



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**PRODUÇÃO DE AMILASE EM FARELO DE MILHO
POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA**

MÔNICA CAVALCANTI PEDROSA BRANDÃO

Campina Grande – PB
SETEMBRO, 2012

PRODUÇÃO DE AMILASE EM FARELO DE MILHO POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

MÔNICA CAVALCANTI PEDROSA BRANDÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof.a: Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande
Setembro 2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

B819p Brandão, Mônica Cavalcanti Pedrosa
Produção de amilase em farelo de milho por fermentação semi-sólida / Mônica Cavalcanti Pedrosa Brandão. – Campina Grande, 2012.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Líbia de Sousa Conrado oliveira.

Referências.

1. *Aspergillus niger*. 2. Ração Animal. 3. Grits. 4. Enzimas Amilolíticas.

I. Título.

CDU 577.15(043)

PRODUÇÃO DE AMILASE EM FARELO DE MILHO POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Dissertação aprovada em 28 de setembro de 2012.

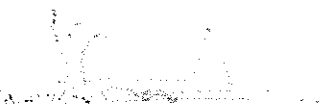
BANCA EXAMINADORA



Prof.a: Dra. Libia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (CCT UFCG)



Prof.: Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (CT UFPB)



Prof.a: Dra. Josilene Assis Cavalcanti
Examinador Externo – (UFCG Pombal)



Prof.a: Dra. Maria Wilma Nunes Cordeiro Carvalho
Examinador Interno – (CCT UFCG)

Campina Grande – PB
Setembro, 2012

A Deus.

Ao meu pai Arlindo Cavalcanti Pedrosa.

Ao meu marido, Alberto Brandão.

Aos meus filhos Carolina e André.

E aos meus irmãos.

Por toda força.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha professora orientadora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pelo voto de confiança, pelas contribuições científicas, incentivo, amizade e oportunidade de trabalhar na área de Engenharia Bioquímica.

Ao professor e amigo Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva agradeço todo incentivo e auxílio científico prestado durante o andamento desse trabalho.

Ao meu marido Alberto Brandão Torres Neto, agradeço o seu carinho, amor, compreensão e sabedoria. As discussões e troca de ideias contribuíram muito para o meu crescimento durante esse processo.

Aos meus filhos Carolina e André pelo incentivo de chegar até aqui e de seguir em frente por toda vida.

Aos meus pais Arlindo Cavalcanti Pedrosa e Maria Salete Mendes Pedrosa por todos os esforços para construir a pessoa que sou hoje. Em especial ao meu pai Arlindo por ter sido o melhor pai que uma pessoa pode pensar em ter na vida.

Aos meus queridos irmãos Antônio, Verônica e Arlindo Filho por toda força, confiança, carinho e ajuda durante toda minha vida.

À professora Ângela Santiago e a Doutoranda Siumara Alcântara, agradeço toda a disposição de ensinar e de transmitir seus conhecimentos sem esforços.

Aos colegas de laboratório, Paloma, Natália, Layana, Kátia, Ezenildo, Neto, Flávia, Alessandra, Vitória e Simone, agradeço a amizade e companheirismo durante essa trajetória.

Ao programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, representado pelos professores e funcionários agradeço pelo apoio para o bom andamento do curso, em especial ao técnico Jardes Caiçara.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, por ceder o micro-organismo utilizado no estudo.

À Asa Indústria e Comércio Ltda (Vitamilho), agradeço pela doação do farelo de milho e pelos quatro anos e meio de indústria que foram primordiais na minha formação profissional e pessoal, em especial a Gerente de Produção e Desenvolvimento da Asa, Ângela Limeira e aos colegas de trabalho Juliana Araujo, Maria do Socorro Almeida e Hélio Batista.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Objetivos	04
2.1. Objetivo Geral	04
2.2. Objetivos Específicos	04
3. Revisão Bibliográfica	05
3.1. Enzimas, Amido e Enzimas Amilásicas	05
3.2. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal	11
3.3. Fermentação Semissólida	15
3.4. Gênero <i>Aspergillus</i>	20
3.5. Farelo de Milho	22
3.6. Hidrólise Enzimática	24
4. Materiais e Métodos	27
4.1. Micro-organismo	27
4.2. Substrato	27
4.3. Caracterização do Substrato	27
4.3.1. Granulometria	27
4.3.2. Densidade Aparente	28
4.3.3. Umidade	28
4.3.4. pH	28
4.3.5. Cinzas	29
4.3.6. Teor de sólidos solúveis (°Brix)	29
4.3.7. Teor de açúcares redutores (AR)	29
4.3.8. Pectina	30

4.3.9. Celulose	30
4.3.10. Proteína bruta	31
4.3.11. Amido	31
4.3.12. Extrativos	32
4.4. Processo Fermentativo	33
4.4.1. Inóculo e Obtenção da Suspensão de Esporos	33
4.4.2. Processo de Fermentação	34
4.4.3. Extração das Enzimas	34
4.4.4. Medida da Atividade Amilásica	34
4.4.5. Planejamento Experimental	35
4.4.6. Hidrólise Enzimática do Farelo de Milho	37
5. Resultados e Discussões	38
5.1. Caracterização Físico-química do Farelo de Milho	38
5.2. Processo Fermentativo e Análise Estatística	40
5.3. Hidrólise Enzimática do Farelo de Milho	45
6. Conclusão	47
7. Referência Bibliográfica	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade Amilásica
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
AR	Açúcares Redutores (g/g)
DCCR	Delimitação Composto Central Rotacional
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
F. ajuste	Falta de Ajuste
F cal	Valor de F calculado para o Teste F
FM	Farelo de Milho
FSS	Fermentação Semi-Sólida
F tab	Valor tabelado de F
LEB	Laboratório de Engenharia Química
N	Concentração de Sulfato de Amônio
PC	Ponto Central
PNA	Polissacarídeos Não-Amiláceos
SQ	Soma quadrática
TGI	Trato Gastrointestinal
U	Umidade inicial do meio
t	Tempo de Fermentação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Conformação estrutural e fórmulas químicas do amido: a)amilose e b)amilopectina (ROBYT, 1998)	07
Figura 2 - Classificação das enzimas amilolíticas (NIGHAM e SINGH,1995)	08
Figura 3 - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos	15
Figura 4 - Micrografia eletrônica do fungo <i>Aspergillus niger</i>	21
Figura 5 - Anatomia do grão de milho e suas partes	23
Figura 6 - Perfis granulométrico do farelo de milho	39
Figura 7 - Perfil cinético do processo fermentativo do farelo de milho para os ensaios do ponto central	41
Figura 8 - Superfície de resposta para a atividade amilásica (AA)	42
Figura 9 - Perfil cinético do processo de produção de amilase pela FSS em farelo de milho, sem adição da fonte de nitrogênio	43
Figura 10 - (a) Perfil cinético da hidrólise enzimática para as diferentes massas do FM e (b) Perfil de velocidade de hidrólise	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas utilizadas na avicultura	12
Tabela 2 – Produtos obtidos industrialmente empregando a FSS	19
Tabela 3 – Produção de enzimas por <i>Aspergillus niger</i>	21
Tabela 4 – Valores médios das avaliações químicas do farelo de milho e do milho	24
Tabela 5 – Comparação da hidrólise enzimática e ácida	25
Tabela 6 – Níveis de variáveis do planejamento experimental fatorial	36
Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental fatorial (DCCR)	36
Tabela 8 – Caracterização físico-química do farelo de milho	38
Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial 22+3pc+configuração estrela (DCCR)	40
Tabela 10 – Anova para a resposta atividade amilásica	42

RESUMO

A aceitação das enzimas pela indústria de alimentação animal tem sido cada vez maior devido ao aumento do conhecimento sobre suas funções e propriedades. O objetivo principal de utilizar enzimas nas dietas das aves é de melhorar a eficiência da produção avícola através de uma melhor utilização da ração, pelo aumento da digestibilidade dos alimentos com redução da perda dos nutrientes pelas fezes, sendo possível o uso dos alimentos alternativos sem afetar o desempenho desses animais. O objetivo desse trabalho foi produzir enzimas amilolíticas fúngicas por fermentação semissólida (FSS) usando como agente metabolizador o *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 e como substrato o farelo de milho, resíduo do processamento industrial a seco do milho, constituído de casca, gérmen e porções de grits (pequenas frações do milho), visando observar o potencial desse substrato como produtor das enzimas e a ação das mesmas em hidrolisar o farelo de milho para que o mesmo possa ser usado como ração animal. Utilizou-se como ferramenta a metodologia de planejamento experimental fatorial 2^2 para verificar os efeitos dos parâmetros umidade e concentração da fonte de nitrogênio no processo de fermentação. Através da caracterização do substrato, constatou-se que o farelo de milho possui 51% de amido, sendo assim uma fonte potencial de carboidrato para a produção de amilases. O acompanhamento cinético mostrou que as melhores condições para a produção da amilase foram atingidas em 52 horas de fermentação com umidade inicial do meio de 41% (b.u) obtendo uma atividade enzimática de 347U/g de meio fermentativo. A superfície de resposta mostrou que os maiores valores de atividade foram obtidos quando houve diminuição da umidade inicial independente da concentração de nitrogênio. O estudo da hidrólise do farelo de milho com o extrato enzimático mostrou que as enzimas realizam a quebra da cadeia de polímeros de amido, transformando-a em estruturas menos complexas, tendo um potencial como suplementação nas dietas dos frangos de corte, através da melhor disponibilidade dos nutrientes da ração.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, ração animal, grits, enzimas amilolíticas.

ABSTRACT

The acceptance of enzymes by the feed industry has been increasing because of the increase of knowledge about its functions and properties. The main purpose of using enzymes in the diet of the birds and to improve the efficiency of poultry production through better use of the ration, by increasing the digestibility of the food to reduce the loss of nutrients by feces, and it is possible the use of alternative foods without affecting the performance of these animals. This work's purpose was produce fungal amylolytic enzymes by fermentation process in semi-solid state (SSF), using as agent the fungus *Aspergillus niger* mutant CCT 0916, applying as substrate corn bran, waste processing industrial dry corn, consisting of bark, and germ portions of grits (a small fraction of the endosperm), aiming observe the potential of this substratum as enzyme producer and their action to hydrolyze corn bran to be used in animal ration. Was used as tool the methodology of factorial experimental design 2², in order to verify the effects of moisture and concentration parameters of the nitrogen source in the fermentation process. Was accomplished the physic-chemical characterization of the substratum in order to know important parameters for the SSF process such as: particle size, pH, ash, moisture, ° Brix, reducing sugars, starch, cellulose, protein and pectin. The kinetic monitoring show that the best amylase's production conditions were reached in 52 hours of fermentation with initial moisture conditions of 41% (b.u) and without the nitrogen source addition, obtaining an enzyme activity of 346.83 U / g of fermentative environment. The response surface revealed the bigger activity values were obtained when decreasing the initial moisture independent of the concentration of nitrogen. The study of the hydrolysis of corn bran with the enzyme extract has shown that the enzymes perform breaking the polymer chain of starch, making it a less complex structure, having a potential supplementation in the diets of monogastric animals by better availability of nutrients in the ration.

Key Words: *Aspergillus niger*, animal ration, grits, amylolytic enzymes.

1. Introdução

Nos últimos anos a produção e o consumo de carne de frango e as exportações aumentaram muito se comparado a outros produtos (NUVITAL, 2000). A relação adequada entre demanda e fornecimento tornou-se um referencial na produção avícola para manter-se no mercado competitivo.

As enzimas podem contribuir a partir do momento que reduzem os efeitos dos fatores antinutricionais presentes em quase todos os alimentos (COUSINS, 1999), aumentando a digestibilidade dos nutrientes, e como consequência, permitem alterações nas formulações das rações de forma a minimizar o custo, maximizando o uso de ingredientes energéticos e protéicos nas rações (ARAÚJO, 2004). Além disso, as enzimas minimizam o impacto da produção avícola no meio ambiente causado pelos nutrientes excretados nas fezes e potencializam a ação das enzimas endógenas.

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações animais podem ser divididas em dois tipos: 1) enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases) e 2) enzimas que esses animais não podem sintetizar e/ou sintetizam em pequenas proporções (β -glucanases, pentosanas, e α -galactosidases) (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

As amilases promovem a hidrólise do amido em açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos (MINAFRA, 2007). Na alimentação animal as amilases proporcionam a suplementação de enzimas endógenas, com a degradação mais eficiente do amido, melhorando a digestibilidade dos alimentos dos animais monogástricos.

Ghazalah *et al.* (2005) afirmam que a suplementação enzimática melhora o desempenho animal e permite a redução de energia na formulação das rações animais pela redução ou eliminação dos fatores antinutricionais. Definem-se fatores antinutricionais como sendo aqueles gerados em alimentos in natura, pelo metabolismo normal da espécie da qual o material se origina, e por mecanismos diferentes, decomposição ou inativação de alguns nutrientes, diminuição utilização digestiva ou metabólica do alimento, no qual exerce efeitos contrários à nutrição adequada. Apesar de não apresentarem toxicidade, a presença desses fatores no alimento resulta em crescimento reduzido, conversão alimentar ruim, alterações hormonais e esporádicas lesões nos órgãos (COUSINS, 1999).

Trabalhos realizados têm demonstrado respostas positivas quanto à digestibilidade de nutrientes e ao desempenho das aves alimentadas com rações à base de milho e soja, quando estas foram suplementadas com enzimas, como carboidrases, proteases, amilases, pectinases e alfa-galactosidase, portanto, o uso de enzimas na alimentação animal pode aumentar a eficiência de produção (NUVITAL, 2000).

Zanella *et al.* (1999) verificaram que a suplementação de amilase e protease na dieta a base de milho e soja para frangos de corte, reduziu a síntese destas enzimas endógenas em 23,4% e 35,5%, respectivamente. Supõe-se que a secreção de enzimas pancreáticas seja afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado e ou substratos ou produtos de hidrólise.

Rodrigues *et al.* (2003), estudando o efeito da suplementação enzimática no desempenho de frango de corte, digestibilidade de nutrientes e valores energéticos, concluíram que, a adição de um complexo enzimático contendo xilanase, amilase e protease, em rações para frangos de corte (14 a 27 dias de idade) melhorou a digestibilidade da proteína bruta, do amido e a energia digestível das rações.

Com a ajuda de bactérias e fungos, a tecnologia da fermentação tem produzido uma grande quantidade de enzimas que podem degradar várias formas de amido, açúcares, proteínas, fósforo e celulose para uma absorção mais rápida no trato digestivo (COSTA *et al.*, 2007). Vários complexos enzimáticos têm sido utilizados para solucionar problemas digestivos, onde seu benefício terapêutico é muito reconhecido.

Uma das alternativas para a produção de enzimas é através da Fermentação Semissólida (FSS). A fermentação semissólida pode ser definida como processos que referem-se à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas na matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SCHMIDELL *et al.*, 2001) Essa técnica apresenta várias vantagens sobre a Fermentação Submersa destacando-se a facilidade de manuseio, o baixo custo operacional e a obtenção de enzimas a partir de reaproveitamento de diversos tipos de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, que apresentam baixos custos para aquisição e em muitos casos, são considerados problemas ambientais. Desse modo, a FSS contribui para a diminuição de poluentes sólidos, transformando-os em produtos de alto valor agregado como: enzimas, polissacarídeos, antibióticos, dentre outros (SHIOTA *et al.*, 2001).

O milho contribui normalmente com 55 a 65% na composição das rações, e representa aproximadamente 40% do seu custo. Como a maioria dos cereais, por ser uma dieta de baixa digestibilidade devido à presença de fatores antinutricionais assim como o sorgo e a soja, está sendo pesquisadas enzimas para sua adição como a amilase, protease, pectinase, lipase e xilanase, visto que são os ingredientes mais utilizados nas condições brasileiras de produção animal e podem ter a digestibilidade melhorada (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

Desta forma também é evidenciada a importância em viabilizar o uso de fontes energéticas alternativas ao milho. Neste sentido, o farelo de milho (FM), um subproduto do processamento industrial a seco do milho, constituído de casca, gérmen e porções de grits (pequenas frações do milho), encontra-se disponível para o consumo animal.

Propõe-se através de um processo de fermentação semissólida, utilizar o farelo de milho como substrato na produção de amilase, tendo como motivação da pesquisa o uso do substrato para produção da enzima, sendo a mesma fonte de nutrientes que comumente é utilizado nas dietas das aves, uma vez que essa enzima produzida e posta em contato com o farelo de milho melhora significativamente a digestibilidade desse alimento consumido por esses animais, através da complementação das enzimas digestórias endógenas (amilases), tornando assim certos nutrientes disponíveis para absorção, além de aumentar o valor energético dos ingredientes de menor custo. Deve-se ressaltar que pela literatura consultada nas mais diversas bases de pesquisas não foram encontrados artigos que referenciasse a produção de enzimas usando como substrato o farelo de milho, bem como, esforços de melhorar a sua atividade nutricional. A presente pesquisa concentrou-se em verificar a viabilidade da produção de enzimas amilásicas no farelo de milho por FSS, visando futuramente verificar o efeito da mesma na alimentação das aves com o farelo de milho.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi o estudo da produção de amilase (cinética fermentativa), usando como substrato o farelo de milho, utilizando o fungo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o substrato (farelo de milho), quanto à granulometria, densidade aparente, umidade, cinzas, teor de açúcares redutores, teor de sólido solúvel (°Brix), amido, proteína total, celulose e pectina, através da caracterização;
- Acompanhar a cinética de FSS para a produção de amilase (cinética fermentativa) com avaliação da influência das variáveis umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, aplicando como ferramenta o planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central;
- Verificar se o extrato enzimático produzido provoca a hidrólise enzimática das amilases no farelo de milho, através do acompanhamento cinético da hidrólise do amido em glicose.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Enzimas, Amido e Enzimas Amilásicas

Predominantemente, as enzimas são classificadas como proteínas globulares. De forma simplificada, como definido por CHAMPE e HARVERY (1989), as enzimas atuam como catalisadores biológicos, diminuindo a energia de ativação e acelerando a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo.

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

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

A produção de enzimas é um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em amplo desenvolvimento.

A maioria das enzimas produzidas comercialmente são de origem microbiana devido a uma série de vantagens: a produção pode ser aumentada facilmente devido a sua diversidade, a sua sensibilidade à alterações genéticas permite obtenção de linhagens melhoradas quanto à produção e qualidade, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais e melhor desempenho operacional e econômico, quando comparados aos processos de extração de enzimas de tecidos animais e vegetais (NOSB, 1999).

Ressalta-se, ainda, que a condução dos processos para obtenção das enzimas microbianas pode ser controlada, para atender as necessidades do mercado (NOSB, 1999). Especialmente no Brasil, por suas características climáticas, existe abundância de substratos, recursos renováveis,

que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial.

Dentre os campos mais promissores das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, destaca-se a tecnologia enzimática. De acordo com Mitidieri *et al.* (2002), os processos industriais biocatalisados apresentam muitas vantagens como: menor impacto ambiental, menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. Além de poderem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente, provocam o desgaste de materiais e perigo ao ambiente de trabalho.

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

São inúmeras as aplicações envolvendo enzimas, incluindo-se as relacionadas à produção de animais de interesse econômico e social. Segundo Silva (2009) sabe-se que no trato gastrointestinal (TGI) dos animais, as enzimas exógenas exercem ação digestiva complementar (ou isolada) às existentes, isso acontece devido a sua atuação sobre substratos alimentares, havendo assim uma maior incorporação de nutrientes ao metabolismo celular, aumentando o valor energético de ingredientes mais baratos.

Uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores, composto inteiramente de D-glicose, o amido constitui também uma fonte de energia essencial para muitos organismos, inclusive o homem.

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza e depois da celulose, é o principal carboidrato sintetizado pelas plantas. Composto de D-glicose esse polissacarídeo é facilmente assimilado na dieta humana e representa uma das principais fontes de energia alimentar em todo mundo, por fazer parte dos principais alimentos base da maioria das populações, como o milho, batata, trigo e arroz. O amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado, gerando glicose, maltose, e xaropes de oligossacarídeos de menores massas moleculares, que por sua vez podem ser utilizados para a produção de outros compostos químicos e também como substratos em fermentações (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

De acordo com Laszlo *et al.* (1986), o amido é acumulado nos vegetais na forma de grânulos insolúveis, os quais são compostos basicamente de dois polímeros quimicamente muito parecidos: a amilose e a amilopectina que aparecem na proporção média de 25% e 75%, respectivamente.

Na Figura 1 é mostrada a estrutura da amilose e da amilopectina.

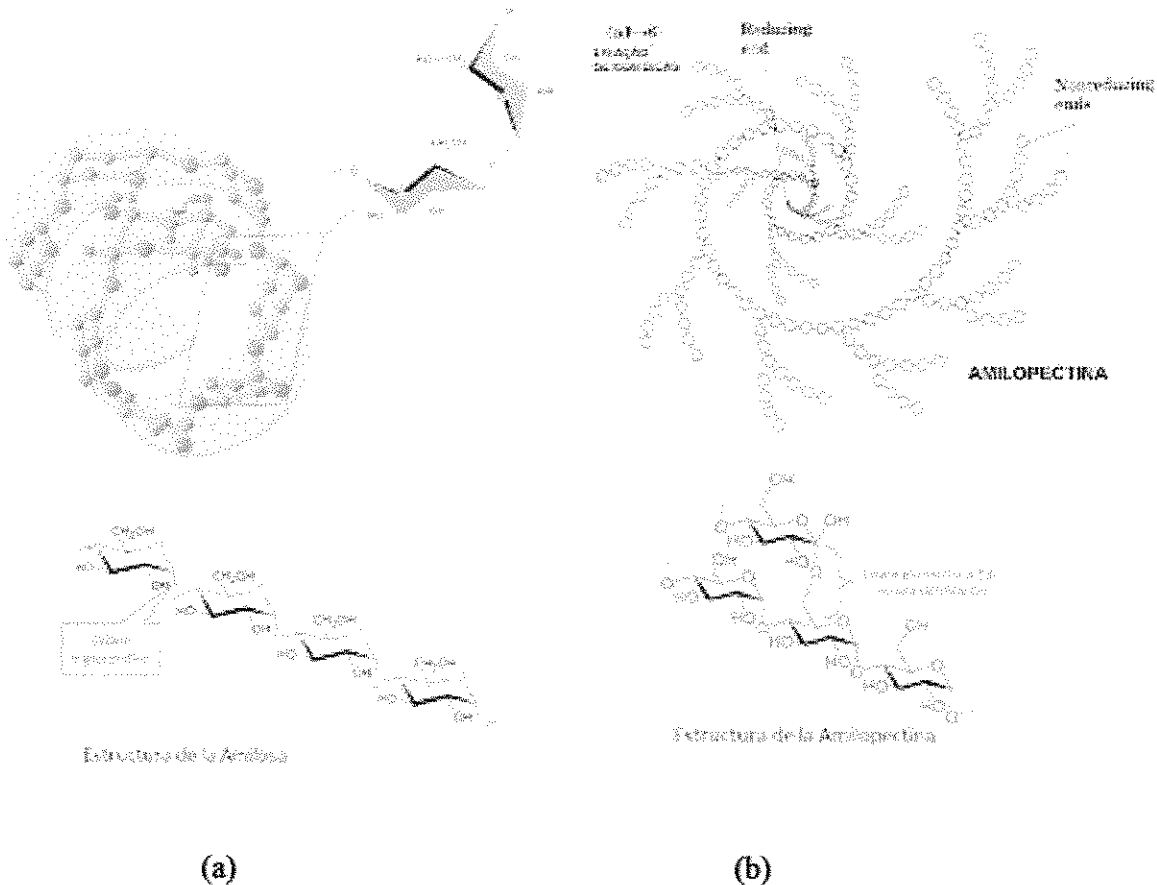


Figura 1- Conformação estrutural e fórmulas químicas do amido: a) amilose e b) amilopectina (ROBYT, 1998)

A amilose é um polissacarídeo formado de cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas α -1,4. Cada volta da espiral pode ser formada por cerca de seis unidades de glicose, já a amilopectina constitui a fração altamente ramificada do amido, possuindo várias cadeias de resíduos de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas α -1,4 das quais partem ramificações com ligações α -1,6 a cada série de 25 a 30 resíduos de glicose (LASZLO *et al.*, 1986).

Gupta *et al.* (2003) citam que as amilases são enzimas que são conhecidas por hidrolisar a molécula de amido liberando diferentes produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose, compreendem as hidrolases.

As amilases começaram a ser produzidas no início do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. A enzima Takadiastase foi a primeira α -amilase fúngica produzida em grande escala pelo pesquisador Takamine, considerado o primeiro método de produção microbiológica, citado por SOCCOL *et al.* (2005). Desde então, as técnicas e processos utilizados para este fim foram aprimorados.

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

Na Figura 2 é mostrada a ação conjunta das enzimas que degradam a molécula de amido.

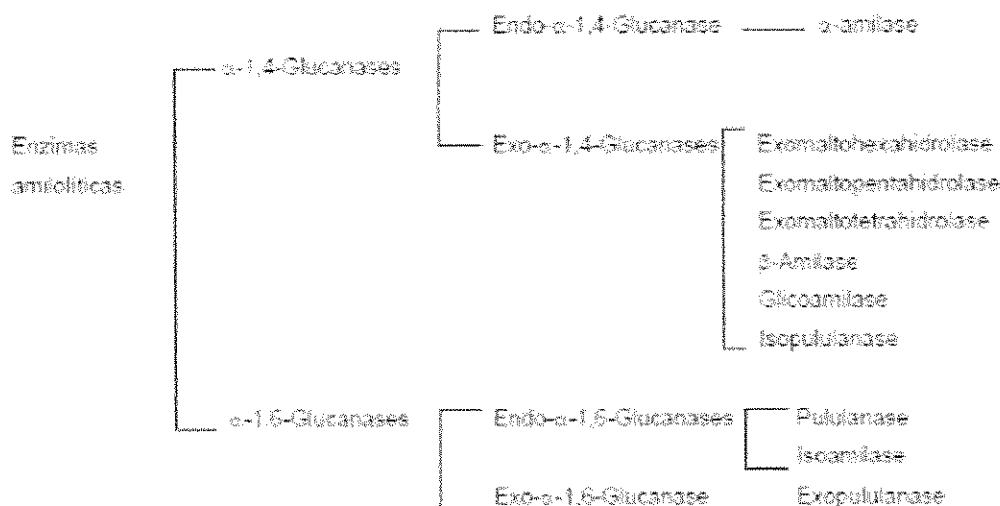


Figura 2 – Classificação das enzimas amilolíticas (NIGHAM e SINGH, 1995).

Segundo Vihinen e Mansala (1989), as enzimas amilásicas e suas especificidades são definidas como:

As α -amilases (EC 3.2.1.1, α -1, 4-D-glicano glicanoidrolase) correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as

ligações α -1,4 e liberando maltoligossacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases sacarificantes que hidrolisam 50 a 60% do amido produzindo glicose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato produzindo, predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis pela rápida redução da viscosidade do amido em comparação com as primeiras (VIHINEN e MANRSALA, 1989).

Para a produção dessas enzimas pode ser utilizado uma variedade de organismos, como bactérias, fungos, leveduras e actinomicetes, porém as enzimas derivadas de fungos e bactérias são dominantes. Dentre os principais produtores de α -amilases incluem gênero *Aspergillus* e *Bacillus* (PANDEY *et al.*, 2000)

As glucoamilases (1,4- α -D-glicano glucohidrolase. E.C. 3.2.1.3), também conhecidas como amiloglicosidases, são produzidas principalmente por fungos. São exoamilases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula de amido. Ela pode atuar tanto nas moléculas de amilose ou amilopectina do grânulo de amido como em oligossacarídeos relacionados, liberando D-glicose na configuração β . Em uma velocidade menor, as glucoamilases também atuam hidrolisando as ligações α -1,6 e algumas α -1,3. Sugere-se, portanto, que a ação da glucoamilase ocorra por meio de um mecanismo multisseriado no qual a enzima atua aleatoriamente em toda a molécula de substrato.

As β -amilases (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glicano-maltohidrolase) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4, a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, separando-a em duas unidades de glicose, por inversão, na forma de β -maltose (HARGER, 1982). Na indústria de alimentos e bebida, esta enzima é empregada para converter solução de amido em solução de maltose. Esse tipo de amilase está distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em β -maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação.

As pululanases (α -dextrina-6-glucohidrolase, E.C. 3.2.1.41) são endoamilases desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α - ou β -amilase. O produto dessa hidrólise corresponde às maltotrioses. Estas enzimas também são capazes de agir nas ligações α -1,6 das moléculas de amido, amilopectina e dextrina limite, originando um produto de reação sem ponto de ramificação.

As isopululanases (pullulan 4- glucohydrolase, E.C. 3.2.1.57) são enzimas que quebram as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, mas que não têm nenhuma atividade sobre o amido. O produto da ação dessas enzimas é a isopanoose.

As isoamilases (glicogênio-6-glucohidrolase, E.C. 3.2.1.68) são endoamilases desramificantes que hidrolisam as ligações α -1,6 de amilopectina, glicogênio, várias dextrinas ramificadas e oligossacarídeos, mas não hidrolisa a ligação α -1,6 do pululano. Estas enzimas são similares as pululanases, porém requerem pelo menos três unidades de glicose na cadeia ramificada para serem capazes de hidrolisá-la. As isoamilases têm sido encontradas em poucas linhagens de microrganismos e são usadas para desramificarem a molécula de amido na produção de glicose e maltose.

Outras enzimas classificadas dentro do grupo da amilase, mas que são pouco relatadas na literatura são as Isomaltase (Dextrina 6- α -D-glucono hidrolase EC 3.2.1.10), que hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas em isomaltose de dextrinas e as α -glucosidases (α -D-gucosídica 3.2.1.20), que hidrolisam ligações α -1,4-D-glicose nos terminais não redutores do resíduos de oligossacarídeos liberando α -D-glicose.

Essas enzimas apresentam uma aplicabilidade muito diversificada. No processo de alimentos o seu uso tem apresentado muito benefícios, pois além do rendimento ser semelhante ou maior do que o do processamento químico, não há formação de compostos não desejados. Além de apresentarem a vantagem de catalisar reações sob condições moderadas, sendo naturais, não tóxicas e a maioria das enzimas é ativa em baixas concentrações (FENEMA, 1993).

As amilases têm sido bastante aplicadas na conversão do amido em álcool etílico utilizando-se, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação (SINGH *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1998). Nesse processo, glucoamilases e α -amilases de *A. niger* são adicionadas em meio fermentativo contendo células de *Saccharomyces cerevisiae*. O amido presente no meio fermentativo é convertido, através da ação conjunta das amilases, em glicose que posteriormente é convertida por fermentação em etanol (RAJOKA *et al.*, 2004). A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado em parte o problema em que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível, além do biocombustível ser uma alternativa eficiente por conciliar aumento de segurança energética, com benefícios para combate ao aquecimento global e uso de fontes renováveis.

O emprego dessas enzimas na preparação de pão pode retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão "fresco" por mais tempo. A α -amilase fúngica confere maior

potencial fermentativo, já a amiloglicosidade confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração (NOVOZYMES, 2005).

Outro segmento onde as amilases apresentam atualmente um papel muito importante é na indústria de ração animal, onde estas proporcionam a suplementação de enzimas endógenas, com a degradação mais eficiente do amido, melhorando a digestibilidade dos alimentos das aves.

Segundo Cousins (1999), a formulação de ração moderna é voltada principalmente para fornecer alimentos com densidade de nutrientes para se alcançar alto desempenho do animal e ao mesmo tempo alcançar custos mínimos.

Atualmente várias pesquisas estão sendo realizadas em torno do uso de enzimas como a amilase, na suplementação da alimentação dos frangos de corte, em busca de possíveis formulações de rações mais econômicas e eficientes (COTTA *et al.*, 2006).

Brum *et al.* (2006) trabalharam com α -amilase de *Aspergillus oryzae* e observaram aumento no ganho de peso das aves com até 23 dias de idade. Onderci *et al.* (2006) suplementaram dietas a base de milho com cultura de *Escherichia coli*, produtoras de α -amilase e observaram melhora no desempenho das aves e aumento da digestibilidade dos nutrientes.

3.2. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal

No segmento da produção animal, a avicultura industrial está em constante progresso. Entre os vários fatores, pode-se dizer que a nutrição tem desempenhado importante papel com intensa busca de melhora no aproveitamento dos nutrientes da dieta, uma vez que a alimentação é o item de maior custo na produção de frango de corte (CAIRES *et al.*, 2008).

De acordo com Flores *et al.* (1994), o uso destes aditivos alimentares têm como objetivo melhorar a eficiência de produção dos animais pelo aumento da digestão de produtos de baixa qualidade e redução da perda de nutrientes nas fezes, sendo possível baixar os níveis nutricionais da dieta com possíveis vantagens econômicas.

Segundo Sheppy (2001), existem quatro principais razões para utilização de enzimas na nutrição animal:

1 - Remoção de fatores antinutricionais: os componentes da parede celular dos grãos (β -glucanos e arabinose) possuem um efeito antinutricional nas aves. Quando estes componentes se encontram na forma solúvel, aumentam a viscosidade da ingesta, interferindo na motilidade e na absorção de outros nutrientes e favorecendo o aparecimento de fezes úmidas e pegajosas, sendo a causa de baixos rendimentos. As enzimas β -glucanases são específicas para estas frações de

polissacarídeos e podem ser adicionadas nas dietas para melhorar a qualidade nutricional dos grãos de cereais, como a cevada, centeio, aveia, trigo e triticale.

2 - Aumento da disponibilidade de nutrientes: a má digestibilidade das matérias-primas é, a princípio, o resultado da quantidade insuficiente de enzimas endógenas para extrair os nutrientes dos alimentos. A suplementação de enzimas nas dietas pode melhorar a ação massal das enzimas endógenas sobre os ingredientes tradicionais, melhorando o seu valor nutritivo e o desempenho das aves.

3 - Aumento na digestibilidade de polissacarídeos não amiláceos (fibras): os monogástricos não têm capacidade endógena para digerir as fibras. Enzimas exógenas podem ser utilizadas para hidrolisar os polissacarídeos não amídicos que podem, potencialmente, serem utilizados pelas aves.

4 - Suplementação na produção de enzimas endógenas: em aves e suínos jovens, a produção de enzimas endógenas é menor que em adultos, de modo que, a digestibilidade dos alimentos, em geral, é menor nos animais jovens, podendo ser melhorada pela adição dessas enzimas.

Uma lista das principais enzimas utilizadas na alimentação das aves é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Enzimas utilizadas na avicultura

Enzimas	Substratos	Efeitos
Xilanase	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta
Glucanase	β -glucanos	Redução da viscosidade da digesta Menor umidade na cama
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes
Proteases	Proteínas	Suplementação de enzimas endógenas Degradação mais eficiente de proteínas
Amilases	Amido	Suplementação de enzimas endógenas Degradação mais eficiente do amido
Fitase	Ácido fítico	Melhor utilização do fósforo nos vegetais Remoção do ácido fítico
Lipases	Lípídeos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais

Fonte: adaptado de CHOCT e KOCHER (2000).

A biotecnologia está envolvida com novas enzimas e com a combinação destas com novas aplicações para permitir melhorias na alimentação animal. De acordo com Cowieson *et al.* (2006), atualmente existem grandes pesquisas com enzimas com foco na qualidade dos

ingredientes, segurança alimentar, efeito da idade da ave, efeito de vários sítios de atividade, doses enzimáticas e redução da poluição ambiental.

Um exemplo claro do uso de enzimas exógenas na alimentação animal é o seu potencial de redução do poder poluente dos alimentos, através da hidrólise do ácido fítico, forma orgânica sob a qual o fósforo se apresenta nos alimentos de origem vegetal. A adição de fitase na dieta desses monogástricos evita que o fósforo seja eliminado nas excretas quase na sua totalidade, uma vez que as aves não apresentam essas enzimas exógenas no seu sistema digestivo (CAIRES *et al.*, 2008).

Além do fósforo, o uso destas enzimas na ração das aves e suínos, melhora a digestibilidade e disponibilidade de outros nutrientes para os animais, como o nitrogênio, cálcio, cobre e zinco, diminuindo a sua presença nas fezes e urina, e conseqüentemente, a sua deposição no meio ambiente (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

A formulação de ração moderna é voltada principalmente para fornecer alimento com uma densidade de nutrientes, para se alcançar o alto desempenho do animal e ao mesmo tempo alcançar custos mínimos. Dessa forma qualquer atividade para reduzir a quantidade de fatores antinutricionais irá afetar o desempenho do animal. Além dos tratamentos durante o processamento da matéria-prima, as enzimas atuam na eliminação de efeitos negativos de fatores antinutricionais. A suplementação de enzimas exógenas na ração pode simplesmente ajudar o sistema enzimático endógeno (protease, amilase, lipase) ou suplementar enzimas as quais não estão presentes no sistema digestivo do animal (fitase, xilanase, pectinase) (COUSINS, 1999).

Nas paredes celulares dos cereais que são os principais componentes da alimentação das aves e suínos, encontram-se os carboidratos complexos classificados como PNA, definidos como macromoléculas de polímeros de açúcares simples, monossacarídeos, unidos pela ligação glicosídica formada por um grupo hemiacetal de um açúcar, um grupo hidroxila do outro, quando ingeridos apresentam baixa digestibilidade para os animais monogástricos, que não tem capacidade enzimática de digerir celulose, arabinoxilano, beta-glucanos, pectinas, entre outros, chamados de polissacarídeos não-amiláceos (BEDFORD, 1996).

As propriedades antinutricionais de PNA's surgem em função da sua elevada capacidade de ligar-se a grandes quantidades de água causando um aumento da viscosidade intestinal do animal, e reduzindo a digestibilidade de outros componentes da dieta, comprometendo o desempenho dos animais (CONTE, 2003). De acordo com CAMPESTRINI *et al.* (2005), em um ambiente viscoso, os nutrientes como as gorduras, amido e proteínas, se tornam menos acessíveis

e disponíveis às enzimas endógenas, como a amilase e protease. Além de uma menor digestibilidade destes nutrientes, a viscosidade elevada deste bolo alimentar aumenta a quantidade de fezes úmidas. O efeito positivo da inclusão das enzimas de PNA na dieta dos animais pode ser medido em termos de melhoria dos parâmetros de desempenho, como ganho de peso ou taxa de conversão alimentar.

Várias pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de avaliar diferentes enzimas e complexos enzimáticos no desempenho e na viabilidade de frangos de corte. Porém alguns parâmetros podem afetar os resultados como idade dos animais, espécie, condições experimentais e processamento das rações utilizadas (ALBINO *et al.*, 2007).

Brito *et al.* (2006) avaliaram o desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade alimentados com rações contendo soja extrusada suplementada com um complexo multienzimático contendo celulase, amilase e protease. Os autores verificaram efeito positivo também sobre o ganho de peso e a conversão alimentar. Toledo *et al.* (2007) estudaram o efeito de enzimas exógenas (xilanases, β -glucanase e celulases) adicionadas a dietas a base de milho e farelo de soja com diferentes densidades nutricionais, sobre o consumo alimentar, peso corporal e conversão alimentar em pintos de corte. Na fase inicial os autores não verificaram interação entre as densidades nutricionais e o complexo enzimático. Entretanto, na fase de crescimento e final, houve interação significativa para o consumo alimentar e peso corporal entre as aves de dieta padrão e baixa densidade.

Sabe-se que a produção de enzimas endógenas pelos animais é normalmente adequada. Porém no caso dos animais monogástricos essa produção pode variar com a idade, tornando-se inadequada quando comparada aos animais adultos. As aves nascem com suprimento de nutrientes, incluindo enzimas digestivas, que se esgota rapidamente com a reduzida síntese e a elevada demanda na primeira semana (NUNES, 1998). As funções digestoras das aves passam por um processo de maturação com o avançar da idade, tanto da produção enzimática quanto do processo de absorção de nutrientes.

A suplementação exógena é fundamental logo nos primeiros dias de vida para maximizar o desenvolvimento do sistema digestório e possibilitar o crescimento desejado do animal em menor tempo (PENZ JR. e VIEIRA, 1998). Além de estimular a produção das enzimas endógenas, como a amilase, importante para uma melhora na digestibilidade dos alimentos nas primeiras semanas, e favorecer a utilização dos chamados ingredientes alternativos, os quais possuem restrições nas formulações de rações destinadas às fases iniciais (NUVITAL, 2000).

Apesar de todo aditivo aparentar aumento nos custos das rações, a inclusão das enzimas tem mostrado melhorias no desempenho do animal e também no financeiro, uma vez que se considera a possibilidade de maior aproveitamento dos nutrientes, principalmente nas rações de alimentos alternativos, que tem menor custo e menor digestibilidade, além da redução do potencial poluidor devido a menor excreção de nutrientes (ALBINO *et al.*, 2007).

3.3. Fermentação Semissólida

O termo fermentação semissólida (FSS) referem-se à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou solução umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células, e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

Na FSS, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (MICHELL e LONSANE, 1992). Na Figura 3 é ilustrado o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

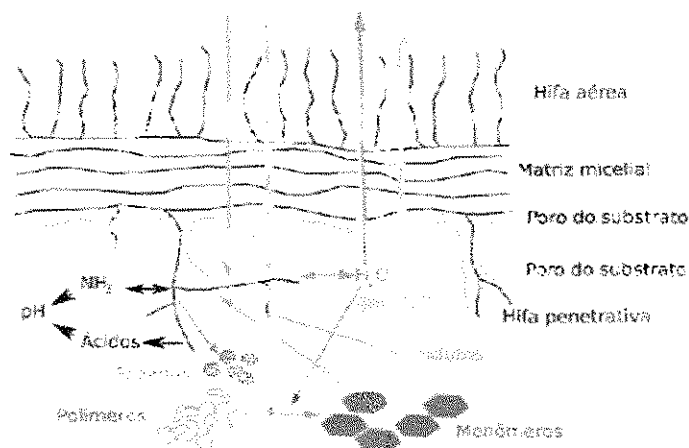


Figura 3 – Representação do crescimento de fungo em substratos sólidos (HOLKER e LENZ, 2005).

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

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

O uso da FSS ou da fermentação submersa deve ser estudado de acordo com o micro-organismo a ser utilizado e o produto que se deseja obter (HESSELTINE, 1977).

A fermentação semissólida apresenta algumas vantagens: simplicidade de meio de cultura; redução dos efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações resultantes da baixa umidade do meio fermentativo; condições de cultura próximas ao dos meios naturais; para as fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor do que o da cultura líquida; baixa demanda de energia; utilização de resíduos agroindustriais (farelos, cascas e bagaços) como substrato, o que representa, no Brasil, matéria-prima abundante e de baixo custo (SPIER, 2005).

A FSS também apresenta algumas desvantagens como: risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas); difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade); pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático); alta taxa de inoculação, quando não se utiliza a microflora natural; estimação precisa de biomassa; papel essencial da umidade e da atividade de água (SPIER, 2005).

Há diversos fatores que influenciam a FSS, os considerados mais importantes por estudiosos são: escolha do substrato, tamanho da partícula, umidade e atividade de água, temperatura, pH, agitação, aeração e transferência de oxigênio.

A natureza do substrato sólido empregado é um dos mais importantes fatores que afetam a FSS. Esta seleção depende seriamente dos fatores intimamente relacionados com o custo e a viabilidade e, ainda, pode envolver o armazenamento de resíduos agroindustriais (COUTO e SANROMÁN, 2006).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo da FSS quanto à escolha do micro-organismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do micro-organismo, favorece a formação de enzimas (SANTOS *et al.*, 2005a). Nesse sentido, faz-se obrigatória a caracterização do substrato utilizado no processo, sendo que

as análises que devem ser feitas estão relacionadas com as variáveis que afetam o processo em questão.

Um importante fator, que encontra-se associado à troca de gases e que, por consequência, afeta o crescimento microbiano, é o tamanho da partícula do substrato. Geralmente, substratos com menor tamanho de partícula fornecem maior área de contato, favorecendo o crescimento do micro-organismo. Por outro lado, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração do meio fermentativo, o que pode afetar a condição respiração/aeração, resultando num baixo crescimento microbiano. Ao mesmo tempo, partículas maiores de substrato oferecem melhores condições de respiração/aeração, mas fornecem também superfície limitada para o crescimento do micro-organismo. Logo, é importante determinar o tamanho adequado de partícula para satisfazer a condição respiração/aeração e o crescimento microbiano (HASAN, 2002).

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a fermentação em estado sólido. A natureza do substrato, as necessidades do micro-organismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar.

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado. Além disso, a alta umidade resulta num decréscimo da porosidade, o que impede a penetração do oxigênio. Isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale mencionar que, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

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

A temperatura é considerada um fator crítico. O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos micro-organismos. Uma das grandes dificuldades dos processos de FSS é a remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada. Para a FSS em

larga escala, o problema se agrava e, os equipamentos para refrigeração mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico (HASAN, 2002).

O controle do pH durante a FSS, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido medi-lo com precisão devido à heterogeneidade e consistência do material. Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparados a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos micro ambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003).

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

O emprego de agitação em FSS pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer a exaustão de gases e a troca de calor do meio. Porém, pode interferir na formação dos esporos, devido à fragmentação do micélio. A interface sólido/gás deve permitir a troca de gases, pois o consumo de oxigênio e a formação de dióxido de carbono são muito elevados em FSS (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Além disso, a agitação pode causar a compactação do meio e a danificação das hifas.

A aeração cumpre funções básicas na fermentação como: manter condições aeróbicas; eliminar o dióxido de carbono formado; regular a temperatura do substrato; ajustar o nível de umidade (CORREIA, 2004).

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

Além da produção de enzimas, a fermentação semissólida é amplamente utilizada para a obtenção de vários produtos como fungos comestíveis (champignons), alimentos orientais fermentados (tempeh, miso, shoyu, koji), enriquecimento protéico de produtos e resíduos agrícolas, queijos tipo Roquefort, Camembert) (SOCCOL, 1992).

A Tabela 2 apresenta alguns produtos obtidos industrialmente empregando a FSS.

Tabela 2 - Produtos obtidos industrialmente empregando a FSS

Produto/Processo	Micro-organismos	Substratos
Enzimas		
Pectinases	<i>Lentinus enodes</i>	Resíduos de frutas
	<i>Aspergillus Niger</i>	Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo; Sabugo de milho;
	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
	<i>Aspergillus Niger</i>	Casca de maracujá
Amilases	<i>Aspergillus Niger</i>	Resíduos de chá
	<i>Aspergillus Niger</i>	Farelo de arroz
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus Niger</i>	Casca de maracujá
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Tanase	<i>Aspergillus Niger</i>	Farelo de trigo
Invertases	<i>Aspergillus Niger</i>	Farelo de arroz
Fitase	<i>Aspergillus Niger</i>	Farelo de trigo; Farinha de soja
Substâncias Orgânicas		
Ácido Giberélico	<i>Gibberella fujikoroii</i>	Farelo de trigo
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Arroz
Enriquecimento proteico	<i>Penicillium decumbes</i>	Palha de milho
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Farinha de colza
Biorremediação	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Materiais lignocelulósicos
Biopolpação	<i>Pleurotus sp.</i>	Farelo de trigo

Fonte: Adaptado de PINTO (2003)

3.4. Gênero *Aspergillus*

Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais utilizados nos processos no estado sólido, devido, principalmente, à grande capacidade de crescer em ambiente com baixo teor de água livre, ou seja, baixa atividade de água e apresentarem versatilidade em suas aplicações, além de sua facilidade de adaptação e manipulação (COSTA, 1996).

Segundo Pandey (1992) a seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FSS. O autor apresenta como exemplo da importância da escolha do micro-organismo o fato de que uma cultura de *Aspergillus niger* pode produzir cerca de vinte tipos diferentes de enzimas; assim como a enzima α -amilase pode ser obtida a partir do cultivo de mais de vinte e oito cepas distintas.

O gênero *Aspergillus* é um modelo biológico clássico e em geral de grande relevância prática, por existirem espécies produtoras de enzimas industriais, ácidos orgânicos e outros produtos comercialmente importantes. A produção de amilases foi descrita em diferentes espécies de *Aspergillus*: *Aspergillus terreus* CTC826 (ALI e HOSSAIN, 1991), *Aspergillus tamaritii* (MOREIRA *et al.*, 1999), *Aspergillus niger* (KOCHER *et al.*, 2003), *Aspergillus ochraceus* (NAHAS e WALDERMARIN, 2002), *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (KILIKIAN, 1996), entre outros.

Conforme Wainwright (1995) existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia.

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2012) o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos (Figura 4). Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *Aspergillus niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros.



Figura 4- Micrografia eletrônica do fungo *Aspergillus niger*

Fonte: <http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>

O uso do *Aspergillus niger* apresenta vantagens como facilidade de manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. Pandey *et al.* (1999) relataram que o *Aspergillus niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase, protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação.

Na tabela 3 é apresentada a produção de enzimas por *Aspergillus niger* com aplicação comercial, demonstrando a alta eficiência da espécie.

Tabela 3 - Produção de enzimas por *Aspergillus niger*

Enzimas	Setor da Indústria	Aplicação	Referências
Poligalacturonase	Alimentação Alimentação	Clarificação de sucos de fruta Extração de óleo de azeitonas	Santos e Macedo (2008)
Celulase	Detergentes Têxtil Papel e celulose	Limpeza, clarificação Amaciamento de tecidos Remoção de tintas, modificação de fibras	Aguiar <i>et al.</i> (2008)
Invertase	Panificação	Produção de açúcar invertido Higiene bucal	Cardoso <i>et al.</i> (2008)
Pectinase	Papel Alimentação Alimentação animal	Clarificação e redução da viscosidade em sucos de fruta Redução da viscosidade da digesta	Patil e Daynand (2006) Choct e Kocher (2000)
Protease	Detergentes Papel e celulose Couro	Remoção de manchas de proteína Remoção de biofilmes Purga de couro	Paranthaman <i>et al.</i> (2009)
Amilase	Detergentes Panificação Bebidas Alimentação animal	Remoção de manchas de amido Aumenta maciez e volume do pão Tratamento de cerveja light Melhora a digestibilidade e desempenho dos animais das aves	Gupta <i>et al.</i> (2008) Zanella <i>et al.</i> (1999)

Fonte: ROCHA (2010)

3.5. Farelo de Milho

A maximização do potencial de desenvolvimento animal depende de vários fatores. Ao lado de condições favoráveis, inerentes ao ambiente de criação e da saúde dos animais, a nutrição correta, adotando-se técnicas aprimoradas no preparo das rações, constituem-se em pressupostos básicos para a otimização da produção (ZANOTTO *et al.*, 1998). Assim, a alimentação animal representa um fator importante na agroindústria brasileira.

Devido à sua multiplicidade de aplicações, o milho é uma matéria-prima impulsionadora de diversos complexos agroindustriais, assumindo relevante papel socioeconômico. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

É considerado um dos melhores alimentos energéticos utilizados na alimentação animal, não só por sua composição, predominantemente de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo), mas também pela sua disponibilidade, contudo, o preço deste alimento tende a ser variável, o que tem levado diversos produtores a tentarem utilizar alimentos alternativos.

De acordo com Rostagno (2001), na avaliação da oportunidade de uso de um ingrediente alternativo, devem-se levar em conta pontos específicos, tais como:

a) disponibilidade comercial – é necessário um suprimento quantitativamente atrativo e que justifique o esforço de mudança de fórmulas de ração;

b) quantidade de nutrientes e energia – os ingredientes podem ser mais ou menos densos energeticamente e estimativas de sua energia podem ser obtidas a partir de análises laboratoriais. Análises de composição proximal servem para indicar o conteúdo de alguns nutrientes e são indispensáveis, se não houver informação sobre os ingredientes;

c) qualidade dos nutrientes - é importante que os valores de nutrientes digestíveis estejam disponíveis, pois são esses que verdadeiramente são utilizados pelos animais. As tabelas de composição de alimentos tem oferecido essa informação que serve de indicador para a fórmula de ração com base em nutrientes digestíveis. Alguns fatores como altas temperaturas ou falhas no processamento podem desnaturar proteínas ou impedir que os nutrientes dos ingredientes sejam adequadamente digeridos. Também a presença de micotoxinas e de fatores antinutricionais nos ingredientes brutos podem comprometer a qualidade da dieta e não serem adequados;

d) características físicas do ingrediente – Na formulação de rações é importante levar em consideração a densidade e umidade dos ingredientes, fatores que tem influência direta na

capacidade e condições de armazenamento. O estado físico pode ser líquido (caldo de cana, soro de leite, óleos, ingredientes comerciais líquidos), úmido (resíduos de destilaria, silagens de grãos de milho e de mandioca picada), seco (milho triturado, farelo de soja, etc.), sólido (sebo bovino). No mercado existe um grande número de subprodutos resultante da industrialização do milho, alguns com alto conteúdo de proteína como o farelo de glúten de milho e outros com características energéticas como o farelo de milho.

O farelo de milho é um subproduto resultante da moagem via seco do milho, contendo o gérmen, a casca, ponta e porções de grits do milho (pequenas frações do endosperma).

Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão.

A anatomia do milho grão e suas partes são apresentadas na Figura 5.

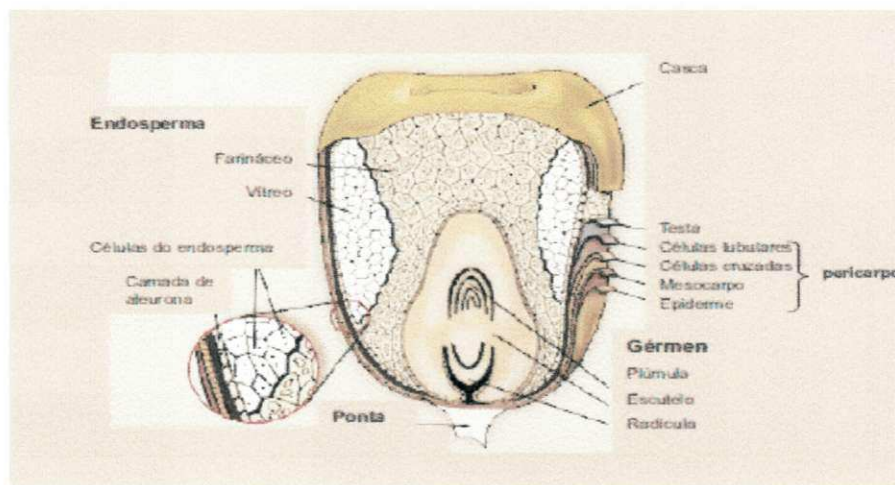


Figura 5 - Anatomia do grão de milho e suas partes.

Fonte: PAES (2006)

O farelo de milho é muito utilizado nas rações avícolas no Brasil. Avaliando o conteúdo dos principais nutrientes nota-se que é um ingrediente com boas qualidades nutritivas e que pode perfeitamente ser adicionado a ração de frangos de corte com considerável redução do custo da alimentação das aves.

Na tabela 4 são mostrados os valores médios das avaliações químicas de diferentes amostras de farelo de milho e do milho.

Tabela 4 - Valores médios das avaliações químicas do farelo de milho e do milho

Nutrientes	Milho	Farelo de Milho
Proteína, %	8,57	9,80
Gordura, %	3,46	7,18
Amido, %	62,30	50,20
Fibras, %	1,95	5,00
FDN, %	11,40	17,49
FDA, %	3,42	4,96
Em, Kcal/Kg	3371	3026

Fonte: ROSTAGNO (2001).

O farelo de milho possui maior conteúdo de proteína-aminoácidos, óleo e fibra que o milho. Vale salientar que o teor de aminoácidos e de energia metabolizável do alimento, são os de maior importância econômica na formação dos custos das rações de frangos de corte. Em razão destas características, pode ser um substituto parcial do milho nas rações de aves, fazendo uma opção por uma produção animal tecnologicamente correta, segura e economicamente viável.

3.6. Hidrólise Enzimática

A hidrólise do amido, tanto para fins analíticos quanto para fins industriais, pode ser feita por dois processos: enzimático e ácido. O método convencional de hidrólise de amidos usando ácidos tem sido substituído por processos enzimáticos, contabilizados por aproximadamente 15% da porção do mercado mundial de enzimas (SONI *et al.*, 2003).

Na hidrólise com ácido, o amido presente na biomassa é quebrado usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico. As principais desvantagens dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto e pelo fato de ser um catalisador muito rápido, o ácido precisa ser bem controlado para não levar a reações paralelas indesejáveis ou incontroláveis (RABELO, 2007).

A hidrólise enzimática do amido é realizada pelas enzimas amilases e este processo extrai do substrato, açúcares redutores, incluindo a glicose.

A quebra do amido por meio de enzimas exige uma série de condições distintas e muito específicas, mais onerosa. Apesar disso, a atuação das enzimas mostra alta especificidade,

possibilitando a obtenção de produtos de propriedades físico-químicas bem definidas além do que o processo ocorre em reações mais brandas (EDUARDO, 2002).

Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. A hidrólise enzimática vem sendo mais privilegiada nos estudos atuais, em razão do caráter fortemente poluidor da hidrólise ácida. Porém, além do investimento inicial, a tecnologia enzimática exige mão-de-obra mais especializada, assim como laboratórios e análises mais sofisticados (SUMERLY *et al.*, 2002).

A hidrólise enzimática de amidos não é apenas um importante processo industrial para a produção de adoçantes, xaropes e produtos químicos (etanol, acetona, etc.), mas pode também ajudar a estudar a estrutura dos grânulos de amido (LI *et al.*, 2004). Detalhes a respeito da estrutura, organização e arranjo dos grânulos de amido podem ser obtidos estudando os resíduos resultantes da hidrólise ácida ou enzimática (BULÉON *et al.*, 1998). A hidrólise enzimática do amido granular tem sido utilizada como técnica que possibilita o entendimento da estrutura física e química do grânulo e de seus componentes (GALLANT *et al.*, 1997).

A natureza do substrato a ser utilizado é um fator que pode contribuir ou limitar a ação da enzima, assim como a extensão de hidrólise também depende do tipo de enzima, quantidade de atividade da enzima, tempo de reação, temperatura e presença ou ausência de inibidores, entre outros fatores (ROBERTSON, 2006).

Segundo Krishna *et al.* (2000) a hidrólise enzimática é superior à hidrólise ácida, em vários aspectos, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da hidrólise ácida e enzimática

Parâmetros	Hidrólise Ácida	Hidrólise Enzimática
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200°C)	Baixa (45°C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte: KRISHNA *et al.* (2000).

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da

tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro (RABELO, 2007). Uma vez que a hidrólise enzimática é usualmente conduzida em condições suave (pH 4,8; e temperatura 45-50°C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos (DUFF e MURRAYH, 1996).

4. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande.

4.1. Micro-organismo

O micro-organismo empregado foi *Aspergillus niger* CCT 0916 cedido pela EMBRAPA Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza (CE). Os conídios da linhagem foram preservados em tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo solo estéril, onde foram estocados a -18 °C.

4.2. Substrato

O substrato usado na presente pesquisa foi o farelo de milho, um subproduto do processamento industrial a seco do milho, constituído de casca, olho, gérmen e porções de grits (pequenas frações do milho), disponível para o consumo animal. O farelo de milho utilizado foi cedido pela Asa Indústria e Comércio Ltda (VITAMILHO), na cidade de Campina Grande (PB). O farelo de milho foi armazenado em recipiente de vidro a temperatura ambiente.

4.3. Caracterização do Substrato

A caracterização físico-química do farelo de milho foi realizada em triplicata e foi feita quanto a granulometria, densidade aparente, umidade, pH, cinzas, teor de sólidos solúveis (°Brix), teor de açúcares redutores, pectina, celulose, proteína bruta, amido e extrativos, de acordo com as metodologias descritas ao longo deste capítulo.

4.3.1. Granulometria

O perfil granulométrico do substrato foi determinado pesando 100g do farelo de milho e transferido para um agitador de peneiras PRODUTEST na frequência 50 rpm durante dez minutos, em jogo constituído por cinco peneiras, seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): 14 (1,18mm), 24 (0,71mm), 35 (0,42mm), 48 (0,30mm)

e 80 (0,18mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso da amostra analisada.

4.3.2. Densidade aparente

A densidade aparente do substrato foi determinada de acordo com BRASIL (2005), pesando 100 gramas do substrato e em seguida colocados em uma proveta, para determinar o volume ocupado, sem que houvesse compactação. Os cálculos foram feitos seguindo a Equação 1.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{m}{V} \quad (1)$$

Onde:

m = massa da amostra (g)

V = volume ocupado (cm³)

4.3.3. Umidade

Pesou-se de 2 a 10 g da amostra em cápsula de metal previamente seca e tarada. Colocou-se a cápsula em estufa a 105°C até atingir massa constante. Resfriou-se em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente e pesou-se a amostra (BRASIL, 2005). Os cálculos foram realizados com base na Equação 2.

$$\text{Umidade}(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

m_i = massa inicial da amostra (g)

m_f = massa final da amostra (g)

4.3.4. pH

Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g da amostra sólida. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos e em seguida o pH foi medido diretamente em pHmetro digital previamente calibrado (BRASIL, 2005).

4.3.5. Cinzas

Pesou-se de 5 a 10 g da amostra em cadinho de porcelana, previamente aquecido em mufla a 550°C por aproximadamente 5 horas e resfriado em dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente. Incinerou-se a amostra em mufla a 550°C, até eliminação completa do carvão. A cinza ficou de cor branca ou ligeiramente acinzentada. Após a retirada da amostra da mufla, esta foi levada ao dessecador com sílica gel até alcançar temperatura ambiente e pesou-se (BRASIL, 2005). Os cálculos foram feitos através da Equação 3.

$$\text{Cinzas(\%)} = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

m_i = massa inicial da amostra (g)

m_f = massa final da amostra (g)

4.3.6. Teor de sólidos solúveis (°Brix)

Foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do resíduo, agitando-se até perfeita homogeneização e deixando em suspensão por 30 minutos em repouso. Após este período a suspensão é filtrada com algodão, e feita à leitura em refratômetro. É utilizado um fator de diluição para determinar o teor de sólidos solúveis (°Brix) como mostra a Equação 4 a seguir:

$$\text{°Brix(\%)} = (L)\% \times Fd \quad (4)$$

Onde:

L = leitura do refratômetro

Fd = fator de diluição

4.3.7. Teor de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados com base na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Esse procedimento foi descrito por Miller (1959) em

espectrofotômetro, modificado de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) usando solução de glicose como padrão e 100 g de amostra sólida problema determinado assim o teor seguindo os cálculos da Equação 5.

$$AR(g_{AR}/100 g_A) = \frac{ABS \times F_c \times V}{m_A \times 10} \quad (5)$$

Onde:

ABS = leitura do espectrofotômetro em nm

F_c = fator da curva padrão expresso em mg de glicose por mL de solução

V = volume de água usado no preparo da diluição (mL) da amostra para que permita leitura de absorbância dentro da faixa linear da curva de calibração

m = massa da amostra (g)

10 = fator de conversão

4.3.8. Pectina

A Pectina foi determinada pelo método gravimétrico por precipitação como pectato de cálcio, previamente descrito por Rangana (1979).

A pectina foi expressa em percentagem de pectato de cálcio através da Equação 6.

$$Pectina(\%) = \frac{m \times 500}{V \times P} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:

m = massa do pectato de cálcio

500 = fator de diluição

V = volume do filtrado (mL)

P = peso da amostra

4.3.9. Celulose

O Teor de celulose foi determinado conforme a metodologia descrita por Xu *et al.* (2006). O percentual de celulose total determinado gravimetricamente seguindo a Equação 7.

$$Celulose(\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

m_f = massa final da amostra (g)

m_i = massa inicial da amostra (g)

4.3.10. Proteína bruta

Utilizou-se o método semi-micro Kjeldahl adaptado para nitrogênio por espectrofotometria para determinação da concentração de proteína bruta (LE POIDEVIN e ROBINSON, 1964). Com a Equação 8, obteve-se o teor de proteína bruta da amostra.

$$Proteina(\%) = (ABS_A - ABS_B) \times F_c \times 5 \times 6,25 \quad (8)$$

Onde:

ABS_A = leitura da absorvância da amostra

ABS_B = leitura da absorvância do branco

F_c = Fator da curva padrão

6,25 = Fator de conversão

4.3.11. Amido

Para determinação do amido utilizou-se o Método de Determinação de Amido por digestão ácida em micro-ondas de acordo com Cereda *et al.*, (2004). O percentual de amido foi calculado de acordo com a Equação 9.

$$Amido(\%) = \frac{250 \times f \times 0,9}{LM \times PA} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde:

250 = volume total da diluição da amostra de fécula

f = fator das soluções A e B

0,9 = fator que transforma açúcares redutores em amido

100 = expressar o amido em porcentagem da amostra

LM = leitura da titulação da amostra de fécula

PA = peso da amostra de fécula usada, seca ou úmida (g)

4.3.12. Extrativos

O teor de extrativos foi determinado empregando um aparelho de Soxhlet. Pesou-se 5g do substrato e 200 mL de etanol-ciclohexano à proporção 1:2 (v/v). As partículas foram acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas dentro do Soxhlet. O solvente foi colocado em um balão de 250 mL, de massa seca conhecida, e o material foi extraído por 6 horas. Após o banho, o material foi levado à estufa até atingir massa constante. Por diferença de massa obteve-se o valor de extrativos em gramas e dividindo-se pela massa da amostra analisada, obteve-se o teor de extrativos em percentual, de acordo com a Equação 10.

$$\text{Extrativos}(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

m_f = massa final da amostra (g)

m_i = massa inicial da amostra (g)

4.4. Processo Fermentativo

4.4.1. Inóculo e Obtenção da Suspensão de Esporos

De acordo com o procedimento adotado por Couri (1993), com alça de platina, os conídios foram retirados do solo estéril e transferidos para um meio básico. Este meio inclinado foi composto por pectina cítrica (10 g/L), NaNO_3 (3 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L) e Agar-agar (20 g/L) e previamente esterilizado por 20 min a 111 °C. Após a transferência, o meio com os conídios foram incubados por cinco dias em estufa a 30°C.

Os tubos contendo os esporos do 1º repique permitem que os mesmos possam ser mantidos conservados sob refrigeração por um período máximo de quatro meses. O segundo repique foi obtido de modo semelhante ao primeiro, partindo dos esporos de primeiro repique, sendo estes utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos no meio de sabugo de milho.

O meio de sabugo foi preparado de acordo com protocolo da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, com sede no Rio de Janeiro (RJ). Para cada Erlenmeyer de 125 mL, foram pesados 4,6 g de sabugo de milho seco e moído e adicionado 6 mL da solução umidificante. O frasco foi fechado com tampão de algodão envolvido em gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 1 h a 120 °C.

Para inoculação no meio de sabugo de milho, foram transferidos 10 mL de solução 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com os microrganismos de segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram suspensos e transferiu-se 1 mL para cada frasco com o sabugo. Os frascos foram agitados manualmente e incubados em estufa a 30 °C por um período de 5 dias. Após este período, os frascos foram armazenados sob refrigeração e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

Para a obtenção da suspensão de esporos, nos frascos de sabugo com esporos, foi adicionado 40 mL de solução 0,3% v/v de Tween 80. Após agitação vigorosa, os esporos foram transferidos para Erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se ter um inóculo de 10^7 esporos por grama de meio (ALMEIDA, 2007).

4.4.2. Processo de Fermentação

O processo fermentativo seguiu as seguintes etapas:

1) Pesou-se 10 g de meio úmido (substrato umidificado com volume de água destilada e sulfato de amônia de acordo com o planejamento experimental proposto no item 4.4.5) e transferiu-se para Erlenmeyer de 250 mL. Vedados com algodão, o meio foi autoclavado a 0,5 atm por 15 min;

2) Inoculou-se a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* CCT 0916 (item 4.4.1) na concentração de 10^7 esporos/mL para cada grama de substrato sólido usado. Incubou-se o meio em estufa bacteriológica na temperatura de 30 °C (SPIER 2005) e diversos bioreatores, contendo a amostra a ser fermentada foram usados, uma vez que, o acompanhamento cinético foi feito de forma descontínua.

3) Para o acompanhamento cinético foram retiradas os bioreatores em intervalos regulares de tempo 0, 6, 19, 28, 43, 52, 67, 75, 91, 99 e 115 horas de fermentação para determinando-se a umidade, o pH e os açúcares redutores;

4) Desse mesmo meio fermentado, fez-se a extração das enzimas. Após a extração, determinou-se a atividade amilásica.

4.4.3. Extração das Enzimas

A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 5 mL/g de meio fermentado de tampão acetato de 200 mM pH 4,5. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 1 h a 30 °C e filtradas em papel filtro qualitativo. O filtrado foi estocado em tubo de ensaio e congelado em freezer (CASTILHO 1997), para posterior determinação da atividade enzimática.

4.4.4. Medida da Atividade Amilásica

A determinação da atividade enzimática sobre o amido foi realizada pela quantificação dos açúcares redutores formados durante a incubação do extrato fermentativo (caldo fermentativo) com o substrato, amido solúvel 1%.

Para análise, foi colocado em um tubo de ensaio 5mL de extrato enzimático com 20mL de solução de amido 1%, preparada em tampão acetato de sódio 200 mM pH 4,5, foi incubado a 37°C e agitado por 15 minutos.

Após esse tempo, foi retirado 1mL do tubo de ensaio e colocado em outro tubo de ensaio com 1mL de DNS para determinação da concentração de açúcares redutores que seguiu semelhante à metodologia de Miller (1959). Foram realizadas duas amostras em branco para cada análise, uma constituída de 0,2mL de extrato enzimático (inativada por 1mL de DNS) e 0,8mL de substrato, chamada de branco do substrato e o outra constituída de 1mL de tampão acetato de sódio 200 mM pH 4,5 e 1mL de DNS, chamada de branco para zerar o Espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade amilásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em U/g de meio fermentado. A qual foi calculada seguindo a Equação (13).

$$AA(U/g) = \frac{AR_L \times 10^6}{180 \times 15} = \frac{(AR_E - AR_B) \times 10^6}{180 \times 15} \quad (13)$$

Onde:

AA = atividade amilásica expressa em unidade de atividade por grama de meio fermentativo

AR_L = Açúcares Redutores Liberado (g/g)

AR_E = Açúcares Redutores do Ensaio (g/g)

AR_B = Açúcares Redutores do Branco (g/g)

180 = peso molecular da glicose (g/mol)

15 = tempo de reação (min)

4.4.5. Planejamento Experimental

A fermentação em estado semissólido para produção da amilase foi realizada utilizando como ferramenta um planejamento experimental fatorial 2^2 para verificar os efeitos dos parâmetros umidade (U) e concentração da fonte de nitrogênio (N), com três experimentos no ponto central. Em virtude dos dados obtidos verificou-se a necessidade de ampliação dos níveis, pois o modelo linear não foi satisfatório, sendo realizados mais quatro experimentos nos pontos axiais (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR).

Com os resultados obtidos na execução do planejamento experimental DCCR, foi realizada regressão dos dados para obtenção de um modelo empírico. Fez-se a validação do modelo através do Teste F para verificar se este é significativo ao nível de confiança fixado. Por fim, construiu-se a superfície de resposta. Os cálculos desta seção foram realizados com o auxílio do programa Statistica.

Os níveis das variáveis do planejamento experimental foram definidos com base nos trabalhos relacionados à Fermentação Semissólida desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) /UFCG utilizando o mesmo micro-organismo do presente trabalho. Como o de Santos (2007) que estudou a produção de pectinases através da FSS, usando como substrato o pedúnculo de caju seco, observou a influência da umidade inicial e a suplementação do meio com uma fonte de nitrogênio e uma fonte de fósforo. Alcântara (2008) em seu estudo verificou a influência da atividade de água e fonte de nitrogênio na produção de pectinases, por fermentação semissólida com o bagaço do pedúnculo do caju como substrato.

Encontram-se, na Tabela 6, os níveis das variáveis reais e codificadas do planejamento experimental e na Tabela 7, encontra-se a matriz de planejamento experimental DCCR.

Tabela 6 - Níveis das variáveis do planejamento experimental fatorial

Variáveis	Nível (- α)	Nível (-1)	Ponto Central (0)	Nível (+1)	Nível (+ α)
U (b.u.)	41	45	55	65	69
N (%m/m)	0,4	0,5	0,75	1,0	1,1

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental fatorial DCCR

Ensaio	U _{B.U.}	N(%)
1	-1(45)	-1(0,5)
2	+1(65)	-1(0,5)
3	-1(45)	+1(1,0)
4	+1(65)	+1(1,0)
5	0(55)	0(0,75)
6	0(55)	0(0,75)
7	0(55)	0(0,75)
8	- α (41)	0(0,75)
9	+ α (69)	0(0,75)
10	0(55)	- α (0,4)
11	0(55)	+ α (1,1)

4.4.6. Hidrólise Enzimática do Farelo de Milho

As diferentes amostras do substrato farelo de milho foram submetidas à hidrólise enzimática seguindo os seguintes passos:

1 – Pesaram-se amostras de farelo de milho (0,2g; 0,25g; 0,3g; 0,4g; 0,5g; 0,8g e 1,0g) e transferiu-se para cada uma erlenmeyer de 250 mL, correspondendo 7 ensaios no total;

2 – Para cada ensaio, adicionou-se 10 mL do extrato enzimático após determinação da atividade amilásica;

3 – As amostras foram encubadas em shaker com agitação orbital de 152rpm (rotação que se obteve boa homogeneização) a 30°C (temperatura de fermentação);

4 – Retiraram-se amostras em intervalos regulares de tempo 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos de hidrólise, e destas amostras determinou-se a quantidade de açúcares redutores.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização Físico-Química do Farelo de Milho

Na Tabela 8 encontram-se os parâmetros observados e os desvios padrões para a caracterização físico-química do farelo de milho.

Tabela 8 – Caracterização físico-química do farelo de milho

Umidade (b.u)	11,64 ± 0,09
Cinzas (%)	2,04 ± 0,25
AR (%)	0,47 ± 0,10
°Brix (%)	5,00 ± 0,83
pH	4,82 ± 0,30
Densidade Aparente	0,46 ± 0,10
Proteínas Totais (%)	6,87 ± 0,45
Pectina (%)	3,25 ± 0,14
Celulose (%)	21,75 ± 1,65
Amido (%)	51,06 ± 3,28

Conforme a Tabela 8, o elevado teor de amido torna o farelo de milho uma excelente fonte de carbono além de ser excelente fonte amilácea, componente indutor para a síntese de amilases realizada por fungos.

De acordo com Spier (2005), como o amido é um polissacarídeo, suas moléculas complexas não são assimiladas diretamente pelos micro-organismos. Desta forma não havendo outro componente assimilável no meio, o micro-organismo passa a sintetizar aquelas enzimas específicas que degradam o substrato complexo, como o amido contido no farelo de milho, em açúcares assimiláveis garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo.

Os teores de proteína, °Brix, cinzas, umidade e o pH, do farelo de milho condiz com o reportado por Campos *et al.* (2010), em seu estudo sobre a composição nutricional da matéria-prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

O pH do farelo de milho apresentou um valor de 4,82, que está próximo dos valores encontrados por Santos *et al.* (2005a), em seu trabalho de caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju, utilizando o mesmo agente metabolizador. O pH é uma variável importante

em qualquer processo biológico por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática, havendo valores ótimos para o desenvolvimento de micro-organismos. Geralmente, os fungos preferem pH entre 4,5 e 5,0. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio.

O baixo valor encontrado de açúcares redutores é suficiente para proporcionar um crescimento inicial da população microbiana, induzindo o micro-organismo à produção de enzimas através da hidrólise do carboidrato da fonte indutora, o amido.

O substrato deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo. A principal peculiaridade é o alto grau de acessibilidade do micro-organismo a todo o meio e, para tanto, de suas características mais importantes destaca-se a porosidade, o tamanho e o formato das partículas (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Na Figura 6 encontra-se a distribuição granulométrica do farelo de milho. Observa-se que 86% do farelo ficaram retidos nas peneiras de 14 e 24 mesh, o que corresponde aos tamanhos de 1,18 e 0,71 mm, tamanhos estes de partículas considerados satisfatórios para a fermentação semissólida com fungos filamentosos.

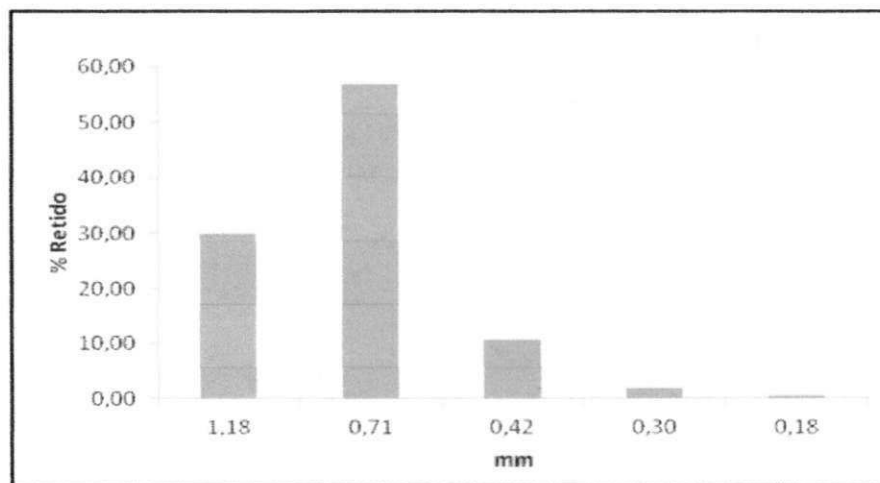


Figura 6 – Perfis granulométricos do farelo de milho

O tamanho das partículas de resíduo do meio fermentativo deve ser obtido de forma uniforme, que não se tenha nem partículas grandes, nem pequenas. De acordo com Del Bianchi *et al.* (2001) se, por um lado, quanto menor o tamanho maior a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação, por outro lado o processo necessita ter uma granulometria própria visando permitir a circulação do ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo.

Souza (2010), estudando a recuperação de poligalacturonases produzidas pela fermentação semissólida do resíduo agrícola do maracujá amarelo, trabalhou com partículas entre 0,71 e 0,42 mm. Santos (2007), estudando a produção de pectinases por *Aspergillus niger*, utilizou bagaço de caju cujas partículas tinham dimensão variando de 0,42mm a 0,84mm. Correia (2004), utilizando bagaço de abacaxi como substrato para fermentação semissólida trabalhou com partículas que variavam de 0,42mm a 0,59mm.

O valor de pectina observado de 3,25% encontra-se dentro do esperado em relação ao tipo de substrato. O percentual de celulose de 21,75 pode ser justificado pelo fato do farelo de milho apresentar em sua estrutura, uma quantidade considerada da casca do milho grão.

5.2. Processo Fermentativo e Análise Estatística

Na Tabela 9 são apresentados os resultados dos 11 ensaios, Atividade Amilásica (AA), obtidos para o tempo de fermentação de 52 h. Esse tempo foi escolhido devido às maiores atividades situarem-se em torno desse tempo.

Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial $2^2 + 3pc$ + configuração estrela (DCCR)

Ensaio	U _(b,n)	N(%)	AA(U/g)
1	-1(45)	-1(0,5)	344,49
2	+1(65)	-1(0,5)	228,92
3	-1(45)	+1(1,0)	256,49
4	+1(65)	+1(1,0)	131,19
5	0(55)	0(0,75)	142,41
6	0(55)	0(0,75)	177,24
7	0(55)	0(0,75)	168,35
8	- α (41)	0(0,75)	341,16
9	+ α (69)	0(0,75)	94,47
10	0(55)	- α (0,4)	191,50
11	0(55)	+ α (1,1)	151,40

Os perfis cinético do pH, umidade, açúcares redutores e atividade enzimática durante o processo fermentativo do farelo de milho, nas condições do ponto central, são apresentados na Figura 7. No APÊNDICE I são apresentados todos os perfis para as demais condições experimentais estudados no presente trabalho.

Na Figura 7 ((a), (b), (c) e (d) são apresentados os resultados dos ensaios 5, 6 e 7 do planejamento experimental correspondendo aos pontos centrais, que foram desenvolvidos com a umidade de 55% em base úmida e concentração de fonte de nitrogênio a 0,75%. Como observação, os gráficos não representam um modelo, as linhas são formas apenas formas de apresentação.

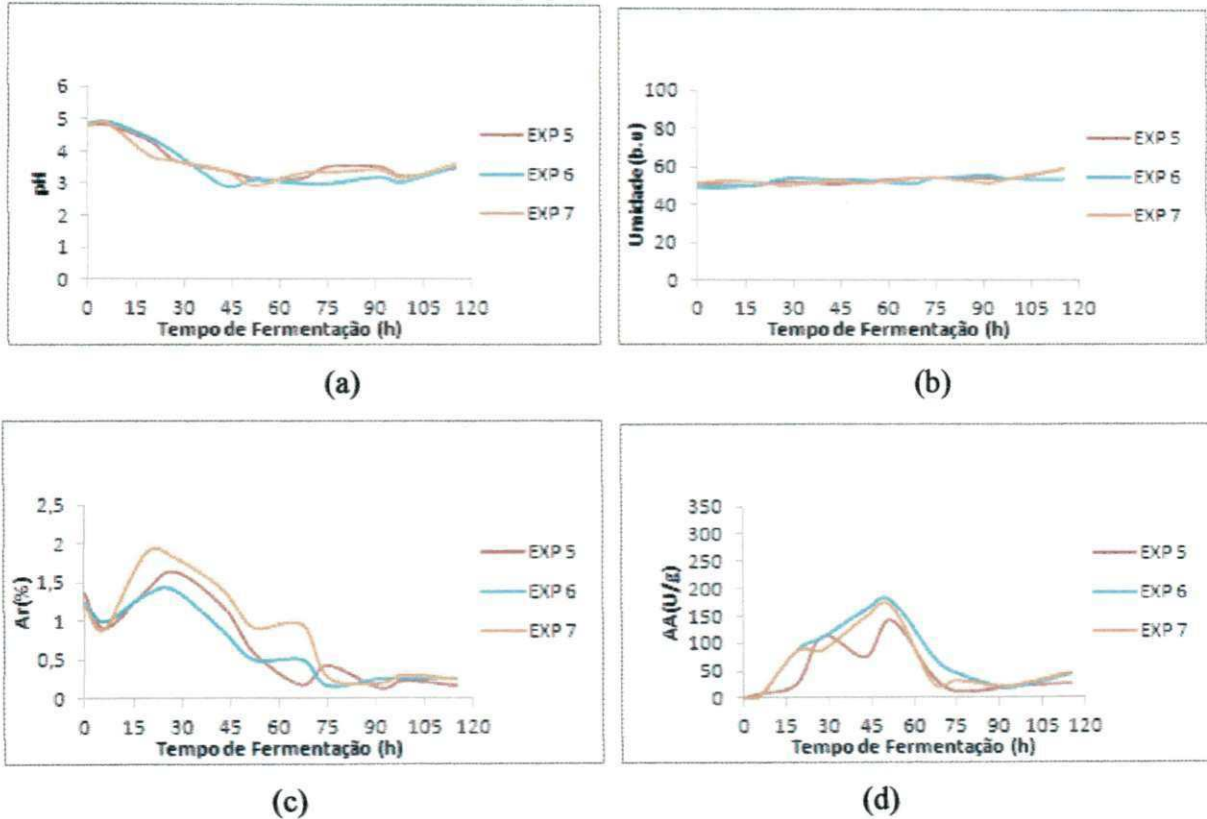


Figura 7 – Perfil cinético do processo fermentativo do farelo de milho para os ensaios do ponto central; (a) pH, (b) umidade, (c) Açúcares Redutores e (d) Atividade Amilásica(AA)

De acordo com a Figura 7, observa-se que os resultados obtidos para os ensaios do ponto central das variáveis estudadas teve comportamento reprodutível, mostrando que houve uma boa reprodutibilidade dos dados do processo fermentativo. Verificando um perfil de pH inicialmente constante, diminuindo em torno das 15 horas, mantendo-se novamente constante até o final do processo. O perfil de umidade manteve-se praticamente constante em todo processo. No início do processo houve uma diminuição no teor de AR seguido de um acúmulo até 30h de fermentação, devido a uma possível hidrólise de fontes de carboidratos mais complexos presentes no farelo de milho (como por exemplo: celulose, pectina e amido) pelo micro-organismo ao meio, em seguida percebe-se uma diminuição dos açúcares redutores até 75h de fermentação, tornando-se praticamente constante até o final do processo. No período entre 15 e

55h, houve uma produção de amilase, com maior pico de atividade em 52 horas de fermentação, que pode ser explicado pelo fato que em baixas concentrações de glicose, surge à necessidade da quebra do amido associado ao crescimento do micro-organismo e daí explicam-se esse acúmulo em formas de açúcares menos complexos, como a glicose, que podem ser metabolizadas pelo micro-organismo, e dessa maneira por via metabólicas internas produz o aumento das enzimas com maior atividade.

Mediante resultados do planejamento experimental DCCR obtidos na Tabela 9, a Equação 14 apresenta o modelo da regressão dos dados para a resposta atividade amilásica (AA).

$$AA = 162,67 - 73,72 \cdot U - 30,31 \cdot N + 38,98 \cdot U^2 + 15,80 \cdot N^2 - 2,43 \cdot U \cdot N \quad (14)$$

Onde os coeficientes em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança e U e N representam a umidade e concentração da fonte de nitrogênio respectivamente. Pode-se observar através da equação que a fonte de nitrogênio não foi estatisticamente significativa. Isso pode significar que o nitrogênio protéico presente inicialmente no farelo de milho, já é suficiente para a metabolização do substrato pelo micro-organismo.

Na Tabela 10 é apresentada a ANOVA do modelo codificado da resposta atividade amilásica.

Tabela 10 - ANOVA para a resposta atividade amilásica

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio
Regressão	59543,74	5	11908,75
Resíduo	8359,86	5	1671,97
Falta de Ajuste	7704,85	3	
Erro Puro	655,01	2	
Total	67903,60	10	

$R^2 = 88\%$

$F_{\text{calculado}} = 7,12$

$F_{\text{tabelado } 0,95;5;5} = 5,05$

Através dos dados da Tabela 10, verifica-se que o modelo é estatisticamente significativo, ao nível de 95% de confiança, pois a razão de $F_{\text{calculado}}$ por $F_{\text{tabelado}} = 1,41$, está acima de 1,0 (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Sendo o modelo da regressão dos dados experimentais da resposta AA em estudo estatisticamente significativo, de acordo com a análise de variância, pôde-se construir a superfície de resposta.

Na Figura 8 é apresentada a superfície de resposta da influência da umidade e da concentração da fonte de nitrogênio no meio fermentativo sobre a atividade amilásica.

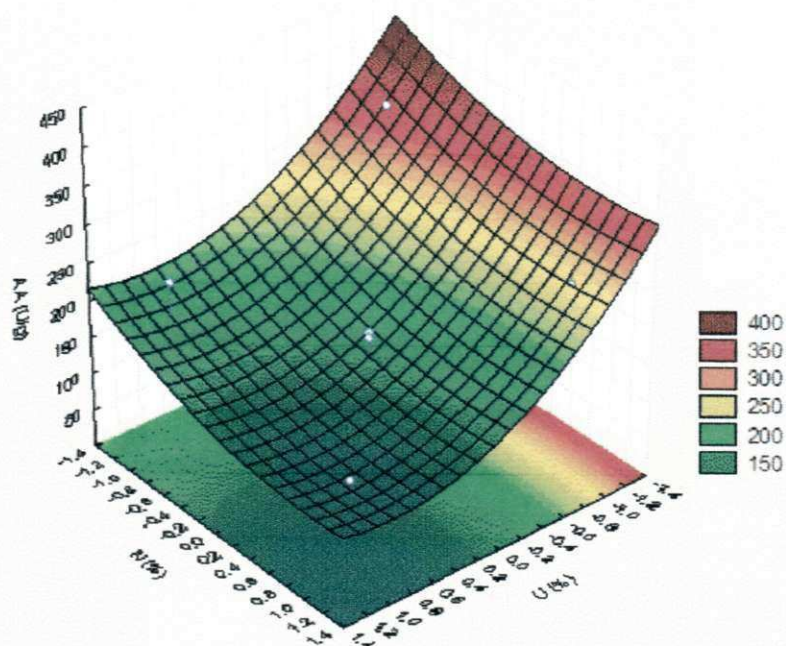
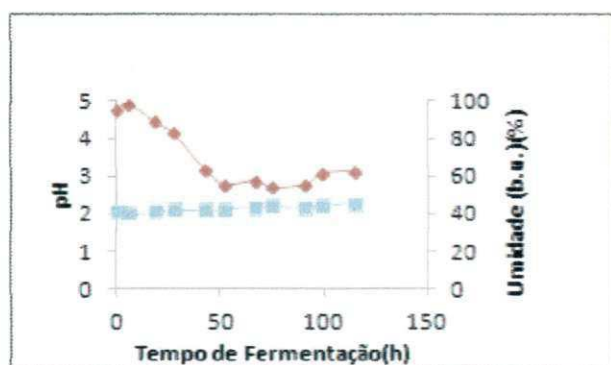


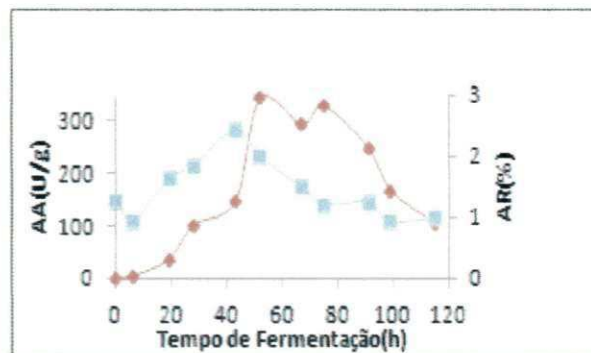
Figura 8 – Superfície de resposta para atividade amilásica (AA)

Observa-se através da superfície de resposta que os maiores valores de atividade foram obtidos quando há diminuição da umidade inicial, independente da concentração de nitrogênio.

Mediante exposto, buscando validar o modelo empírico encontrado (Equação 14), foi realizado um experimento sem acréscimo da fonte de nitrogênio e com umidade inicial do meio de 41(b.u). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para o pH e Umidade (a) e Atividade Enzimática e Açúcares Redutores (b), na condição estudada.



(a)



(b)

Figura 9 – Perfil cinético do processo de produção de amilase, sem adição da fonte de nitrogênio

a) () pH, () Umidade e b) (●) Atividade Enzimática, (▲) Açúcares Redutores

Observa-se através da Figura 9b que em 52h de fermentação a atividade amilásica foi de 346,83U/g de meio fermentado. Confirmando que a fonte de nitrogênio não apresenta influência sobre o processo de produção da enzima.

Verifica-se que o valor da atividade amilásica com a fonte de nitrogênio (Tabela 9), apresentou atividade de 344,00U/g, que é semelhante ao valor encontrado no experimento sem a fonte de nitrogênio.

Sendo assim, o nitrogênio protéico presente no meio de cultivo foi o suficiente para o requerimento nutricional do micro-organismo, ou que o mesmo não necessita desse oligonutriente quando da utilização desse substrato (farelo de milho).

O perfil cinético de açúcares redutores apresentou-se constante no início do processo demonstrando uma possível fase de adaptação do micro-organismo. Em seguida, houve um acúmulo de açúcares redutores até 52 horas de fermentação, onde se tem o pico de maior atividade enzimática, corroborando com os experimentos realizados com a adição da fonte de nitrogênio inorgânico.

O pH observado no ensaio ficou constante entre 0 e 28h de fermentação e após 43 horas diminuiu, passando de 4,56 para 3,16, no período de 52h até 91h manteve-se praticamente constante no valor de 2,78, aumento para 3,10 no final do processo.

A redução de pH foi coincidente com a fase de crescimento logarítmico do fungo, sugerido que pode ter sido decorrente da secreção de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo. O pH está entre os fatores mais importantes que afetam os processos de fermentação, uma vez que ele pode alterar as substâncias químicas do meio de cultivo, ionizar moléculas polares e afetar reações enzimáticas, e dessa forma influenciar no crescimento microbiano pelas mudanças morfológicas e fisiológicas (MADIGAN *et al.*, 2004).

A umidade manteve-se praticamente constante até certo momento do processo fermentativo, apresentando um leve aumento no final do processo devido, provavelmente, as atividades metabólicas ocorridas ao longo do processo fermentativo.

Gonçalves (2006) estudando a produção de amilases por FSS obteve uma atividade enzimática de 95,2U/g de farelo de trigo, utilizando o fungo *Thermomyces lanuginosus* TO-03, obtidos em dois picos, 120h e 192h de cultivo, com 70% de umidade inicial a 45 °C. Anto *et al.*

(2006) utilizando farelo de trigo como substrato, atingiram uma máxima produção da enzima de 271,0 U/gmu, com pH 5,0 e temperatura ótima de 55°C, por FSS pelo fungo da espécie *Aspergillus*, onde perceberam um aumento da produção da enzima pela adição de nitrogênio orgânico (extrato de levedura e peptona, 0,02g/gmu). Kunamneni *et al.* (2005) também estudando a produção de amilase por FSS, obtiveram uma atividade enzimática de 534 U/g de farelo de trigo, utilizando o fungo *T. lamuginosus*, após um período de 120h de fermentação, com 90% de umidade inicial a 50°C. Verificaram um aumento em dobro da produção de amilase com a suplementação do meio fermentativo com 1% de amido solúvel (m/m) e 1% de peptona (m/m).

Os resultados obtidos neste estudo e comparados aos autores mencionados podem evidenciar que o farelo de milho pode ser considerado uma fonte viável na produção de amilase através da fermentação semissólida, apresentando inclusive valores competitivos quando comparado com outras fontes de carbono, já que o valor de atividade amilásica máxima observados foi 347,00 U/g de meio fermentado, com umidade inicial de 41b.u e sem adição de sulfato de amônio no meio, em 52 h de fermentação. Vale ressaltar que tais experimentos foram realizados em condições sem otimização das variáveis do processo.

5.3. Hidrólise Enzimática do Farelo de Milho

O perfil de hidrólise para as diferentes massas do farelo de milho teve o comportamento como disposto na Figura 10, de acordo com os resultados dos açúcares redutores para os diferentes ensaios e sua velocidade.

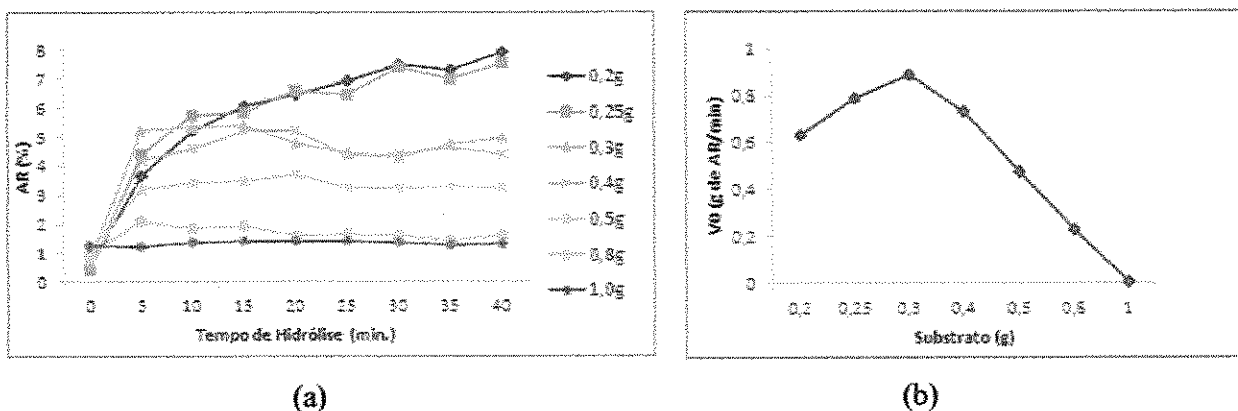


Figura 10 – (a) Perfil de hidrólise enzimática para as diferentes massas do Farelo de Milho nas condições de estudo (Temperatura = 30°C, Rotação = 152rpm e Volume fixo de extrato enzimático = 10 mL) e (b) Perfil da velocidade de hidrólise.

Através da Figura 10 (a), percebeu-se aumento gradativo de açúcares redutores, conforme o aumento do tempo de ação da enzima nos ensaios realizados com 0,2 a 0,8 g de substrato para 10 mL de extrato enzimático com atividade enzimática de 344U/g, produzido sob a melhor condição de produção amilásica (41 b.u e sem adição da fonte de nitrogênio). A maior quantidade de AR produzido foi para o experimento em que a massa de farelo foi de 0,2g após 40 minutos de hidrólise. Para a massa de substrato de farelo de 1g não ocorreu produção de açúcares redutores (AR), ou seja, não houve hidrólise enzimática. Esse fato deve ter ocorrido devido à quantidade de enzima em relação à de substrato não ter sido suficiente para hidrolisá-lo ou uma possível inibição da enzima pelo produto. Foi possível verificar a capacidade hidrolítica das amilases contidas no extrato enzimático, através da liberação dos açúcares redutores, devido à quebra na cadeia dos polímeros de amido.

Através da Figura 10 (b), observa-se que as velocidades iniciais aumentam para as quantidades de substratos de 0,2 a 0,35g. Para as demais concentrações há uma queda brusca dessa velocidade. Esse comportamento corrobora com o observado na Figura 10(a).

De acordo com os resultados, a enzima amilase produzida pelo farelo de milho pode ser adicionada na ração animal (próprio substrato utilizado na fermentação), visto que haverá uma melhor disponibilidade de nutrientes da ração através da degradação do amido, proporcionando uma melhor digestibilidade dos alimentos logo nos primeiros dias de vida dos animais monogástricos.

Dessa forma, a suplementação da enzima endógena (amilase) resultará em uma provável melhora na eficiência da produção avícola, pela possibilidade de maior aproveitamento dos nutrientes nas rações de alimentos alternativos (farelo de milho), de forma a minimizar os custos, com melhoria no desempenho do animal.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- ❖ A caracterização do resíduo mostrou que este substrato pode ser considerado viável para produção de amilase;
- ❖ A fonte de nitrogênio inorgânico não afetou a excreção da amilase pelo micro-organismo;
- ❖ Através da ação enzimática (amilase) produzida pelo farelo de milho, houve a produção de açúcares redutores a partir da hidrólise do farelo de milho (ração animal), enfatizando seu uso como alimento alternativo nas dietas das aves, pela melhor disponibilidade dos nutrientes no substrato fermentado, após suplementação enzimática.

7. Referências Bibliográficas

AGUIAR C.; MARGONAR M. H.; LUCENA S. L. Produção de celulases pó *Aspergillus niger* e efeito do pH e da temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos. XIV Encontro de Química da Região Sul, 2008.

ALBINO, L.; BUZEN, S.; ROSTAGNO, H. S. Ingredientes promotores de desempenho para frangos de corte. IN: Seminário de aves e suínos. Anais... Belo Horizonte: Avesui Regiões, P.73-90, 2007.

ALI S.; HOSSAIN Z. Characteristics for glucoamylase from *Aspergillus terreus*. Journal Applied Bacteriology, v. 71, p. 144-146, 1991.

ALMEIDA M. M. Estudo da bioconversão do mandacaru (*Cereus jamacaru p. Dc.*) para produção de bioprodutos. Tese de Doutorado em Engenharia de Processos – UFCG, 2007.

ANTO H.; TRIVEDI U.B.; PATEL K.C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology, v. 97, p. 1161-1166, 2006.

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

BEDFORD M. R. Efeito del uso de enzimas digestivas en la alimentacion de aves. Avicultura Profesional, Georgia, v.14, n.4, p. 24-29, 1996.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, p.1015, 2005.

BRITO C. O.; ALBINO L. F. T.; ROSTAGNO H. S.; GOMES P. C.; DIONIZIO M. A.; CARVALHO D. C. O. Adição de complexo multienzimático em dietas a base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. R. Bras. Zootec., v. 35, n. 2, p. 457-461, 2006.

BRUM P. A. R.; AVILA V. S.; LIMA G. J. M. M.; COLDEBELA A. SCHEUERMANN G.; USINGLER F.; TOIGO G. C. Efeito da suplementação de α -amilase em dietas a base de milho e farelo de soja na digestibilidade da energia das rações e no desempenho de frangos de corte. Comunicado Técnico da Embrapa. 425, 2006.

BULÉON A.; COLONNA P.; PLANCHOT V.; BALL S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 23, p. 85-112, 1998.

CAIRES M. C.; FAGUNDES S. N.; FERNANDES E. A.; CARVALHO P. A.; Enzimas na Alimentação de Frango de Corte – *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 5, n. 49, p. 491-497, 2008.

CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

CEREDA P. M.; DAIUTO R. E.; VILPOUX O. Método de determinação de amido por digestão ácida em microondas. *ABAM – Associação Brasileira dos Produtos de Amido e Mandioca*, ano II, n. 08, 2004.

CAMPESTRINI E.; SILVA M. T. V.; APPELT D. M. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal – *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 2, n. 6, p. 259-272, 2005.

CAMPOS S. C.; ARAÚJO M. L.; MINHONI A. T. M. E ANDRADE N. C. M. Análise Físico-Química e Composição Nutricional da Matéria-Prima e de Substratos Pré e Pós Cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Interciência* v. 35, n. 1, 2010.

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

CHOCT, M. e KOCHER, A. Non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*. June: 13-26, 2000.

CONTE, A. J., et al. Efeito da Fitase e Xilanase sobre o Desempenho e as características Ósseas de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Farelo de Arroz. In: *R. Bras. Zootec.*, v. 32, n. 5, p. 1147-1156, 2003.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. UFRN, 2004.

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

COSTA F. G. P., BRANDÃO P. A., BRANDÃO J. S.; SILVA J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. *Ciênc. Agrotec.* 31:865-870, 2007.

COTTA T.; TORRES D. M.; OLIVEIRA A. I. G. Efeitos da adição de um complexo enzimático sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciências Agrotécnicas*, v. 26, n. 4, p. 852-857, 2006.

COWIESON A. J.; HRUBY M.; PIERSON E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. *Nutrition Research Reviews*, v. 19, n. 1, p. 90-103, 2006.

COURI F. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

COUSINS B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio Internacional ACAV – Embrapa sobre Nutrição de Aves, I. Concórdia, 17 e 18 nov., 1999.

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

DEL BIANCHI V. L.; MORAES I. O.; CAPALBO D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., vol. 2, 2001.

DUFF B. J. S. e MURRAYH D. W. Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technolgy*, n.55, p. 1-33, 1996.

EDUARDO M. P. Hidrólise enzimática de mandioca e puba para obtenção de xarope de maltose. Dissertação de Mestrado em Ciências. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 2002.

FENEMA, Owen. *Química de los alimentos*. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FLORES M. P.; CAST A. J.; MCNAB J. M. Effect of enzyme supplementation to improve the nutritive and value of triticale in poultry diets. *Animal Feeds Science and Tecnology*, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 237-243, 1994.

GALLANT D. J.; BOUCHET B.; BALDWIN P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, v. 32, n. 3-4, p. 177-191, 1997.

GHAZALAH A. A.; ABDEL-GAWAD A. H.; SOLIMAN M. S.; AMANY W. Y. Effect of enzyme preparation on performance of broilers fed corn soybean meal based diets Egypt. *Poultry Sci.* 25: p. 295-316, 2005.

GONÇALVES L. Z. A. Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual Paulista, 2006.

GUPTA R.; MOHAPATRA H.; GOSWAMI V. K.; CHAUHAN B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, p. 1-18, 2003.

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

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

HASAN S. D. M., Produção, recuperação e caracterização de proteínas elergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium)* monóceras obtidas por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

HESELTIME C.W. Solid state fermentation – Parte I. *Process Biochemistry*. v. 4, p.24-27, 1977.

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

KILIKIAN B. V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. *Revista de Microbiologia*, v. 27, p. 10-12, 1996.

KOBAYASHI F.; SAWADA T.; NAKAMURA T.; OHNAGA M.; GODLIVING M.; USHIYAMA T. Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of stream-explodet potato. *Appl. Bioch. Biotechnol.*, v. 69, p. 177-189, 1998.

KOCHER G. S.; KAUR P.; GREWAL H. S. Production of α -amylase by *Aspergillus niger* using wheat bran in submerged and solid state fermentations. *Indian J. Microbiol.* v. 42, p. 143-145, 2003.

KRISHNA S. H.; RAO K. C. S.; BABU J. S.; REDDY D. S. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering*, p. 467-470, 2000.

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

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

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. Métodos ou diagnósticos foliar utilizados nas plantações do grupo booken na Guiana Inglesa: amostra geral e técnica de análises. *Fertilité*, n. 21, p. 3-11, 1964.

LI J. H.; VASANTHAN T.; HOOVER R.; ROSSNAGEL B. G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hidrolisis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*, v. 84, n. 4, p. 621-632, 2004.

MADIGAN M. T.; MARTINKO J. M.; PARKER J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo. Person Education, 2004.

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

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, 426-428, 1959.

MINAFRA S. C. D. Produção e Suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

MITIDIERI S.; CAMASSOLA S.; SCHRANK A.; VAINSTEIN M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: *Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática*. Brasília, DF, 2002.

MOREIRA F. G.; LIMA F. A.; PEDRINHO S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii* Revista de Microbiologia, v. 30, p.157-162, 1999.

NAHAS E.; WALDERMARIN M. M. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. Revista Latino Americana de Microbiologia. v. 44, p. 5-10, 2002.

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

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

NOVOZYMES. Disponível em: <(http://novozymes.com.)> Acesso em: 2005

NUNES I. J. Nutrição animal básica. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, p.387, 1998.

NUVITAL, Revista Alimentação Animal – Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, Sindirações, Nº 19, 2000.

ONDERCI M.; SAHIN N.; SAHIN K.; CIKIM G.; AYDIN A.; OZERCAN I.; AYDIN S. Efficacy of Supplementation of α -Amylase-Producing Bacterial Culture on the Performance, Nutrient Use and Gut Morphology of Broiler Chickens Fed a Corn-Based Diet. *Poultry Science*, v. 85, n. 3, p. 505-510, 2006.

PAES D. C. M., Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica n. 75, 2006.

PALMA M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

PANDEY A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, p.109-117, 1992.

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

PANDEY A.; SOCCOL C. R.; SOCCOL V. T.; SINGH D.; MOHAN R. Advances in Microbial Amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152, 2000.

PANDEY A. Solid-state fermentation. *Biochemiccal Engineering Journal.* V. 13, p. 81-84, 2003.

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

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

PENZ JR., A. M.; VIEIRA, S. L. Nutrição na primeira semana. In: *Simpósio Internacional Sobre Manejo de Pintos de Corte. Anais...* Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.121-139, 1998.

PINTO G. A. S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 207, 2003.

RABELO S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: Dissertação de Mestrado da Faculdade de Engenharia Química, 2007.

RANGANA S. Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1979.

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

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

ROBYT J.F. Cyclodextrins. In: *Essentials of carbohydrate chemistry.* New York, Springer, Cap. 8, p. 245-250, 1998.

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

RODRIGUES M. I.; IEMMA A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES B. P.; ROSTAGNO S. H.; ALBINO T. F. L.; GOMES C. P.; BARBOSA A. W.; TOLEDO S. R. Desempenho de Frangos de Corte, Digestibilidade de Nutrientes e Valores Energéticos de Rações Formuladas com Vários Milhos, Suplementadas com Enzimas. R. Bras. Zootec., v.32, n.1, p.171-182, 2003.

ROSTAGNO S. H.; Farelo de Gérmen de Milho nas Rações de Frango de Corte - Artigo Técnico Poli-nutri Alimentos 2001.

RUTZ F.; TORERO A.; FILER K. Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas. Revista Ave Word – Edição 29, 2008.

SANTOS S. F. M.; MACEDO G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de poligalacturonase. Química Nova, v. 31, n. 8, p. 1973 – 1978, 2008.

SANTOS S. F. M.; NOBREGA J. E.; PINTO G. A. S.; MACEDO G. R.; SILVA F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida. In: XV Simpósio Brasileiro de Bioprocessos, Recife, 2005a.

SANTOS S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado em Engenharia Química, UFRN, Natal, 2007.

SATO K., SUDO S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology – Small-scale solid-state fermentations. 2 edition, Washington, p. 61-79, 1999.

SCHMIDELL W.; LIMA A. U.; AQUARONE E.; BORZANI W. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica v.2. Editora Edgard Blucher, 2001.

SHEPPY C., The current feed enzyme market and likely trends. Enzyme In: Farm Animal Nutrition, CABI, New York, p. 1-10, 2001.

SHIOTA V. M.; ZANELATO A. I.; THOMÉO J. C. Produção de Enzimas Celulolíticas por Fermentação em Estado Sólido. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto, 2001.

SILVA M. T., Produção e Determinação das Propriedades Funcionais das Amilases de *Aspergillus niveus*. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. 2009.

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

SOCCOL C.R. Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne, p. 218, 1992.

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

SONI S. K.; KAUR A.; GUPTA J. K. A solid State Fermentation Based Bacterial α -amylase and Fungal Glucoamylase System and its Suitability for the Hydrolysis of Wheat Starch. Process Biochemistry, v. 39, n. 2, p. 185-192, 2003.

SOUSA B. A. C., Recuperação de Poligalacturonases Produzidas pela Fermentação Semi-Sólida do Resíduo Agrícola do Maracujá Amarelo Empregando Sistema Aquoso Bifásico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

SPIER R. M. Produção de Enzimas Aminolíticas Fúngicas α -amilase e Amiloglucosidase Por Fermentação no Estado Sólido. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Paraná, 2005.

SUMERLY R. et al. Hidrólise do amido. In: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill, v. 3, p. 377-448, 2002.

TOLEDO G. S. P.; COSTA P. T. C.; SILVA J. H.; CECCANTINI M. POLLETO JUNIOR C. frangos de corte alimentados com dietas de diferentes densidades nutricionais suplementadas ou não com enzimas. Ciência Rural, v.37, n.2, p.518-523, 2007.

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

UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. Morphology of Medically Important Fungi, San Francisco. Disponível http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/launchpage.html. 2012.

VIEILLE C., ZEIKUS G. J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 1-43, 2001.

VIHINEN M.; MANRSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, p. 329-418, 1989.

XU F.; SUN J. LIU C. F.; SUN R. C. Comparative study of alkali-and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*. v.314, p.253-261, 2006.

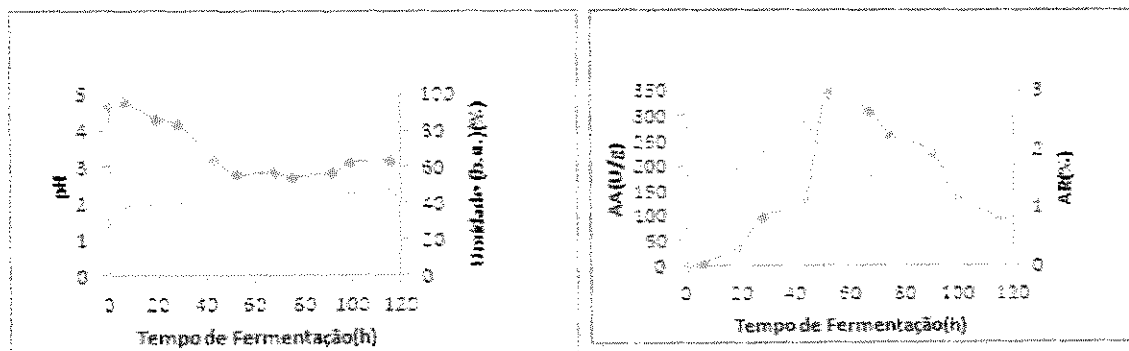
ZANELLA I.; SOKOMURA J. A.; PIZAURO K. Z. et al. Efeito da adição de enzimas exógenas na dieta sobre a atividade enzimática da amilase e tripsina pancreática em frangos de corte. *Anais... Conferencia Apinco 99 de Ciência e Tecnologia Avícolas*, 92 p.45, 1999.

ZANOTTO D. L; ALBINO L. F. T.; BRUM P. A. R.; FIALHO F. B. Efeito do grau de moagem no valor energético do milho para frangos de corte. In: *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Maringá, 1998.

APÊNDICE I

Perfis cinéticos do processo fermentativo de produção de amilase pela FSS em farelo de milho correspondente aos ensaios 1, 2, 3, 4 e os quatro pontos axiais do planejamento fatorial – (a) pH (●) e Umidade (○) – (b) Atividade Enzimática (▲) e Açúcares Redutores (□).

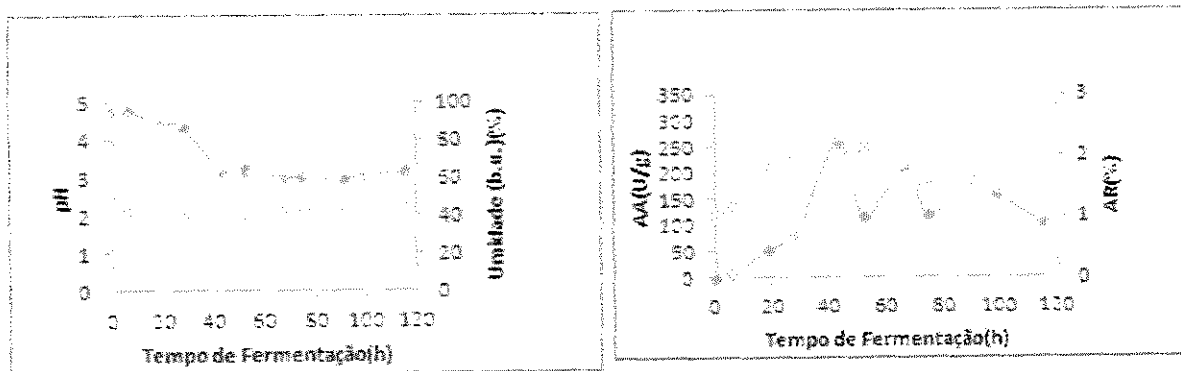
❖ Ensaio 1 (Umidade inicial do meio = 45% e Concentração da fonte de nitrogênio = 0,5%)



(a)

(b)

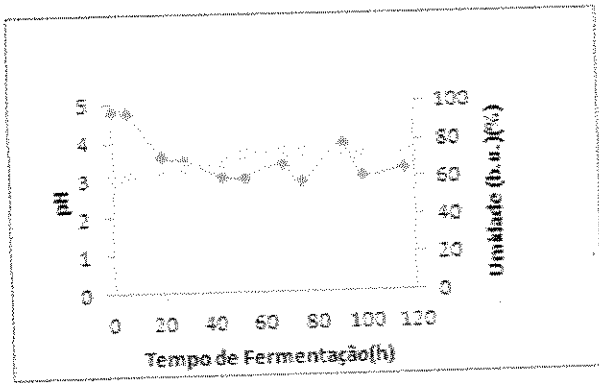
❖ Ensaio 2 (Umidade inicial do meio = 45% e Concentração da fonte de nitrogênio = 1,0%)



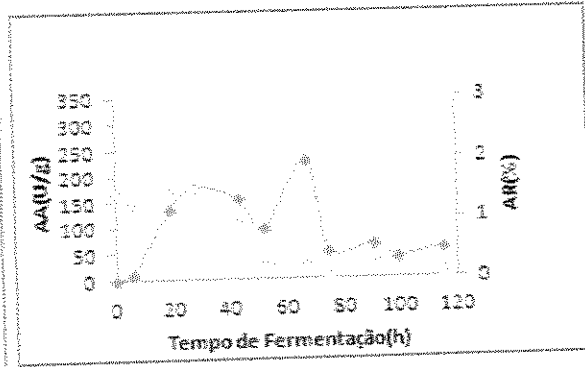
(a)

(b)

❖ Ensaio 3 (Umidade inicial do meio = 65% e Concentração da fonte de nitrogênio = 0,5%)

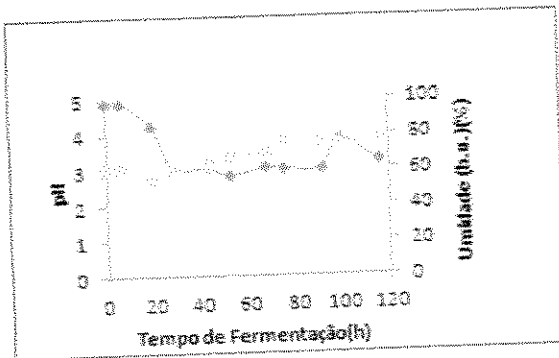


(a)

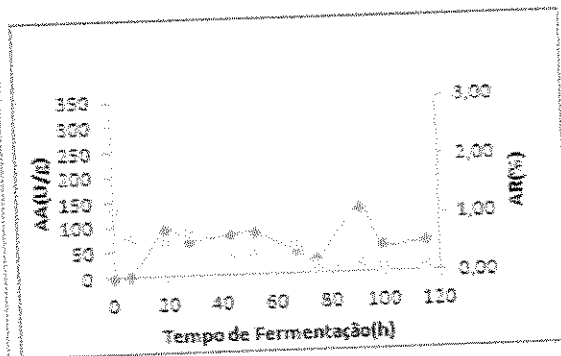


(b)

❖ Ensaio 4 (Umidade inicial do meio = 65% e Concentração da fonte de nitrogênio = 1,0%)

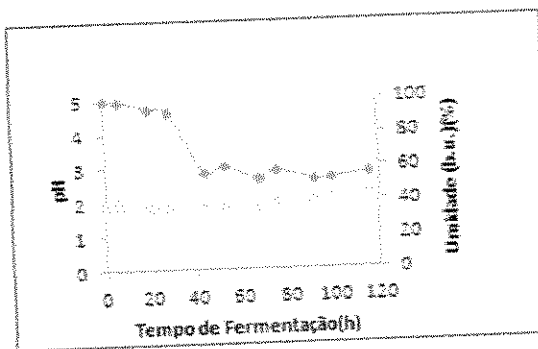


(a)

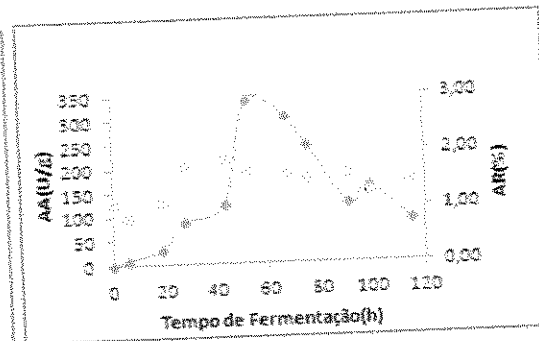


(b)

❖ Ensaio 8 - Ponto axial (Umidade inicial do meio = 41% e Concentração da fonte de nitrogênio = 0,75%)

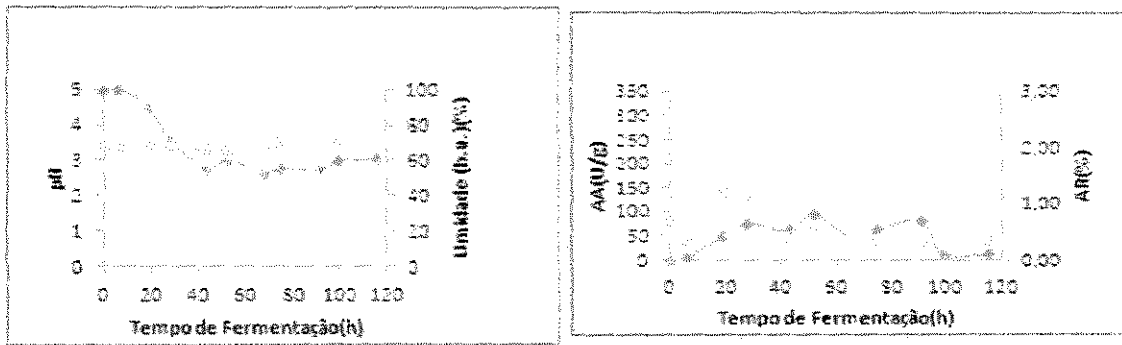


(a)



(b)

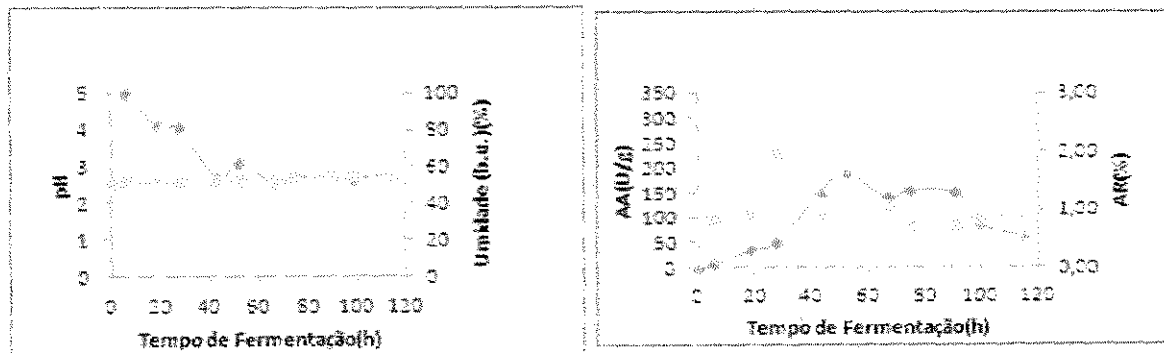
❖ Ensaio 9 - Ponto axial (Umidade inicial do meio = 69% e Concentração da fonte de nitrogênio = 0,75%)



(a)

(b)

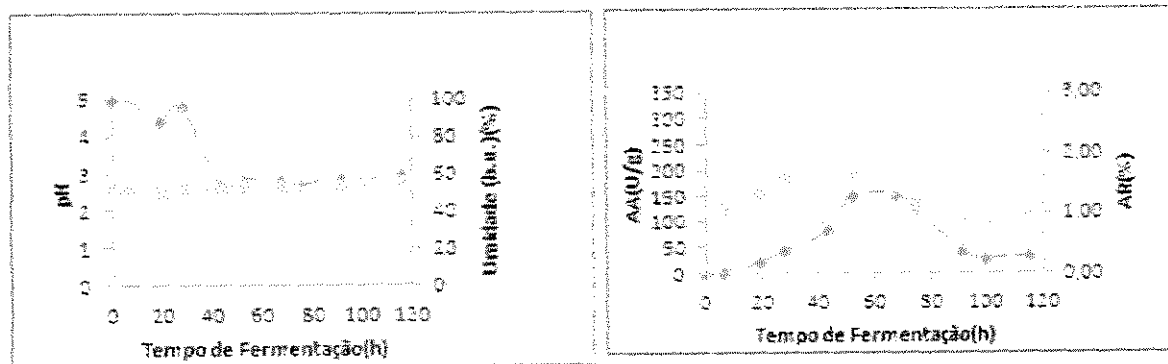
❖ Ensaio 10 - Ponto axial (Umidade inicial do meio = 55% e Concentração da fonte de nitrogênio = 0,4%)



(a)

(b)

❖ Ensaio 11 - Ponto axial (Umidade inicial do meio = 55% e Concentração da fonte de nitrogênio = 1,1%)



(a)

(b)