilizado foi *Aspergillus ochraceus* e o substrato foi bagaço de cana de açúcar. A enzima apresentou um tamanho equivalente a 135 kDa de massa molecular estimada por filtração a gel e 79 kDa por SDS-PAGE. Outros trabalhos envolvendo precipitação de invertase atingiram cerca de 120 kDa de massa molecular.

A produção de  $\beta$ -frutofuranosidase por *Rhodotorula glutinis* foi purificada e seu peso molecular foi estimado em 100 kDa por filtração a gel e 47 kDa por SDS-PAGE, indicando os resultados como uma glicoproteína homodimérica (Rubio *et al.*, 2002).

A produção da enzima invertase por *A. niger* na literatura apresentam no máximo dois monômeros, com diferentes massas moleculares. Segundo Rubio & Maldonado (1995), obtiveram massa molecular de 47 kDa de acordo com SDS-PAGE.

## **2.6 - Fatores que influenciam a atividade enzimática**

Em todos os processos fermentativos é imprescindível a determinação da velocidade da reação e verificar como esta é alterada às mudanças dos diversos parâmetros analisados durante o experimento (NELSON E COX, 2006).

### 2.6.1 - Concentração do substrato

Para uma enzima comum, quando se leva a concentração de substrato a velocidade inicial se eleva até alcançar um valor máximo. Quando se adiciona um aumento desses substratos, já não aumentam a velocidade inicial e se diz que a enzima está saturada pelo substrato (MURRAY, *et al.*, 2007).

### 2.6.2 - Concentração de enzimas

No gráfico de velocidade *versus* concentração de enzima ([E]) deve gerar uma reta. A faixa ideal para que a reta deverá permanecer, depende diretamente da habilidade de medir a velocidade inicial real, modificando a concentração enzimática. Quando se adiciona mais enzima, a velocidade pode aumentar até o ponto em que a concentração do substrato está sendo diminuído durante o ensaio. Nos resultados, obtém-se graficamente Velocidade *versus* [E], um gráfico linear à baixa concentração de enzima, mas que inicia uma curva decrescente, quando chega a uma saturação, à alta [E]. Também pode ocorrer um equilíbrio inadequado da enzima. Neste caso, o gráfico fornece uma curva mais crescente (COPELAND, 2000).

### 2.6.3 – pH

As enzimas possuem um intervalo de pH ótimo na qual sua atividade é máxima. Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. As cadeias laterais dos aminoácidos do centro ativo podem operar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da conservação de certos estados de ionização e, em algum lugar de proteína, as cadeias laterais ionizadas podem cumprir um papel essencial nas interações que sustenta a estrutura da proteína (NELSON E COX, 2006).

No estudo das enzimas, torna-se extremamente interessante determinar no início da investigação, o pH ótimo e a extensão de seu platô. A mistura de reação pode então ser atenciosamente controlada com tampões de capacidade tamponante adequada (CONN e STUMPF, 1975).

### 2.6.4 – Temperatura

A velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura, até o pico da velocidade acertado. Este aumento, nada mais é, do que resultado do aumento das moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar os

produtos da reação biológica ou química. Pode ocorrer também, a diminuição da velocidade de reação, se houver o aumento da temperatura, como resultado da desnaturação da enzima (CHAMPE *et al.*, 2006).

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo Geral**

Analisar o rendimento da fermentação na produção de enzimas invertases utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* IOC 4003 como agente transformador sob fermentação em estado sólido (FES) utilizando dois resíduos (Farelo de algaroba e Farelo de arroz) como substrato.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

- Analisar a atividade enzimática e relacionar com outros parâmetros;
- Analisar e comparar o consumo de substrato pelo micro-organismo no processo fermentativo dos farelos analisados;
- Relacionar umidade e atividade enzimática na produção da enzima invertase;
- Analisar a influência do pH nas amostras no processo fermentativo;
- Qualificar o melhor substrato na produção da enzima invertase.

## 4 – METODOLOGIA

Os ensaios pertencentes a este trabalho foram realizados no laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa.

### 4.1 – Preparo do resíduo

Como meio de cultivo no processo de fermentativo em estado sólido para a produção da enzima invertase, foram utilizados dois resíduos agroindustriais: O Farelo de algaroba triturada e o Farelo de arroz triturado. Ambos os resíduos foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Paraíba.

**Figura 6** – Detalhamento dos resíduos em placas de petri.



#### 4.1.1 – Caracterização dos resíduos

A caracterização físico-química dos resíduos quanto à densidade aparente, pH, umidade e sólidos solúveis foram realizados conforme procedimentos descritos a seguir.

##### 4.1.1.1 – Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente pesou-se 50 g de cada resíduo em uma proveta de 50 mL e verificou-se o volume ocupado da massa do resíduo sem haver

a compactação (CORREIA, 2004). A densidade aparente, pode ser expressa pela formula (2):

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ ocupada\ (g)}{Volume\ total\ da\ proveta\ (mL)} \quad (2)$$

#### 4.1.1.2 – pH

Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g do resíduo. Após a homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 min, depois o pH foi mensurado por um phmetro digital previamente calibrado com as soluções padrões (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

#### 4.1.1.3 – Umidade

Verificou-se a umidade medindo 5 g do resíduo em cadinho de alumínio previamente seco e tarado. Os cacinchos permaneceram em estufa por 24h a 105 °C (Correia, 2004). A umidade pode ser expressa de acordo com a fórmula abaixo:

$$Umidade\ (\%) = \frac{Peso\ inicial - Peso\ final\ da\ amostra}{Peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (3)$$

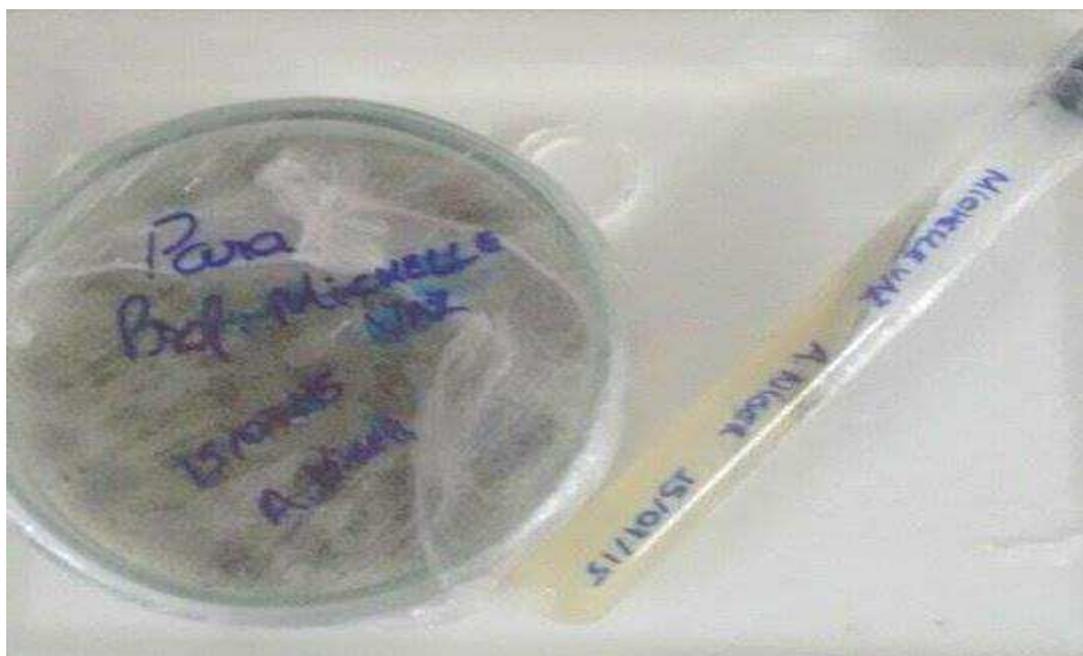
#### 4.1.1.4 – Teor de sólidos solúveis (°Brix)

A concentração de sólidos solúveis medidas em °Brix é uma medida relacionada a quantidade de açúcares presentes na amostra. Para esta análise, mediu-se 9 mL de água destilada e 1 g do resíduo, após a homogeneização, deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos, com uma agitação intermitente. Após esse repouso, a solução foi filtrada usando algodão e a leitura do teor dos sólidos solúveis foi medida em um refratômetro e multiplicada por dez, devida a sua diluição (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

## 4.2 – Micro-organismo

O micro-organismo empregado foi o *Aspergillus niger* IOC 4003, selecionado por ser uma linhagem produtora da enzima de interesse adquirido da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os esporos foram conservados em tubos de ensaio e placas de petri devidamente esterilizados e lacrados utilizando o meio BDA.

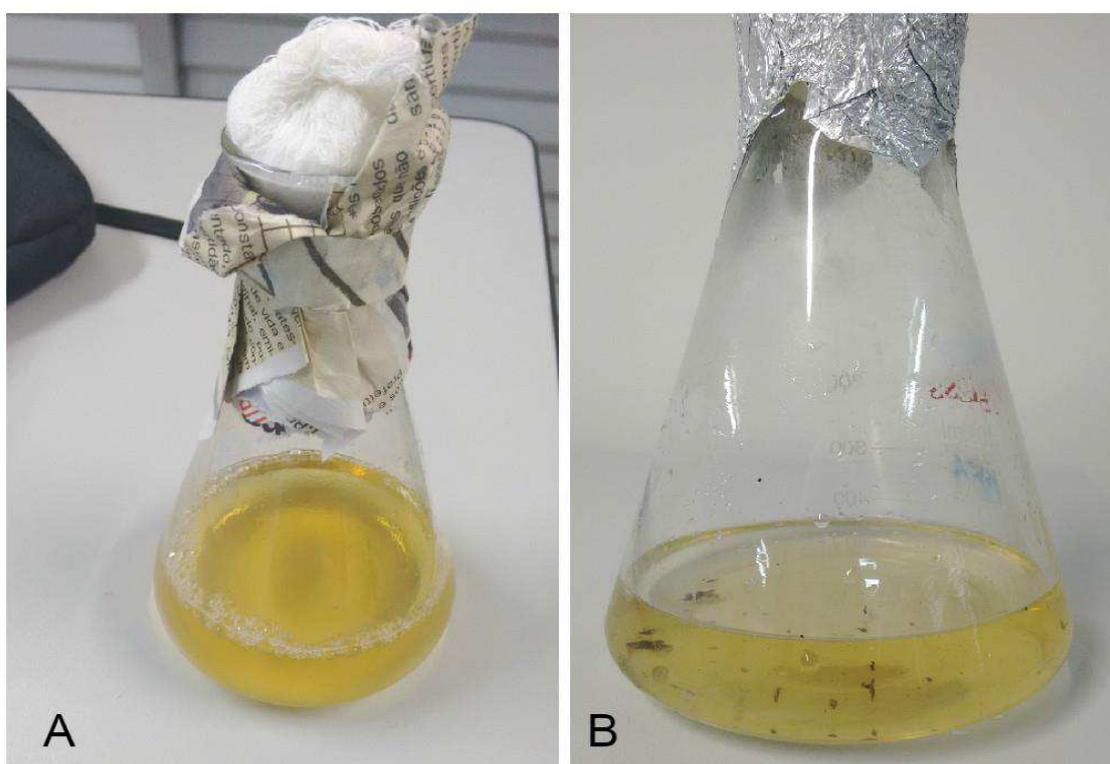
**Figura 7** – Manutenção dos esporos de *Aspergillus niger* IOC 4003.



#### **4.3 – Obtenção da solução de esporos (Meio de cultura)**

Na solução do meio de cultivo para a realização do inóculo foi utilizado o meio BD. Colocou-se 100 g de batata em 500 mL de água destilada em um *erlenmeyer* de 1 L e ferveu-se a 50 °C por uma hora. Posteriormente as batatas foram descartadas e na água resultante deste processo, adicionou-se 8 g de glicose. Esta solução foi devidamente autoclavada por 20 minutos a 1 atm. Retirou-se uma alíquota de 30 mL do meio de cultivo para os cálculos do consumo de substrato. O meio foi levado para a Câmara de fluxo laminar para a ativação do inóculo (pré-inóculo), após a ativação o meio foi deixado em repouso por 24 h em temperatura ambiente.

**Figura 8** – A: Meio de cultivo sem o inóculo. B: Meio de cultivo com o inóculo (Pré-inóculo ou solução de esporos).



#### 4.4 – Processo de Fermentação em estado sólido

Para o processo fermentativo foram utilizados sete *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 3 g de cada substrato. Os resíduos foram devidamente autoclavados antes do inóculo em câmara de fluxo laminar.

Os resíduos foram hidratados com 3 mL da suspensão de esporos que estava em repouso em temperatura ambiente. A fermentação ocorreu por 168h ao total, em temperatura ambiente e com pouco luminosidade, sendo que a cada 24h um *Erlenmeyer*, de cada substrato, era coletado para a obtenção do extrato enzimático.

**Figura 9** – Erlenmeyers na câmara de fluxo laminar preparados para o inóculo da solução de esporos.



#### 4.5 – Extração enzimática

Para a aquisição do extrato enzimático, a cada 24 h um *Erlenmeyer* de cada substrato era recolhido. Em câmara de fluxo laminar, adicionou-se 100 mL de água destilada e 2 mL de *tween* 80 no *Erlenmeyer*. Em seguida foram homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro devidamente esterilizado por 5 minutos. A extração das células e enzimas foi realizado por filtração com papel de filtro qualitativo em um kitassato e uma bomba à vácuo (**Fig. 10**). De cada *Erlenmeyer*, separou-se 50 mL de caldo extraído para posterior análise da quantificação de proteína e atividade enzimática.

**Figura 10** – Obtenção do extrato enzimático via filtração com funil de büchner.



#### 4.6 – Quantificação do crescimento celular

A realização da quantificação do crescimento celular foi com base nos estudos realizados por VAZ (2011), onde o peso das células presentes em cada *eppendorf*, correspondente a concentração celular (g/L) que foi determinado em função do tempo de cultivo, como mostra a **equação 4** abaixo:

Peso das células =

$$\frac{\text{Média dos Pesos do eppendorfs com células} - \text{Média dos Pesos do eppendorfs sem células}}{1\text{mL}}$$

(4)

#### 4.7 – Consumo do substrato

Para a avaliação do consumo de substrato, este trabalho teve como subsídio o modelo adotado por Tortora *et al.* (2012), e concebido por Melo *et al.* (2014). Sinteticamente, este processo de monitoramento e determinação de consumo de substrato pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* baseou-se em determinar a absorbância do caldo fermentado a cada período de 24 horas. Para isso, foi produzida uma curva de calibração do meio de cultivo sem o inóculo para a determinação do consumo de substrato do micro – organismo.

A solução preparada para esta análise foi a mesma utilizada no processo de fermentação, mas sem o acréscimo do inóculo. Para esta solução, foi dado o nome de solução-mãe, e foi preparada para a construção da curva de calibração para a determinação do consumo de substrato. A partir da solução-mãe, foram preparadas 7 alíquotas com ordem de diluição de 0,2 g/mL, ou seja, em um intervalo entre 0 g/mL a 0,14 g/mL.

A densidade ótica (DO), foi medida para cada solução referente às alíquotas diluídas (0 a 0,14 g/mL) e que correspondem a cada ponto (7 ponto ao total para cada substrato). A DO foi medida em espectrofotômetro ajustado para 480nm.

Após 24 horas do processo de fermentação em estado sólido (FES), antes de dar início a filtração à vácuo, foram retirados 5 mL desse mesmo caldo e em seguida foi levado para o espectrofotômetro (480 nm), para posteriormente ser analisado o consumo de substrato em comparação com a solução-mãe já mencionada anteriormente.

#### 4.8 - Determinação do percentual de umidade das amostras

Para esta etapa, recolheu-se 2 mL do caldo extraído da fermentação e transferido para cada *ependorf* (duplicata de cada substrato) referente ao ponto da fermentação (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h), previamente esterilizados, pesados e identificados de acordo com o tempo de fermentação.

**Figura 11** – *Eppendorfs* contendo os extratos enzimáticos referentes ao tempo de fermentação.



Após o preenchimento dos *ependorfs* com o extrato enzimático, foram centrifugados por 10 minutos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10.000 rpm. Ao término da centrifugação, a biomassa foi separada do sobrenadante e o recipiente foi cuidadosamente pesado para a determinação da massa úmida da amostra ( $M_i$ ). Posteriormente após a secagem, o *ependorf* contendo a massa úmida foi secado em estufa a  $105^\circ\text{C}$  para a determinação da massa seca ( $M_s$ ). Do sobrenadante anteriormente separado, foi analisado o pH da amostra em um pHmetro cuidadosamente calibrado.

A determinação do teor de umidade para cada amostra de resíduos após a FES baseou-se na análise das massas dos resíduos úmidos e dos resíduos secos (JÚNIOR, 2012). O percentual da umidade das amostras foram calculados de acordo com a formula abaixo:

$$w = (Mw / Ms) . 100 (\%) \quad (5)$$

Sendo:

$w$  = Teor de umidade (%)

$Mw$  = Massa da água da amostra ( $Mw = Mt - Ms$ ) em g

$Ms$  = Massa seca referente a cada amostra (nesse caso as médias das  $Ms$ 's) (g)

$Mt$  = Massa total referente as amostras úmidas/antes da secagem (nesse caso as médias das  $Mt$ 's) (g).

#### 4.9 – Determinação do pH das amostras

A análise do pH das amostras foi determinada pela coleta do sobrenadante resultante da centrifugação correspondente a cada substrato e período. O pH foi mensurado em pHmetro digital devidamente calibrado no início dos experimentos. Os dados obtidos foram anotados para a construção dos gráficos posteriormente.

#### 4.10 - Determinação da atividade invertásica pelo método de determinação dos açúcares redutores por Ácido dinitrosalicílico (DNS)

O método DNS basicamente remete um método colorimétrico para a quantificação de açúcares redutores que inclui a reação da amostra com a participação do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) quando está submetido a uma temperatura de 100 °C aproximadamente por cinco minutos (FONTES, 2009). Este método tende a promover a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, simultaneamente na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja/marrom intensos (ROCHA, 2010).

Para a fabricação do reagente DNS, utilizou-se 2,5 g de DNS a uma solução de hidróxido de sódio, seguida da adição de uma solução contendo tartarato duplo de potássio e sódio (75g) em água destilada (125 mL), sob aquecimento constante (50 °C).

Para a determinação das concentrações de açúcares, foi construída uma curva padrão a partir de uma solução de glicose que posteriormente foi diluída em alíquotas com concentrações conhecidas (100 a 700 mg/L). A curva padrão é fundamentada na observação dos valores da absorbância das soluções de mistura entre solução de glicose e DNS, previamente preparadas. Com a determinação da curva padrão, pôde-se determinar o fator de concentração (Eq. 6) a partir do coeficiente angular da reta ajustada.

$$\text{Fator de concentração} = \frac{1}{\text{Coeficiente Angular da reta ajustada}} \quad (6)$$

A análise da atividade enzimática foi preparada a partir do aquecimento em banho-maria das amostras enzimáticas (100 µL do extrato enzimático; 500 µL da solução de sacarose 0,1 M e 400 µL de tampão acetato 100mM, pH 5,0 ) a 30 ° C por 30 minutos, e em seguida foi adicionado 1mL do reagente DNS para que ocorra o término da reação. Uma solução “branco” ( 1 mL de DNS e 8 mL de água destilada) foi produzida visando evitar uma superestimativa da atividade da enzima. A atividade foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro (540 nm) dos extratos enzimáticos juntamente com a solução em branco (MOURA *et al.*, 2007).

**Figura 12** – Tubos de ensaios prontos para a leitura da absorbância.



Fonte: A autora.

Pode-se calcular uma unidade (U) de atividade de invertase pela quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas. Portanto, os valores da atividade invertásica (U) podem ser definidos pela Eq. 7:

$$\text{Invertase (U)} = \frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs branco}) \times \text{Fator de conc} \times \text{Diluição}}{540} \quad (7)$$

Onde:

Abs. da amostra = Absorbância da amostra;

Abs. do branco = Absorbância do branco correspondente;

Fator de conc. = Fator de concentração da curva padrão de glicose (mg/L);

Diluição = Diluição do extrato enzimático (se a amostra não for diluída não é necessário adicionar essa variável a equação);

540 = fator de conversão para atividade (u.m.ab-1 x min-1).

Os dados foram devidamente anotados referentes à atividade invertásica e uma curva da atividade foi construída graficamente analisando os níveis de atividade enzimática correspondentes a cada amostra coletada em função do tempo de fermentação.

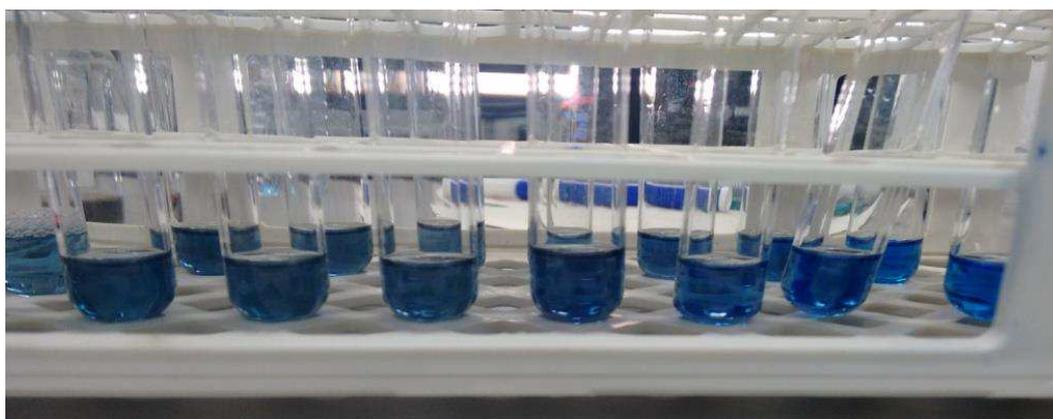
#### 4. 11 - Quantificação de proteínas por Bradford

Para a determinação da quantidade de proteínas presentes nas amostras de extrato enzimático referentes a cada período de fermentação, preparou-se uma curva de calibração utilizando Albumina bovina Sérica (BSA) (Sigma-A3059) como proteína padrão. A curva de calibração foi produzida a partir da leitura em espectrofotômetro (595 nm) de sete soluções padrões de concentrações conhecidas e elaboradas a partir da solução principal contendo o BSA.

A partir da reta de calibração, pôde-se obter a equação e o coeficiente de correlação para as sete concentrações de BSA essencial para a determinação da concentração de proteínas presentes nas amostras enzimáticas em estudo.

Na determinação da concentração de proteínas em soluções enzimáticas pelo método de Bradford o corante ácido Croomassie Brilliant Blue G 250 (principal constituinte do reagente Bradford) possui uma cor vermelha que muda para azul quando está ligado a uma proteína (BRADFORD, 1976).

**Figura 13** – Após a adição da solução de Bradford no extrato enzimático.



Para esta análise das concentrações, misturou-se 500  $\mu\text{L}$  do reagente Bradford com 500  $\mu\text{L}$  da solução enzimática e para atingir o nível mínimo da altura de leitura no espectrofotômetro, diluiu-se a mistura em 1 mL de água destilada. O espectrofotômetro fez a leitura das absorvâncias em 595 nm, contra uma solução branco ( 500  $\mu\text{L}$  do reagente com 1,5 mL de água destilada). Após a determinação dos valores das absorvâncias, foi descontado o valor do branco das demais soluções. A partir das absorvâncias obtidas, foi possível calcular as concentrações de proteínas presentes nas amostras enzimáticas com o auxílio da equação obtida da curva de calibração construída previamente a partir da solução contendo BSA.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 – Caracterizações dos resíduos secos

A produção de enzimas como invertase, amilase, celulase, pectinase e protease é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Assim, torna-se indispensável a caracterização dos resíduos secos do farelo de algaroba e farelo de arroz. Esta caracterização expõe um conhecimento geral da composição e desempenho do resíduo que são importantes na síntese das proteínas de interesse, que neste caso trata-se das enzimas invertase (ROCHA, 2010). A Tabela 5 apresenta os resultados da caracterização dos substratos utilizados no processo fermentativo por FES.

**Tabela 5** – Caracterização dos resíduos sólidos na fermentação por FES.

Parâmetros analisados	Unidade	Substrato 1 - Algaroba	Substrato 2 - Arroz
Umidade	%	2,12	2,58
Sólidos solúveis	°Brix	0,0	0,0
pH	---	5,04	5,35

---

Densidade aparente	g/mL	0,5491	0,4093
--------------------	------	--------	--------

---

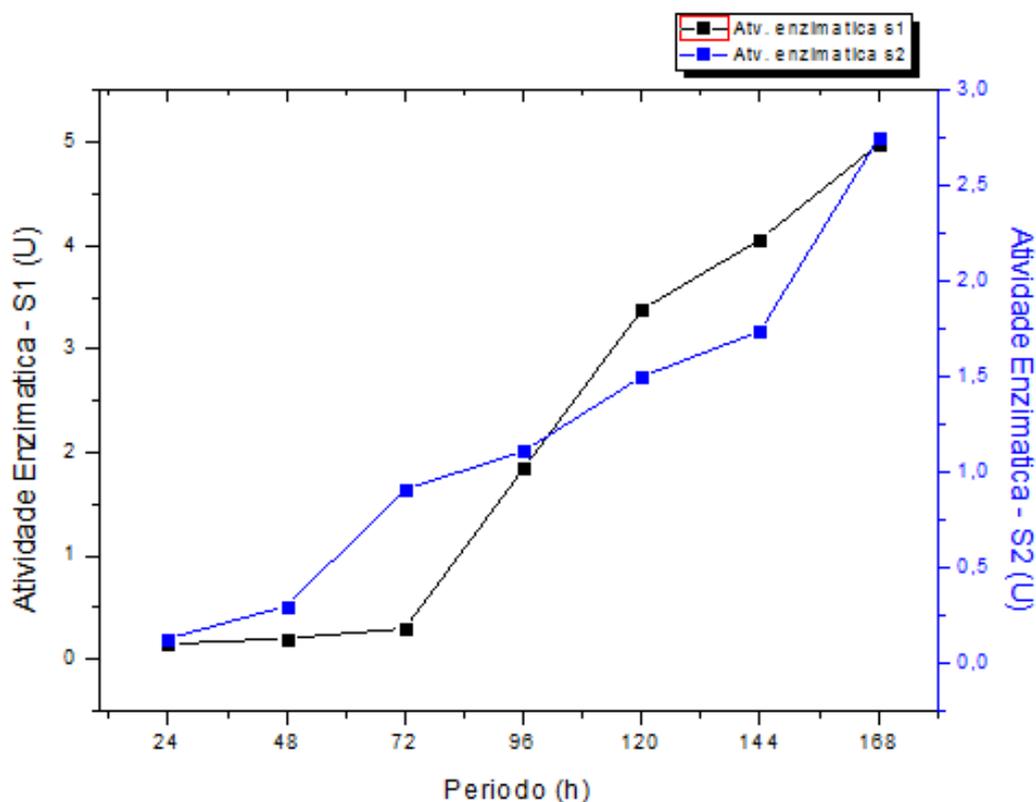
(--- Não determinado)

Na fermentação em estado sólido (FES), o pH do meio é um parâmetro importante e bastante difícil de controlar. A padronização do pH do substrato pode se dar durante o seu pré-tratamento. Existem elementos com a capacidade tamponante, os quais podem ser adicionados ao meio de modo a evitar a oscilação do pH. Esta adição pode ser efetuada desde que a substância não exerça nenhum papel nocivo sobre a atividade biológica (Pandey *et al.*, 2001).

A densidade apresentada nos resíduos de 0,5 g/mL e 0,4 g/mL para o farelo de algaroba e farelo de arroz, respectivamente, revela que os resíduos tendem a não se compactarem completamente, fator este, bastante propício ao desenvolvimento dos micro-organismos. Os espaços vazios criados pelos resíduos geram uma proveitosa circulação de ar, que facilita o crescimento fúngico do *Aspergillus niger* (SANTOS, 2007).

## **5.2 – Determinação da Atividade Invertásica do processo fermentativo.**

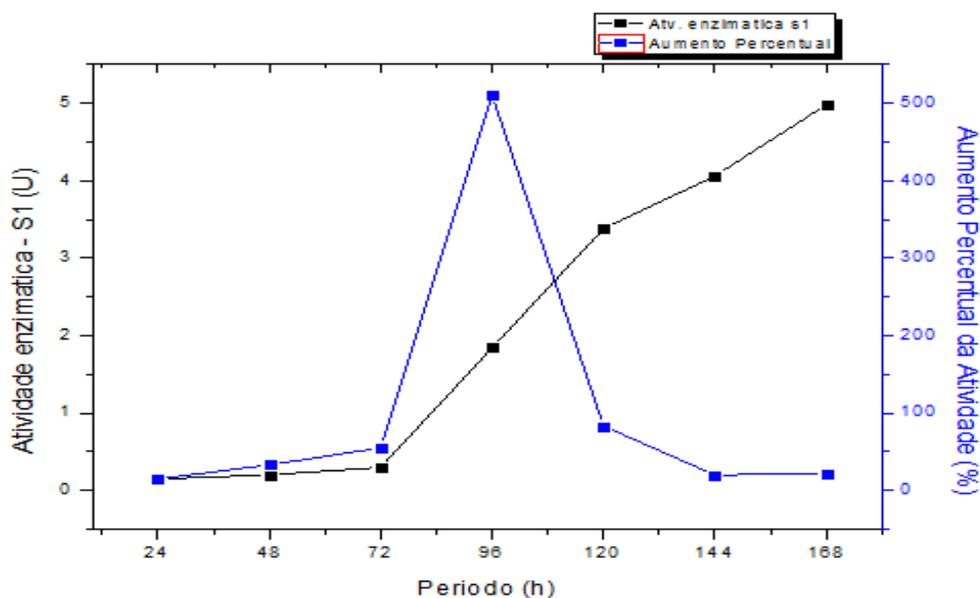
**Gráfico 1** – Atividade da enzima invertase obtida da FES por *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando farelo de algaroba (S1) e farelo de arroz (S2) como substrato.



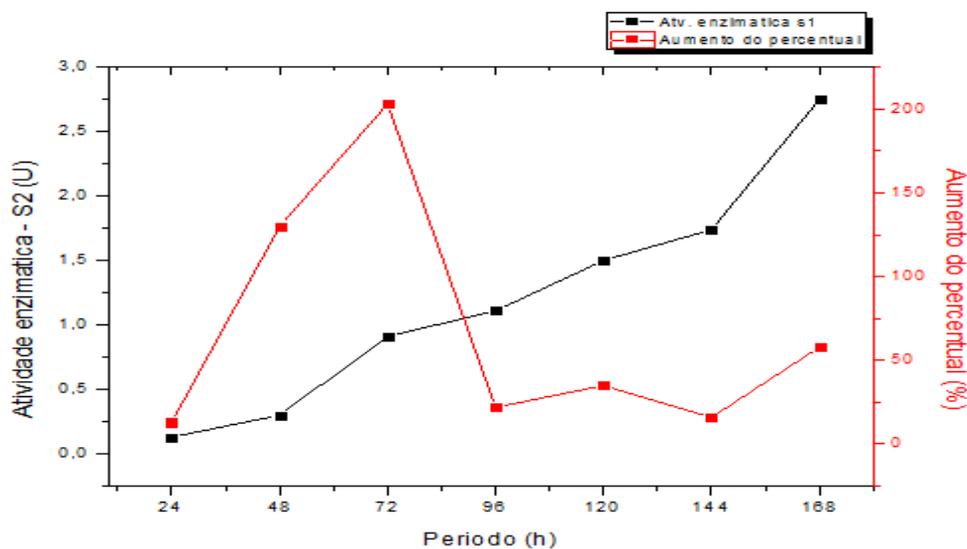
Na presença dos resultados obtidos experimentalmente em cada período de fermentação, obteve-se uma taxa média de atividade enzimática de 2,13 (U/dia) e 1,20 (U/dia) utilizando como substrato o farelo de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) e o farelo de arroz (*Oryza Sativa* L.), respectivamente.

Diante do gráfico 1, pode-se observar que a cepa de *Aspergillus niger* IOC 4003 produziu a enzima de interesse, invertase, com a utilização tanto do substrato 1 (farelo de algaroba) quanto do substrato 2 (farelo de arroz). Observa-se também, o crescimento exponencial de ambas as atividades invertásicas ao longo do processo fermentativo de 168 horas, ou, sete dias. Observa-se também, que o substrato com os níveis mais altos de atividade enzimática foi o farelo de algaroba, chegando a 4,98 U em 168 horas de cultivo.

**Gráfico 2** – Análise entre a atividade enzimática e o seu percentual de aumento da FES utilizando farelo de algaroba.



**Gráfico 3** – Análise entre a atividade enzimática e o seu percentual de aumento da FES utilizando farelo de arroz.



Pode-se observar que os valores em ambas fermentações foram crescentes, tendo um pico máximo no tempo de 96 horas no substrato farelo de algaroba e 72 horas no farelo de arroz. Em média, obteve-se um aumento da atividade enzimática de 37,16% durante o processo fermentativo do substrato 1 (algaroba) e 28,8% no processo fermentativo utilizando o substrato 2 (arroz).

**Tabela 6** – Unidades das atividades invertásicas em função do tempo de fermentação.

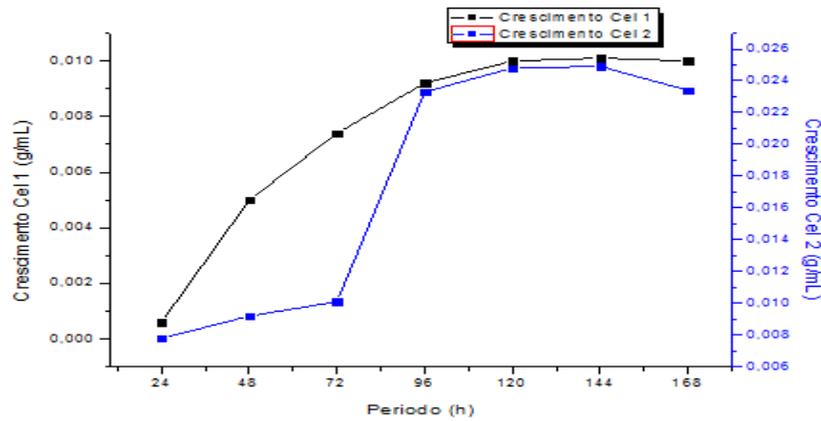
Período (h)	Atv. Enzimática – S1 (U)	Atv. Enzimática – S2 (U)
24	0,15	0,13
48	0,2	0,3
72	0,3	0,91
96	1,84	1,11
120	3,38	1,5
144	4,06	1,74
168	4,98	2,75

Avalia-se na Tabela 6 que de fato, a produção da enzima invertase foi satisfatória nos dois processos, contudo, há outras vertentes que devem ser analisadas, uma vez que os níveis da atividade enzimática não foram tão altos em comparação com alguns trabalhos já vistos na bibliografia.

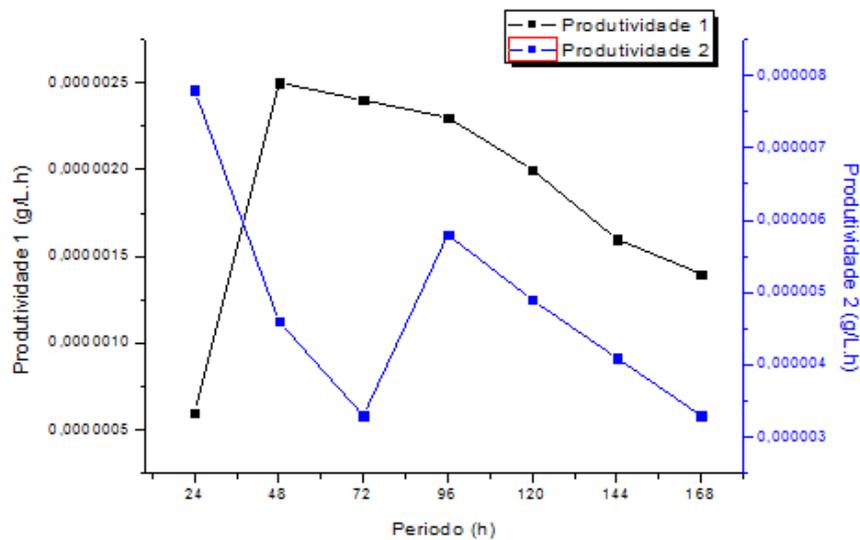
A discussão torna-se relevante pois há a efetividade da produção enzimática a partir dos substratos e micro-organismo utilizados, porém com níveis menores de atividade em comparação com o trabalho de ROCHA *et al.* (2010), o qual utiliza o farelo de arroz como substrato. Ressalta-se também que em sua pesquisa, ROCHA *et al.* (2010)., utiliza 30g do substrato para a sua fermentação, diferentemente da concentração de resíduo deste projeto, onde foi empregado 3g de resíduo para cada dia fermentado.

### 5.3 – Análise do crescimento celular e a sua produtividade

**Gráfico 4** – Curva de crescimento celular do *Aspergillus niger* por FES utilizando como resíduo o farelo de algaroba (Crescimento Cel 1) e farelo de arroz (Crescimento Cel 2).



**Gráfico 5** – Curvas de análise entre Produtividade 1 (Farelo de algaroba) e Produtividade 2 (Farelo de Arroz)

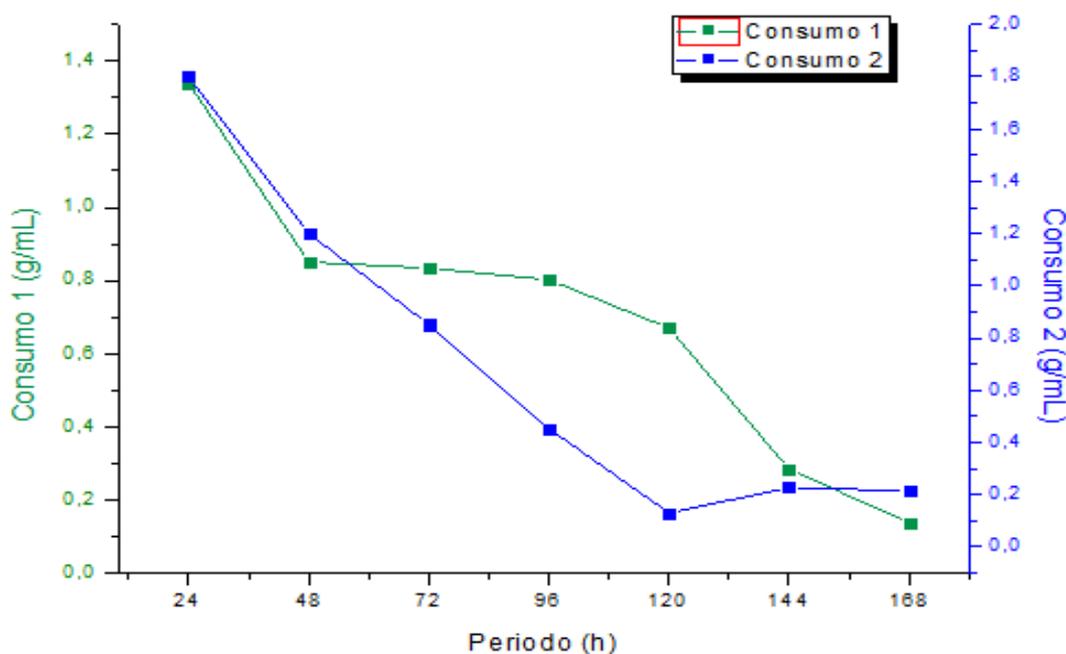


O crescimento celular foi obtido por peso seco conforme VAZ (2011), que é o método em que consiste em seguir a evolução do crescimento da concentração da biomassa fúngica produzida pelo processo fermentativo (g de massa seca / ml unidade de volume) em função do tempo (h). A curva apresentada no Gráfico 4 apresenta as várias etapas do crescimento microbiano do *Aspergillus niger* nas duas fermentações efetuadas. Observando-se o perfil de crescimento supracitado pode-se observar a ausência da fase lag, indicando a boa adaptação do metabolismo do microrganismo ao meio de cultivo estudado. A máxima concentração celular atingiu o valor de 0,01 g/mL no instante de 120 horas de cultivo e manteve-se até o término da fermentação utilizando o farelo de algaroba, já utilizando o segundo substrato, o farelo de arroz, a máxima concentração celular atingiu 0,0249 g/mL no instante de 144 horas de cultivo.

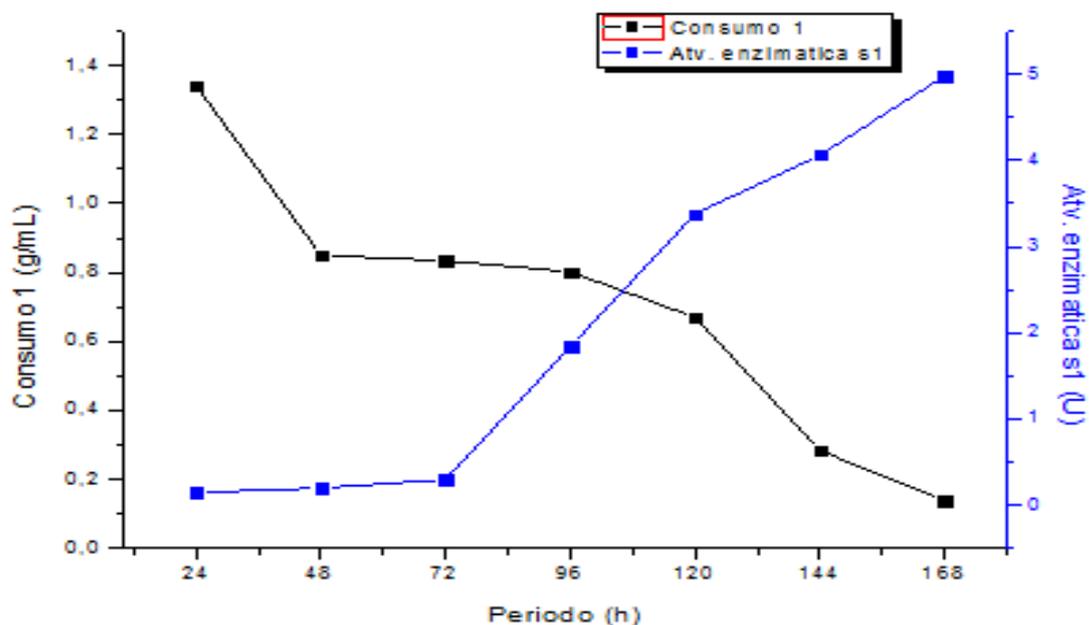
O comportamento da produtividade do crescimento celular está representado no Gráfico 5. Nota-se que a máxima produtividade ( $P_x$ ) ocorreu às 48 horas de cultivo com o farelo de algaroba atingindo o valor máximo de  $2,5 \times 10^6$  g/L.h, momento este que coincide com a fase log de crescimento celular já mencionado na Figura 5.4. Já a produtividade da fermentação utilizando o farelo de arroz, tem um pico máximo no 4º dia (96 horas) atingindo um valor máximo de  $5,8 \times 10^6$  g/L.h.

#### 5.4 – Consumo de substrato pelo *Aspergillus niger*

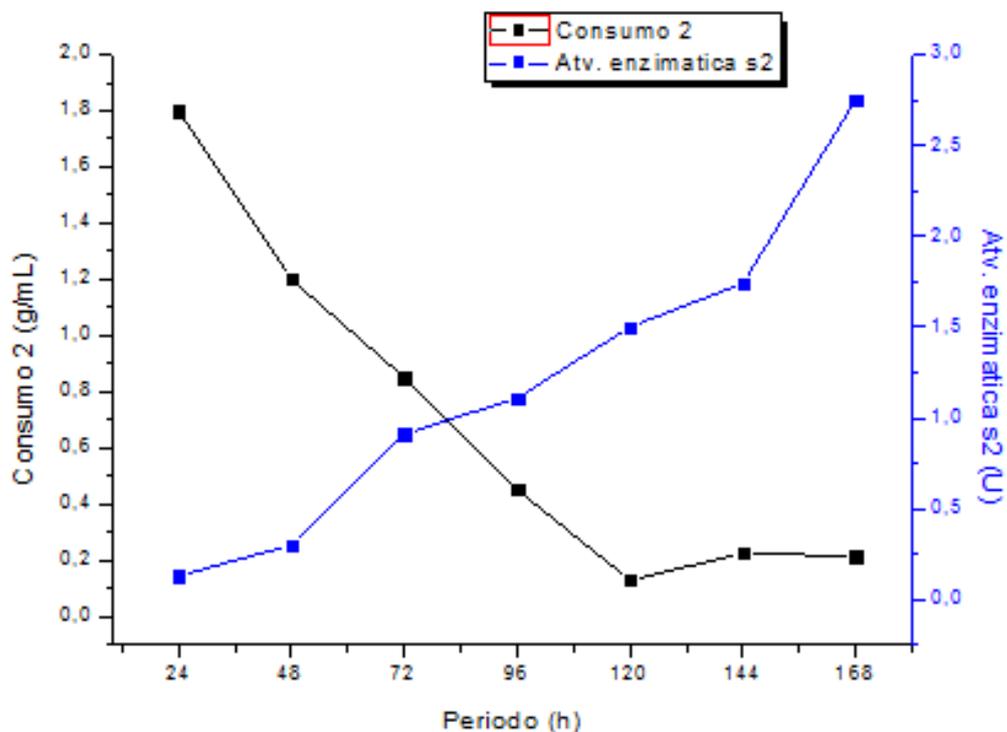
**Gráfico 6** – Análise comparativa do consumo de substrato do fungo filamentososo na fermentação em estado sólido em função do tempo.



**Gráfico 7** – Relação entre Consumo 1 e Atividade enzimática 1 (Farelo de algaroba).



**Gráfico 8** – Relação entre Consumo 2 e Atividade enzimática 2 (Farelo de Arroz).



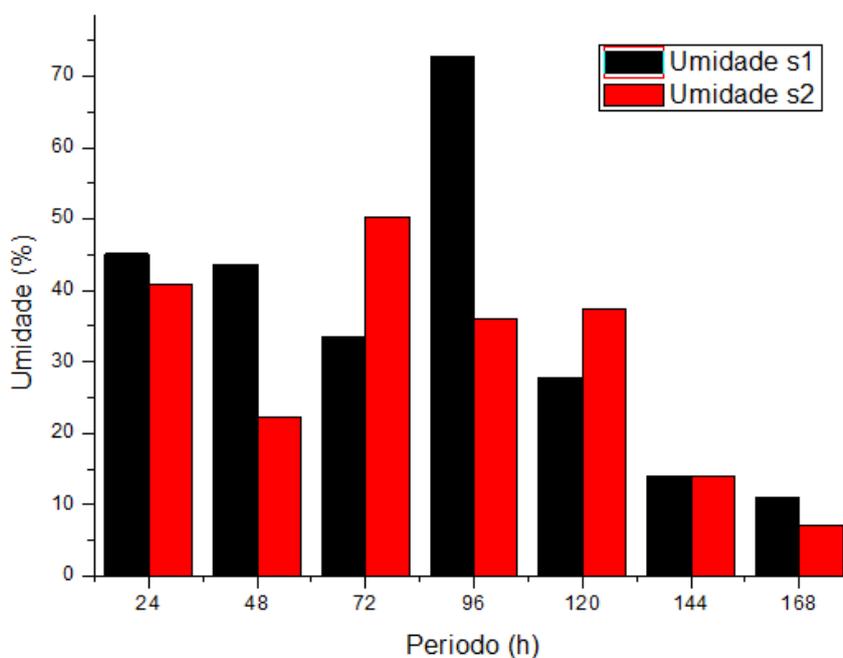
O Gráfico 6 relata o consumo alimentar do micro-organismo em função do tempo de fermentação. É indiscutível que este consumo de substratos foi bastante

satisfatório, uma vez que em ambos os casos, houve o decréscimo de nutrientes oriundos do meio de cultivo planejado.

Pode-se perceber diante dos gráficos 7 e 8, que o consumo de substrato foi eficaz comparando com os níveis de atividade enzimática para os dois casos. Vale enfatizar também, que há uma relação inversamente proporcional entre este decréscimo de substrato e o aumento da atividade enzimática, logo, a medida que os níveis do consumo de nutrientes foram reduzindo, ocorreu um aumento significativo das taxas da atividade enzimática nos dois processos fermentativos.

### 5.5 – Umidade relativa na fermentação em estado sólido

**Gráfico 9** – Teor de água (Umidade) das amostras em função do tempo.



A umidade das amostras é um dos fatores que mais influencia no processo de fermentação e varia de acordo com a natureza de cada resíduo utilizado, tipo de produto a ser sintetizado e a necessidade do micro-organismo. Níveis elevados de umidade podem causar uma diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aparição de contaminação, perda no volume de gás e a redução de troca de gases. Em contrapartida, os baixos níveis de umidade podem levar a um crescimento microbiano baixo em comparação com o ótimo, baixo grau de utilização do substrato e um crescimento na tensão da água (SANTOS, 2007).

A atividade da água se relaciona diretamente com a quantidade de água disponível para o desenvolvimento do crescimento microbiano. O teor de água do meio (umidade) indica a concentração de água existente em determinado suporte (material) sendo expresso em termos percentuais (SANTOS, 2007). A Figura 5.9, nos mostra a relação do teor de água (Umidade) presente nas amostras em função do período de fermentação.

Com base no Gráfico 9 que representa a umidade percentual das amostras enzimáticas no processo fermentativo, nas primeiras 24 horas de cultivo, as amostras com algaroba apresentaram maior umidade no valor de 45,1 %. O nível máximo de umidade foi verificado com 96 horas utilizando a algaroba como substrato (72,8%) e em 72 horas com o farelo de arroz (50,3%). Estes valores estão dentro dos padrões da fermentação em estado sólido, uma vez que os valores variam entre 18 e 85% segundo PARIS (2008).

Nos estudos de OLIVEIRA (2013), diz que a umidade ótima para o cultivo do micro-organismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água e os níveis ideais para o cultivo do *Apergillus niger* é em torno de 40%, enquanto a polpa de café é de 80%. Portanto as umidades obtidas, em média, são de 35,3% para o substrato algaroba e 38,7% para o farelo de arroz. Logo, estes resultados evidenciam a eficácia do processo fermentativo e reafirma que para este parâmetro, a utilização do farelo de arroz é ideal na FES.

## **5.6 – Análise da variação do pH no extrato enzimático da FES**

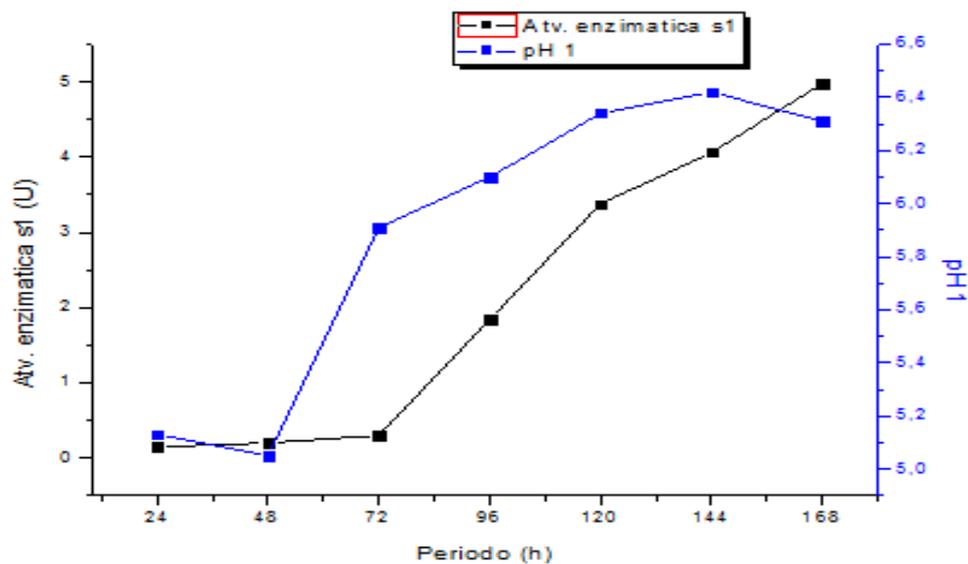
**Tabela 7** – pH das amostras enzimáticas em função do tempo de fermentação.

---

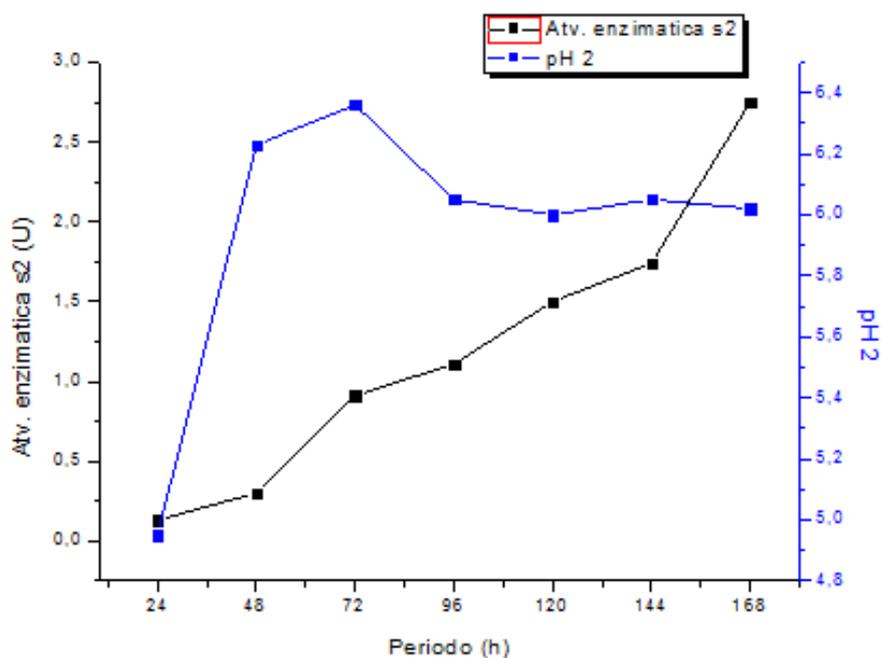
Período (h)	pH - S1 - Algaroba	pH - S2 - Arroz
24	5,13	4,95
48	5,05	6,23
72	5,91	6,36
96	6,1	6,05
120	6,34	6,00
144	6,42	6,05
168	6,31	6,02

---

**Gráfico 10** – Relação entre pH e atividade invertásica utilizando o farelo de algaroba em função do tempo.



**Gráfico 11** – Relação entre pH e a atividade enzimática utilizando o farelo de arroz em função do tempo.



O pH das amostras nas duas fermentações é expresso na Tabela 7, onde pode-se observar que em ambos processos enzimáticos, inicialmente, possuem os valores mais ácidos durante o período de fermentação.

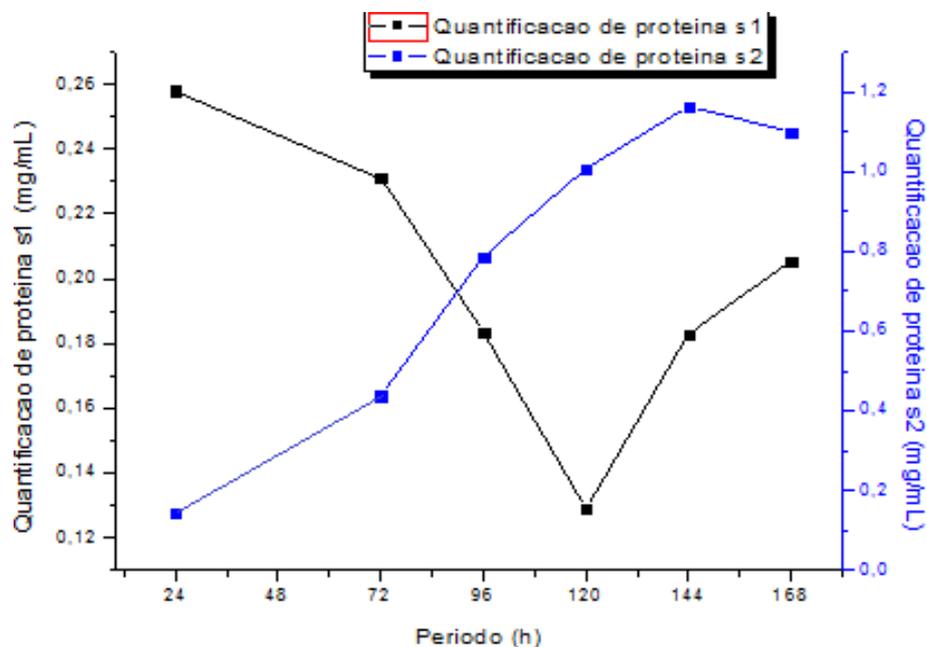
Os fungos filamentosos preferem o pH baixo para a manutenção do seu metabolismo nos padrões ideais em um processo de fermentação em estado sólido e pode variar entre 4,0 a 6,5 (CASTILHO, 1997). Com isso, podemos observar a relação entre variação de pH e atividade enzimática nas fermentações nos Gráficos 10 e 11.

O efeito do pH na qual o extrato enzimático do *Aspergillus niger* apresentou atividade máxima foi de 6,31 para a primeira fermentação e 6,02 para a segunda fermentação utilizando os farelos de algaroba e arroz, respectivamente. Outros pHs ótimos foram descritos com 3,85 para a invertase de *Pycnopus sanguineus* (QUIROGA *et al.*, 1995), 4,5 para o trabalho realizado com a enzima produzida por células de bambu (*Bambusa edulis*) (LIU *et al.*, 2006), 5,5 para a invertase produzida a partir da levedura *Candida utilis* (CHÁVEZ *et al.*, 1997) e 6,0 e 5,5 para invertases da bactéria *Zymomonas mobilis* intracelular e extracelular, respectivamente.

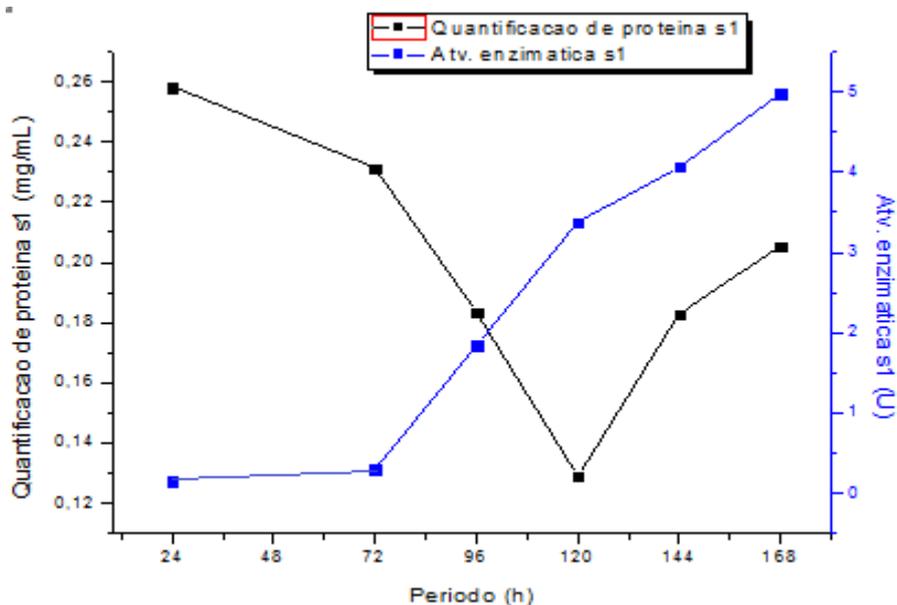
Por interferir diretamente com o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos, o pH é um parâmetro muito importante para a manutenção da estrutura protéica e da atividade das enzimas (COLLINS *et al.*, 1990). A mudança deste parâmetro atinge a ionização dos resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo, que estão envolvidos na ligação do substrato e sua transformação em produto (CHÁVEZ *et al.*, 1997).

## **5.7 – Estudo da quantificação de proteína no extrato enzimático ao longo do processo fermentativo**

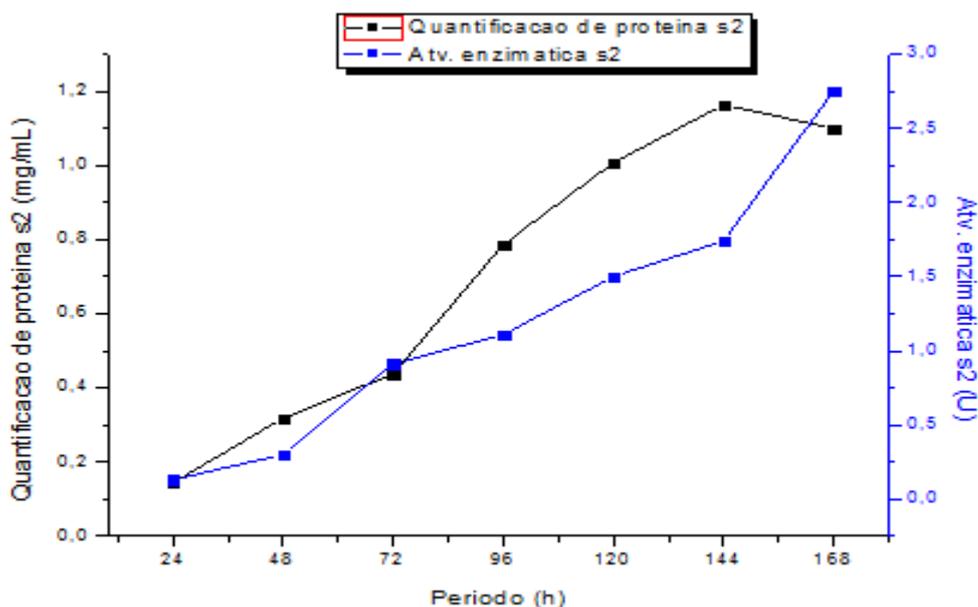
**Gráfico 12** – Análise da quantidade de proteínas presentes nas amostras enzimáticas em função do período de fermentação da FES.



**Gráfico 13** – Análise comparativa entre a quantidade de proteína presente na amostra e a atividade enzimática (substrato 1 – Algaroba).



**Gráfico 14** - Análise comparativa entre a quantidade de proteína presente na amostra e a atividade enzimática (substrato 2 – Arroz).



O gráfico 12 expõe a relação entre a quantificação da concentração de proteína bruta presente no extrato enzimático total a partir da FES utilizando os farelos de algaroba e arroz, respectivamente. Observa-se que os níveis de proteína em ambos os casos se divergem em função do tempo. Logo, na primeira fermentação (algaroba como substrato), ocorre uma considerável oscilação entre os valores da quantidade de proteína presente na amostra. Nota-se uma queda a partir das 24 horas, logo, de 0,26 mg/mL do ponto das 24 horas chegando a 0,22 mg/mL às 48 horas de fermentação. Houve outra grande queda na concentração das proteínas, uma vez que em 72 horas havia uma concentração total de 0,22 mg/mL e foi para 0,129 mg/mL em 120 horas de cultivo. A partir das 120 horas de cultivo, a quantidade de proteína foi aumentando exponencialmente.

No Gráfico 13 observa-se que mesmo com a oscilação da quantidade de proteína no extrato enzimático, houve o crescimento da atividade invertásica no processo fermentativo. O período mais expressivo de sincronismo entre estes dois parâmetros, foi a partir de 120 horas de cultivo, que mostra uma elevação da quantidade de proteína em torno de 0,08 mg/mL e 1,6 U de atividade enzimática.

Na segunda fermentação (Gráfico 14), nota-se um ótimo crescimento da quantidade de proteína no extrato enzimático. De 0,14 mg/mL presentes em 24 horas de cultivo, o aumento foi exponencial ao longo dos dias. A quantidade de proteína máxima foi obtida no 6º dia, 144 horas, com 1,16 mg/mL de proteína na amostra enzimática. Vale ressaltar que mesmo com a queda da quantidade de proteína no 6º dia para o 7º dia de fermentação, houve o aumento da atividade enzimática, permanecendo assim a similaridade entre os parâmetros, aumento proporcional e estabilidade do processo fermentativo.

## 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O rendimento da fermentação na produção de enzimas invertases utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* IOC 4003 como agente transformador sob fermentação em estado sólido (FES) utilizando dois resíduos (Farelo de algaroba e Farelo de arroz) como substrato foi bastante satisfatória;
- Pode-se perceber diante dos resultados obtidos que o consumo de substrato foi bastante eficaz e quando comparado com os níveis de atividade enzimática para nos dois casos, apresentou-se inversamente proporcional indicando assim um bom desempenho;
- Os níveis da atividade invertásica aumentaram exponencialmente em pequena escala até o último dia de fermentação. O pico de atividade enzimática na primeira fermentação (Farelo de Algaroba) foi de 4,98 U e 2,75 U na segunda fermentação (Farelo de arroz);
- Diante do perfil do crescimento celular, pode-se notar a ausência da fase lag promovendo assim uma excelente adaptação do micro-organismo em ambas fermentações. Houve um aumento crescente nos dois processos fermentativos tendo assim, uma simultaneidade com a atividade enzimática. Já na produtividade, o valor coincidiu com o perfil analisado anteriormente, exceto pela produtividade da segunda fermentação (Farelo de arroz) que apresentou duas quedas;
- O nível máximo de umidade foi verificado com 96 horas utilizando a algaroba como substrato (72,8%) e em 72 horas com o farelo de arroz (50,3%). Estes valores estão dentro dos padrões da fermentação em estado sólido, uma vez que os valores variam entre 18 e 85% segundo alguns autores descritos no trabalho;

- No perfil da curva de pH das amostras nas duas fermentações observa-se que, inicialmente, possuem os valores mais ácidos durante o período de fermentação compondo assim um caráter ácido para produção da enzima invertase;
- Já na quantificação da concentração de proteína bruta presente no extrato enzimático total a partir da FES, observa-se que há uma oscilação para o primeiro caso (Farelo de algaroba) e um ótimo aumento da concentração de proteína para o segundo caso (Farelo de arroz).
- Com os parâmetros avaliados neste trabalho, concluímos que há uma grande vantagem na utilização dos resíduos agroindustriais para a produção de invertase, uma vez que em ambos os casos, obtivemos a produção da mesma. Embora os níveis da atividade enzimática e crescimento celular estejam baixos, o resíduo mais indicado para este processo é o farelo de arroz, pois apresenta um bom desempenho dos parâmetros: Atividade enzimática, consumo de substrato, crescimento celular, pH e Quantificação protéica.

#### **Sugestões:**

- Indica-se para as próximas fermentações, uma caracterização mais adequada para os resíduos secos como hemicelulose, celulose, lignina, cinzas, entre outros;
- A introdução de novos resíduos na fermentação em estado sólido para a produção da enzima invertase;
- Contagem das células na solução de esporos por câmara de Neubauer para que possa ser inoculado na matriz sólida (Resíduo);
- Utilização de um planejamento experimental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROZ BRASILEIRO. **Cultura do arroz é destaque em estudo produzido pela Fiesp.** 2008. Disponível em : <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/080519.php>. Acesso em jun. 2015.

ARROZ BRASILEIRO. **Óleo de farelo de arroz também é opção para biodiesel,** 2007. Disponível em: <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/070521.php>. Acesso em jul.2015.

ASHOKKUMAR, B., KAYALVIZHI, N. & GUNASEKARAN, P. **Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation.** *Process Biochemistry.* n. 37, p. 331-338. 2001.

BARBOSA-FILHO, J.M., et al. **Uma revisão sobre ocorrência de sacarose no reino vegetal.** *Farmácia & Química.* v. 33, n. 23, p.6-22, 2000.

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotecnol.,** v. 66, p. 101-107, 1998.

BORGES, L. R.; LAZZARI, S. M. N.; PIMENTEL, I. C.; NOVA, M. X. V. **Diversity of filamentous fungi in soil with monoculture of yerba mate, *Llex paraguariensis* St. Hil.** *Ciência Agrária Ambiental.* Curitiba. 2011; (v. 9): 185-194.

BORZANI, W.; LIMA, U.A; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. – **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos,** vol. 3, São Paulo, Edgard Blücher LTDA, 2001.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial.** Sao Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 1, p. 254.

BRADFORD, M. M. **A rapide and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Anal Biochem. v. 72. p. 248-255. 1976.

BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; CARDOSO, J. P. **Imobilization of amyloglucosidase on alkalyne derivatives of metal-link activated inorganic supports.** Biotechnology Bioengineering. 1981; (v. 23): p. 2083-2092.

CARVALHO, G.G.P. **Capim-Elefanteemurchecido ou com farelo de cacau na produção de silagem.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. 69 pg, 2006.

CARVALHO, S. M. S. **Análise das enzimas amiolíticas produzidas por microrganismos isolados do Tarubá.** [Dissertação]. Manaus: Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1999.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** Tese (Mestrado) – Coordenação dos Programas de Pósgraduação de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 1997.

CASTILHO, L. R. **Recuperação e pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Engenharia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. **Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger***. *Bioresource Technology*, v.71,, p. 45-50, 2000.

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

CASTRO, R. J. S.; TORRES, M. B. O.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando torta de girassol como substrato**. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal, 2009.

CHAMPE, P.C.; HARVEY. R. A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2006.cap 5. p. 54-63.

CHÁVEZ, F. P.; et al. **Purification and characterization of invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases**. *Journal of Biotechnology*. v. 53, n.1, p. 67-74, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1990, 279 p.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1975. cap 8 . p. 139-152.

CONTE, A.J. **Valor nutritivo do farelo de arroz integral em rações para frangos de corte, suplementado com fitase e xilanase.** 2000, 164f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis.** 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000. p. 397.

CORREIA, R.T.P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*.** 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz.** Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B. **Carbohydrate-Active Enzymes server an integrated database approach.** In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 3-12, 1999.

COUTO, S. R.; SANROMÁN M. Á. **Application of solid-state fermentation to food industry: A review *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, 2006.**

DOMENE, S.M.A. **Estudo do valor nutritivo mineral do farelo de arroz. Utilização do zinco, ferro, cobre e cálcio pelo rato em crescimento.** 1996, 104f.. Tese (Doutorado). Universidade de Campinas.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção.** 2004. Disponível em:

<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/arroz> . Acesso em jun. 2015.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Utilização do farelo de arroz.** 2004. Disponível em: [http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/folhetos/arroz\\_farelo.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/folhetos/arroz_farelo.pdf) . Acesso em maio 2015.

ENGINEER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. **Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices.** *Reactive & Functional Polymers*, v. 45, p. 227-233, 2000.

FELIPE, M.G.A. **Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials.** In: SAHA, B.C.; HAYASHI, K. (eds.) *Lignocellulose Biodegradation*; American Chemical Society, cap. 18, 2004.

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

FERNANDES, L.P. et al. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FONTES, C. P. M. L. **Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas.** Dissertação. (Departamento de Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FREEMAN, D.W. **Use of by-product and nontraditional feeds for horses.** 2006. Disponível em: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>. Acesso em abr. 2015.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.** W.H. Freeman and Company, Nova York ed. 2, 640 p., 1995.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. **Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources.** *Enzyme and Microbial Technology*. n. 42, p. 52-57, 2007.

GURSËL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAAGCI, Y. **Immunoization of invertase and glucose oxidase in conducting H-Type polysiloxane/ polypyrrole block copolymers.** *Reactive & Functional Polymers*, v. 57, p. 57-65, 2003.

HARADA, M.H. et al. *Paenibacillus* sp. Strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose. **Microbiological Research**, v.163, n. 3, p.293-298, 2008.

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

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

<http://alumnobioe.blogspot.com.br/2013/08/reino-fungi.html>, acesso em 11/05/2015, às 03:04 am.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3 ed. São Paulo: 1985.

IRGA - INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ. **Farelo de arroz: uma nova visão**. 2008. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action>. Acesso em maio 2015.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAGCI, Y. **Immunobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices**. *European Polymer Journal*, v. 39, p. 2375 – 2381, 2003.

JOSAPAR. Disponível em: <http://www.josapar.com.br/> . Acesso em: jul.2015.

JULIANO, O.B. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. 2nd ed. St. Paul, EUA: The American Association of Cereal chemist's inc., 1994. pp.17-160.

JÚNIOR, I. R. **Controle de obras: Mecânica dos solos**. INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Cuiabá-MT, 2012.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR. A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo:Manole, 2005, 988 p.

KNORR, D. **Food Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. p. 383-399.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems- an overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger***. *Sci. Agric.*; Piracicaba. 1995; (v. 2): 299-304.

LIMA, P. C. F. **Comportamento silvicultural de espécies de Prosopis, em Petrolina – Pe, região semi-árida brasileira.** 1994. 110f. Tese (Doutorado) – Escola de Florestas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIMA, P. C. F. P. Juliflora mangement at the Brazilian Northeast. In: THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE ON PROSOPIS JULIFLORA. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PROSOPIS, 1988, Rome. **Anais...** Rome:FAO, 1988. p.153-162.

LIU, C. et al. **Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells.** *Food Chemisty.* n. 96, p. 621-631, 2006.

LUCARINI, A.C.; PESSOA – JR, A.; VITOLO, M. – **Variabilidade na determinação da constante cinética de Michaelis – Menten da invertase presente em células de *Saccharomyces cerevisiae*.** In: VIII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 8, Teresópolis, 2000.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).Disponível em [http://www.ppgbiotec.ufpr.br/teses\\_dissertacoes/realizadas.html](http://www.ppgbiotec.ufpr.br/teses_dissertacoes/realizadas.html) Consultado em 3 mai. 2015.

MAGALHÃES, K.A. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos, determinação e estimativa do valor energético de alimentos para bovinos.**Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 263 pg, 2007.

MARIOTTO, R. J. Estágio de Docência – Enzimas, Universidade de São Carlos; 2006.

MARQUEZ, L. D.S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas.** Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2007. 124p. Dissertação (Mestrado).

McCASKILL, D.R.; ZHANG, F. Use of rice bran oil in foods. **Food Technology**, v. 53, n.2, p.50-53, 1999.

MELO, G. G.; BRAZ, L. C. C.; AMADOR, V. C.; DIAS, E. C.; ALMEIDA, É. S.; SILVA, D. P.; BEZERRA, R. M.; COELHO, G. D. **Estudos preliminares sobre a atividade adsorbtiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus*.** In: I SENGEBBIO 2014. Sumé-PB, 2014.

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

MORAES, A. M. L.; BORBA, C. M.; COSTA, G. L.; RODRIGUES, K.; SARQUIS, M. I .M. **Fungos:** ferramentas na saúde pública. Disponível em : <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 01 mar. 2015.

MOURA, C. L.; PINTO, G. A.; RODRIGUES, S. **Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos.** Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 108. ISSN 1677-1915, Fortaleza, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica.** 6ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

MURRAY, R.K.; GRANNER, K.D.; RODWEL. V. W. HARPER: **Bioquímica Ilustrada.** 27 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. cap 7. p. 60-64.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 40 ed. São Paulo: Savier, 2006. p. 190- 237.

NOSB. **National Organic Standards Board. Enzymes**, Plant and Fungal, 1999. Disponível em: [http://www.omri.org/Enzymes\\_processing.pdf](http://www.omri.org/Enzymes_processing.pdf) . Acesso em: 23 de abr, 2015.

OLIVEIRA, A. C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga**. Dissertação. (Faculdade de Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

ORTHOEFER, F. Rice bran oil: health lipid source. **Food Technology**, v. 50, n.12, p.62-64, 1996.

PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed Column Bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14. 1992. p. 486-488.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; SOCCOL, C.R. ; NIGAM, P. **Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes**. In: Current Science, v. 77. n.1 Jul, 1999. p. 149-161.

PANDEY, A. **Aspects of fermenter design for solid state fermentations**. Process Biochemistry, v.26, p.335-361, 1991.

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

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

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

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R; LEON, J. A. R. ***Solid-state fermentation in biotechnonogy: fundamentals and applications.*** New Delhi: Asiatech, 2001.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.** Dissertação. (Centro de Engenharias e Ciências Exatas), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PIETRO, R.; SAID, S. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirao Preto: Summa, 2004. p. 416.

PINTO, G. A.S.; BRITO, E.S.; SILVA, F.L. H.; SANTOS, S.F.M.; MACEDO, G.R. **Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais.** *Rev. Química. Ind.*, n.724, p. 17-20, 2006.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço**

**de Mandioca.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2002. 81 p.

QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. **Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*.** *Biochimica et Biophysica Acta-Protein structure and molecular Enzymology*, n.1251, p. 75-80, 1995.

QURESHI, A.A. et al. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. **Atherosclerosis**, v.161, p.199-207, 2002.

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

RIOCON-FAZENDAS REUNIDAS RIO DE CONTAS LTDA, **Farelo de Algaroba integral (Processado)** Disponível em <http://www.riocon.com.br>, acesso em 16.06.2015.

RIOCON-FAZENDAS REUNIDAS RIO DE CONTAS LTDA. **Laudo de Análise do farelo de Algaroba** (AGROCERES/SP), enviado pela RIOCON. Fazendas Reunidas Rio de Contas/BA1pg, 2012.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** Dissertação. (Faculdade de Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia; Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

RODRIGUES, M.V.N.; RODRIGUES, R.F.A.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, S.R.; FRANCO, T. **Produção de xarope de açúcar invertido por hidrólise heterogênea, através do planejamento experimental.** *Ciência e tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 103-109, 2000.

ROSSI, H.I.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.6, p. 887-891, 2001.

RUBIO, M.C., RUNCO, R., NAVARRO, A.R. **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*.** *Phytochemistry*, v.61, p.605-609, 2002.

RUBIO, M.C., MALDONADO, C.M. **Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*.** *Current Microbiology*, v.31, p.80-83, 1995.

SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** 1. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416p.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal, RN. 2007.

SANTOS, V.M.C.S. et al. Estudo da fração de inoculo e da suplementação da palha de bananeira para produção de *Pleurotus sajor- caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, v.1, n.1, p.64-67, 2000.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterization of Invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solidstate fermentation. **J. Int. Food Sci. Techn.**, p. 1365-2621, 2007.

SILVA, D.D.V. Efeito do Ácido Acético na Bioconversão de Xilose em Xilitol por *Candida guilliermondii* em Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-Açúcar. 2001. 73 f. Dissertação (Mestrado). FAENQUIL/ Departamento de Biotecnologia. Lorena.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 3.ed. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, J. N. C.; SILVA, E. L.; et al. Uso da farinha integral de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) D.C.) na alimentação de codornas japonesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.3, p. 1789-1795, 2002a.

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

SMITH, J. **Food Additive User's Handbook**. New York: Blackie and Son Ltd., 1991. p. 131, 144.

SOCCOL, c. r; VANDENBERGHER, L. P. S. **Overview of applied solid- state fermentation in Brazil**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUZA, R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato**. Dissertação de Mestrado em Engenharia

Química da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2008.

SUMANTHA, A. et al. Rice bran as substrate for proteolytic enzyme production. **Braslian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.5, p. 843-851, 2006.

TANIWAKI, M. I. I.; FONSECA, I. I.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. **Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção**. Sc. Agric. Piracicaba. 1993; (v. 1): 140-150.

TOMOTANI, E. J., VITOLLO, M. **Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor**. *Journal of Food Engineering*. n. 80, p. 662-667, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 827.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas**. Química Nova, v.30, n.2, 388-394, 2007.

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CAPPELLE, E. R. **Tabela brasileira de composição de alimentos para bovinos**. viçosa: UFV, 2006.

VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; FRAISSINET- TACHET, L.; VISSER, J. *Aspergillus* as host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends Biotechnol.**, v. 15, n. 7, p. 256-263, 1997.

VAZ, M.R.F.; FRANCA, R.L.S.; ANDRADE, S.S.L.; SOUSA JUNIOR, F.C.; SANTOS, E.S.; MARTINS, D.R.A.; MACEDO, G.R. **Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmaniachagasi* in recombinant *Escherichia coli***. Braz. J. Microbiol.v.42, p.1390-1396, 2011.

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

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

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas immobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. Cap. 4, p. 35-85, 2004.