

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR *Macrocybe*
titans CULTIVADO EM RESÍDUOS SÓLIDOS AGROINDUSTRIAIS**

ANA CLAUDIA WISNIEWSKI

BLUMENAU - 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA CLAUDIA WISNIEWSKI

**PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR *Macrocybe*
titans CULTIVADO EM RESÍDUOS SÓLIDOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

Orientadora: Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares

Co-orientadora: Dra. Márcia Brandão Palma

BLUMENAU – 2009

“Dedico este trabalho aos meus pais, Lucidio Antônio e Inês Teresinha, que doam toda sua vida ao crescimento e a formação dos dois filhos e, em especial, ao meu irmão, João Henrique, pela força, fé em Deus e coragem de lutar para que o bem vença sempre”

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas e pelo amparo nas horas mais difíceis;

Aos meus pais, pela confiança na minha capacidade, pelos ensinamentos para uma vida honesta, pelos conselhos, por não desistirem nunca de lutar por seus filhos, e em especial, por suas orações e preces realizadas, vocês são, com certeza, responsáveis pela minha formação;

Ao meu irmão, pela infância juntos que me traz saudade, e pelo presente, por cuidar de nossos pais na minha ausência;

Ao meu companheiro, Carlos Eduardo, pela paixão e paciência durante esses 2 anos de trabalho, que seja eterno;

Às minhas orientadoras, Prof^{as} Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares e Dra. Márcia Brandão Palma, pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade de trabalhar na área de biotecnologia. Agradeço as discussões e contribuições científicas e, em especial, quero agradecer pela compreensão, amizade, persistência e sabedoria de identificar o limite de cada um. Com vocês, com certeza, aprendi a admirar a pesquisa científica;

Aos colegas de laboratório, pelas trocas de conhecimento e companheirismo durante as etapas experimentais deste trabalho;

Aos verdadeiros amigos que conquistei em Blumenau, os quais se tornaram minha família frente grandes dificuldades;

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Prof.^o Dr^o Adilson Pinheiro pelo apoio, sugestões e firmeza durante essa caminhada;

Aos demais professores do Programa, pelos conhecimentos transmitidos;

Ao professor Msc. Carlos Efrain pelas orientações estatísticas;

À Dr.^a Maria Ângela Lopes Amazonas, da EMBRAPA Florestas, pela valiosa colaboração;

A turma do mestrado de 2007, por tudo que aprendemos, dividimos, rimos e melhoramos como pessoas;

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado;

Muito obrigada.

“O inconveniente das pessoas e dos países é a esperança de encontrar as saídas e soluções fáceis. Sem crise não há desafios, sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia”.

Albert Einstein

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de produção das enzimas α -amilase e glucoamilase pelo fungo *Macrocybe titans* cultivado em dois resíduos agroindustriais considerados substratos base de crescimento suplementados com bagaço de mandioca e três tipos de farelos. Foram realizados dois ensaios. O primeiro deles – Ensaio I, constituído por 9 tratamentos empregando como substrato base bainhas medianas do processamento da palmeira-real-da-austrália e 9 tratamentos com o bagaço de malte. Os resíduos foram suplementados com bagaço de mandioca (4 g) como fonte de amido e como fonte de nitrogênio foram empregados farelo de soja, farelo de arroz e farelo de trigo nas concentrações 1,5 g; 4 g e 7 g, para cada farelo em 30 g de resíduo base. Foram determinados o crescimento micelial axial durante o período de cultivo a 25°C, e a variação da umidade, da atividade de água, dos valores de pH, de minerais totais e da atividade de glucoamilase. O segundo ensaio – Ensaio II, acompanhou a cinética de produção das enzimas α -amilase e glucoamilase no substrato que mostrou o desempenho mais satisfatório no primeiro ensaio (substrato a base de bagaço de malte contendo farelo de soja nas concentrações 4 g e 7 g). Os resultados do Ensaio I indicaram que o crescimento micelial axial do fungo é significativamente influenciado pelo tipo de substrato. No meio contendo bagaço de malte a velocidade de formação das hifas foi quase 50% superior a daquelas produzidas nas bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália. Quanto aos tipos de farelos utilizados, o de soja, mesmo em concentrações mais baixas, quando comparado ao farelo de arroz e ao farelo de trigo, proporcionou maior velocidade de formação de hifas e maior vigor micelial. Os valores de pH nos dois substratos base mostraram alteração com tendência a obtenção de um valor constante próximo de 5,0 indicando que este fungo, como outros basidiomicetos, possui uma tendência de auto regulação do pH para seu valor ótimo de crescimento vegetativo. Os resultados do Ensaio II indicaram que a atividade máxima de α -amilase encontrada para o tratamento com 4g de farelo de soja (12,71 U/g de meio sólido) foi superior ao do experimento com 7 g de farelo de soja (6,28 U/g de meio sólido). Da mesma forma, a melhor atividade de glucoamilase foi obtida no meio com 4g de farelo (19,07 U/g de meio sólido) sobre 13,33 U/g de meio sólido no meio com 7 g de farelo de soja. Os valores de atividades enzimáticas de α -amilase e glucoamilase produzidos pelo fungo *Macrocybe titans* indicam que este fungo não apresenta expressão potencial para estas enzimas, nas condições estudadas, tanto para substratos em que há fornecimento de material lignocelulósico (bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália) como para resíduos com material tanto lignocelulósico como amiláceo (bagaço de malte).

Palavras-chave: resíduos sólidos, bagaço de malte, bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália, *Macrocybe titans*, α -amilase, glucoamilase.

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the potential the fungus *Macrocybe titans* has to produce α -amylase and glucoamylase enzymes, cultivated in two agroindustrial residues considered base (growth) substrate, which are supplemented with cassava bagasse and three types of brans. Two assays were performed. The first one - Assay I, was composed of: 9 treatments using as base substrate medium leaf sheaths from Australian king palm tree processing, and 9 treatments with malt bagasse. The residues were supplemented with cassava bagasse (4g) as a source of starch and, as a source of nitrogen, it was used soy bran, rice bran and wheat bran at concentrations of 1.5 g; 4 g and 7 g, for each bran, in 30 g of base residue. It was determined the axial mycelial growth during the cultivation period at 25°C, as well as the variation of humidity, water activity, pH values, total minerals and glucoamylase activity. The second assay - Assay II, followed the kinetics of the production of α -amylase and glucoamylase enzymes in the substrate that showed the best results in the first assay (malt bagasse substrate containing soy bran at concentrations of 4 g and 7 g). The results of Assay I pointed out that the axial mycelial growth of the fungus is remarkably influenced by the type of substrate. In the medium containing malt bagasse the speed of hypha formation was almost 50% higher than in those that took place in the leaf sheath of Australian king palm tree. Regarding the kind of bran which was used, soy bran, even in very low concentrations, when compared to rice bran and wheat bran, provided a higher speed of hypha formation and higher mycelial vigor. The pH values in the two base substrates showed changes, tending to a constant value of about 5.0, indicating that this fungus, as the same as other basidiomycetes, tend to self-control the pH for its optimum value of vegetative growth. The results of Assay II indicated that the maximum α -amylase activity found for the treatment with 4 g of soy bran (12.71 U/g of solid medium) was superior to the one obtained in the experiment with 7 g of soy bran (6.28 U/g of solid medium). Also, the best glucoamylase activity was obtained in the medium with 4g of bran (19.07 U/g of solid medium) over 13.33 U/g of solid medium in the medium with 7 g of soy bran. The values of enzymatic activity of the α -amylase and glucoamylase produced by the fungus *Macrocybe titans* indicate that this fungus does not present a potential expression for these enzymes under the studied conditions, not only for substrates in which there is a supply of lignocellulosic material (leaf sheath of Australian king palm tree) but also for residues with both lignocellulosic and amylose (malt bagasse) material.

Key-words: solid residues, malt bagasse, leaf sheath of Australian king palm tree, *Macrocybe titans*, α -amylase, glucoamylase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 2.1 - Bainhas medianas descartadas no meio ambiente.	27
Figura 2.2 - Utilização dos resíduos do processamento da palmeira-real-da-austrália para geração de produtos	28
Figura 2.3 - Etapas do processo cervejeiro – entrada de matéria prima (cevada) e saída de produtos (cerveja e chopp), bem como resíduos gerados durante esse processo	32
Figura 2.4 - Principais benefícios proporcionados pelos fungos	33
Figura 2.5 - <i>Macrocybe titans</i> no ambiente natural	35
Figura 2.6 - Hidrólise do amido por amilase com diferentes especificidades	40
Figura 2.7 - Representação esquemática de amilopectina	41
Figura 2.8 - Hidrólise enzimática do amido em glucose.	42
Figura 2.9 - Representação da enzima α -amilase sobre as frações de amido (amilose e amilopectina)	43
Figura 3.1 - Bainhas medianas trituradas e desidratadas	55
Figura 3.2 - Substratos base e suplementos utilizado nos ensaios	57
Figura 3.3 - Inóculo de <i>Macrocybe titans</i> em meio BDA	60
Figura 3.4 - Esquema do procedimento para a produção do inóculo de <i>Macrocybe titans</i> em meio BDA	61
Figura 3.5 - Esquema representativo dos procedimentos para o desenvolvimento do Ensaio I	64
Figura 3.6 - Papel milimetrado utilizado para marcar o crescimento micelial axial	65
Figura 3.7 - Seqüência dos passos para dosagem da enzima α -amilase	71
Figura 3.8 - Seqüência dos passos para dosagem da enzima glucoamilase	73
Figura 3.9 - Seqüência dos passos para dosagem de proteínas totais nos meios de cultivo estudados	75
Figura 4.1 - Imagens do crescimento micelial axial (cm) de <i>Macrocybe titans</i> nos substratos do Experimento A e B comparando concentrações diferentes de um mesmo suplemento	79

Figura 4.2 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T1; farelo de arroz: T2; farelo de trigo: T3) na concentração de 1,5 g	80
Figura 4.3 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T4; farelo de arroz: T5; farelo de trigo: T6) na concentração de 4,0 g	81
Figura 4.4 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T7; farelo de arroz: T8; farelo de trigo: T9) na concentração de 7,0 g	81
Figura 4.5 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T1; farelo de arroz: T2; farelo de trigo: T3) na concentração de 1,5 g	82
Figura 4.6 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T4; farelo de arroz: T5; farelo de trigo: T6) na concentração de 4,0 g	82
Figura 4.7 -	Crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T7; farelo de arroz: T8; farelo de trigo: T9) na concentração de 7,0 g	83
Figura 4.8 -	Valores do comprimento médio do micélio de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato a base de bainhas medianas tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY	83
Figura 4.9 -	Valores do comprimento médio do micélio de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato a base de bagaço de malte tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY	84
Figura 4.10 -	Valores da velocidade média do crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY	85
Figura 4.11 -	Valores da velocidade média do crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY	85
Figura 4.12 -	Variação do pH (inicial e final) do cultivo de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas	89
Figura 4.13 -	Variação do pH (inicial e final) do cultivo de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte	89
Figura 4.14 -	Variação do percentual de cinzas (inicial e final) do cultivo de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas	95
Figura 4.15 -	Variação do percentual de cinzas (inicial e final) do cultivo de <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte	95

Figura 4.16 -	Atividade Enzimática de Glucoamilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato bainhas medianas e bagaço de malte	98
Figura 4.17 -	Atividade Específica de Glucoamilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo <i>Macrocybe titans</i> nos diferentes tratamentos com substrato bainhas medianas e bagaço de malte	99
Figura 4.18 -	Fotografia do sistema de cultivo de <i>Macrocybe titans</i> em bagaço de malte (Tratamento 4) para o Ensaio II.	100
Figura 4.19 -	Atividade Enzimática de α -amilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo <i>Macrocybe titans</i>	101
Figura 4.20 -	Atividade Específica de α -amilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo <i>Macrocybe titans</i>	102
Figura 4.21 -	Atividade Enzimática de glucoamilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo <i>Macrocybe titans</i>	103
Figura 4.22 -	Atividade Específica de Glucoamilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo <i>Macrocybe titans</i>	103

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 - Etapas de conversão enzimática do amido	40
Tabela 2.2 - Características de glucoamilases	45
Tabela 2.3 - Trabalhos desenvolvidos visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais para diferentes finalidades.	
Tabela 3.1 - Composição química das bainhas medianas da palmeira-real-da-austrália	56
Tabela 3.2 -	56
Tabela 3.3 - Composição química do resíduo de cervejaria úmido (RMU)	56
Tabela 3.4 - Composição química do farelo de soja peletizado (46%)	58
Tabela 3.5 - Composição nutricional do farelo de trigo cru	58
Tabela 3.6 - Composição química do farelo de arroz (% matéria seca)	59
Tabela 3.7 - Composição físico-química do bagaço de mandioca	59
Tabela 3.8 - Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Experimento A	63
Tabela 3.9 - Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Experimento B	63
Tabela 3.10 - Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Ensaio II e os intervalos de leitura	69
Tabela 4.1 - Umidade inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bainhas medianas	92
Tabela 4.2 - Umidade inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bagaço de malte	92
Tabela 4.3 - Conteúdo dos minerais em mg/100g das bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália e do bagaço de malte	96
Tabela 4.4 - Valores de Proteínas Totais expressos em mg/g, inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bainhas medianas	97
Tabela 4.5 - Valores de Proteínas Totais expressos em mg/g, inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bagaço de malte	97

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	-	Batata Dextrose-Ágar
E.C.	-	Enzyme Comission
EB	-	Energia Bruta
ED	-	Energia digestível
EE	-	Extrato etéreo
EM	-	Energia metabolizável
ETA	-	Estação de Tratamento de Água
ETE	-	Estação de Tratamento de Efluentes
FDA	-	Fibra de detergente ácido
FDN	-	Fibra de detergente neutro
FES	-	Fermentação em Estado Sólido
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>L.</i>	-	<i>Lentinula</i>
LAPRA	-	Laboratório de Processamento de Alimentos
LEB	-	Laboratório de Engenharia Bioquímica
LSPA	-	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
<i>M.</i>	-	<i>Macrocybe</i>
NDT	-	Nutrientes digestivos totais
ONG	-	Organização não governamental
<i>P.</i>	-	<i>Polyporus</i>
PB	-	Proteína Bruta
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PI	-	Ponto Isoelétrico
RSC	-	Resíduo seco de cerveja
RUC	-	Resíduo úmido de cerveja

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	Porcentagem
μmol	-	Micromol
A.a./ A.w.	-	Atividade de água /Water Activity
C	-	Carbono
Ca	-	Cálcio
Cd	-	Cádmio
cm	-	Centímetros
Cu	-	Cobre
Fe	-	Ferro
g	-	gramas
gms	-	gramas de massa seca
g/L	-	Gramas por litro
Hg	-	Mercúrio
I	-	Iodo
K	-	Potássio
kcal	-	Quilocaloria
kDa	-	Quilodáltons (Unidade de massa molecular)
kg	-	Quilograma
kJ	-	Quilojoule
L	-	Litro
m	-	Metro
Mcal	-	Megacalorias
Mg	-	Magnésio
mg	-	Miligrama
min.	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetros
Mn	-	Manganês
N	-	Nitrogênio
Na	-	Sódio

NaCl	-	Cloreto de Sódio
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
P	-	Fósforo
Pb	-	Chumbo
rpm	-	Rotação por minuto
sp.	-	Espécie
spp.	-	Espécies
ton.	-	Toneladas
U	-	Unidade internacional de atividade enzimática
v	-	volume
Zn	-	Zinco
α	-	Alfa
β	-	Beta

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 SETOR AGROINDUSTRIAL E A GERAÇÃO DE RESÍDUOS	22
2.1.1 Resíduos do processamento da palmeira-real-da-austrália (<i>Archontophoenix alexandrae</i>)	26
2.1.2 O processo cervejeiro e seus resíduos	28
2.3 FUNGOS BASIDIOMICETOS	32
2.3.1 O fungo <i>Macrocybe titans</i>	35
2.3.2 Enzimas produzidas por fungos basidiomicetos	37
2.3.3 Uso de enzimas na modificação do amido	38
2.3.3.1 Amilases	40
2.3.3.1.1 α-amilase	42
2.3.3.1.2 Glucoamilase	44
2.4 FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO (FES)	46
2.5 SUPLEMENTOS PARA O CRESCIMENTO DE FUNGOS	48
2.5.1 Farelo de Soja	48
2.5.2 Farelo de Arroz	49
2.5.3 Farelo de Trigo	50
2.5.4 Bagaço de Mandioca	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 ENSAIOS REALIZADOS	53

3.2 MICRORGANISMO UTILIZADO E SUA CONSERVAÇÃO	54
3.3 COMPOSIÇÃO DO MEIO SÓLIDO	55
3.4 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	60
3.4.1 Produção do inóculo, matriz secundária	60
3.4.2 ENSAIO I - Estudo do crescimento micelial axial em FES	61
3.4.2.1 Cálculo da velocidade média do crescimento micelial	65
3.4.2.2 Cálculo do crescimento micelial total	66
3.4.2.3 Determinação do pH em meio sólido	66
3.4.2.4 Determinação da A.a. (Atividade de água)	66
3.4.2.5 Determinação da umidade do meio sólido	67
3.4.2.6. Determinação de cinzas	67
3.4.3 ENSAIO II – Determinação das atividades enzimáticas	68
3.4.3.1 Procedimento para coleta de amostras	68
3.4.3.2 Extração das enzimas do meio sólido	69
3.4.3.2.1 Atividade de α-amilase	69
3.4.3.2.2 Atividade de Glucoamilase	71
3.4.3.2.3 Produtividade máxima	73
3.4.3.3 Extração das proteínas do meio sólido	74
3.4.3.3.1 Determinações de proteínas totais	74
3.4.3.4 Cálculo da atividade específica	76
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78

4.1 <u>ENSAIO I</u> : EFEITO DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DO SUPLEMENTO E DO RESÍDUO NO CRESCIMENTO MICELIAL AXIAL DE <i>Macrocybe titans</i> BEM COMO NA PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE	78
4.1.1 Análise do crescimento micelial axial de <i>Macrocybe titans</i>	78
4.1.2 Análise de parâmetros físico-químicos durante o crescimento micelial axial	88
4.2 <u>ENSAIO II</u> – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE EM SUBSTRATO A BASE DE BAGAÇO DE MALTE	99
5 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE	119

1 INTRODUÇÃO

As condições do ambiente vem mobilizando vários segmentos da sociedade (ONGs, escolas, setores econômicos, etc.) órgãos governamentais e setores da indústria que estão se organizando cada vez mais para aplicar políticas ambientais que diminuam os impactos negativos à natureza. Um dos fatores dessa iniciativa se deve ao fato de que processos industriais produzem resíduos que necessitam de destino adequado, pois além de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Das diversas tecnologias empregadas para reduzir ou minimizar os resíduos industriais, a utilização de processos biológicos têm sido uma das alternativas. Estes processos estão representados pela biotecnologia que é o conjunto de conhecimentos que permite a utilização de agentes biológicos (organismos, células, organelas, moléculas) para obter bens ou assegurar serviços. A biotecnologia abrange diferentes áreas do conhecimento que incluem a ciência básica (Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia celular, Genética, Genômica, Embriologia etc.), a ciência aplicada (Técnicas imunológicas, químicas e bioquímicas) e outras tecnologias (Informática, Robótica e Controle de processos) (INSTITUTO DE TECNOLOGIA ORT, 2008).

Um dos tipos mais abrangentes de resíduo é o de natureza sólida proveniente das transformações de matérias-primas utilizadas em processos agroindustriais. Nos últimos anos, por meio da biotecnologia através da Fermentação em Estado Sólido (FES), tem se intensificado o aproveitamento destes resíduos para diversas aplicações econômicas. Uma das mais antigas formas de utilização comercial dos resíduos agroindustriais por meio da FES é a produção de fungos comestíveis e medicinais na China e no Japão (VIEIRA *et. al.*, 2008). No Brasil, este sistema já está muito bem estabelecido, existindo grandes empresas, especialmente na região sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e na região sul (Paraná) (TAVARES, 2008).

Produtos da FES obtidos em sistemas mais sofisticados empregando reatores biológicos foram desenvolvidos gerando produtos de grande valor agregado dentro do setor da química, tais como enzimas de aplicação industrial (PALMA, 2003), ácidos orgânicos e aminoácidos (PANDEY *et al.*, 2000). No entanto, a FES comparativamente aos processos denominados submersos, ainda apresenta proporções muito mais acadêmicas do que

industriais e seu processo está praticamente limitado ao uso de fungos como agentes das reações, dada as condições de processo (BITTENCOURT E TAVARES, 2007).

Na FES, as enzimas se destacam como um dos produtos mais estudados dada a facilidade com que os fungos expressam estes compostos durante seu crescimento nos resíduos sólidos. Das várias enzimas produzidas pela FES, as amilases são mencionadas pela sua importância na hidrólise do amido (LAIDLER, 1954 APUD SPIER, 2005) liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicoses (GUPTA et al., 2003 e PANDEY et al., 2005). Ainda de acordo com Gupta et al. (2003) e Pandey *et. al.* (2005), estas enzimas apresentam grande importância na biotecnologia com aplicações nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel.

Dos fungos empregados em FES, os basidiomicetos, a cada ano, estão sendo mais utilizados na produção de enzimas, tais como a lacase, manganês peroxidase, tirosinase e lignina (FARIA, 2008; BRUM, 2005) E desta classe de fungos a espécie *Lentinula edodes* (TONINI, 2004, FARIA, 2008) e o *Agaricus blazei* (BRUM, 2005) são muito citados na literatura, ao lado de outros.

Esta classe de fungos mostra uma infinidade de espécies ainda não estudadas ou pouco pesquisadas. Exemplo disso é o fungo *Macrocybe titans*, gênero encontrado no Brasil a cerca de 8 anos no estado do Paraná (Saika, 2008) e que poucos registros são encontrados, especialmente no Brasil.

A potencialidade deste fungo como produtor de enzimas ainda não encontra registros na literatura. Características fisiológicas, condições de cultivo vegetativo em FES, potencial biotecnológico, ainda não estão documentadas.

Estudos iniciais sobre o fungo *M. titans* indicam que o mesmo é isento de algumas toxinas clássicas (STIJVE *et. al.*, 2004). Por se tratar de um fungo recentemente descoberto, estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de verificar se o fungo tem propriedades medicinais (SAIKA, 2008; GUEDES, *et. al.*, 2008), nutritivas (RIGONI *et. al.*, 2008), além de estudos sobre sua forma de cultivo axênico (DEPCKE, 2008). Entre os vários estudos, o presente trabalho busca conhecer um pouco do perfil enzimático de *M. titans* com ênfase nas enzimas amilolíticas, α -amilase e glucoamilase, em substratos contendo resíduos de dois processos produtivos muito praticados na região do Vale do Itajaí.

Um dos processos é o da produção de palmito em conserva extraído da palmeira-real-da-austrália, cujos resíduos sólidos são objeto de pesquisa há vários anos pelo grupo do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) e de Processamento de Alimentos (LAPRA) da

FURB (TONINI, 2004; ISRAEL, 2005; SANTOS *et. al.*, 2005; LIEBL *et. al.*, 2005; VIEIRA *et. al.*, 2008; COSTA *et. al.*, 2009).

Em Santa Catarina encontra-se a maior área de plantio desta palmeira, o que tem despertado a atenção dos pesquisadores catarinenses. No entanto, segundo a Organização de Apoio ao Desenvolvimento dos Municípios (2007) o interesse pelo plantio da palmeira-real-da-austrália como produtora de palmito só começou a partir de 1990, quando a exploração predatória da palmeira Juçara na região Sul e Sudeste e do Açaí no norte do Brasil, tinha alcançado o máximo e as reservas de palmito nativo já estavam bastante devastadas. Até então, a palmeira-real-da-austrália era utilizada apenas como planta ornamental. Essa palmeira tem sido considerada como potencial para exploração racional de palmito, devido, principalmente, às suas características de precocidade, rusticidade e qualidade do palmito.

Para o processamento do palmito desta palmeira, folhas, caule e bainhas externas são descartadas na área de plantio produzindo toneladas de resíduos (TAVARES, 2008). Considerando o material que segue para a industrialização, na produção de cada vidro de conserva de palmito são gerados mais de três vezes a sua massa em resíduos, apenas de bainhas medianas (OLIVEIRA E TAVARES, 2005). Segundo Lima e Marcondes (2002), somente o resíduo gerado na indústria produz muitas toneladas em termos de bainhas medianas, material que, até o momento, é descartado do processo industrial. Essa bainha, de acordo com Tonini (2004), é a camada usada para proteger o palmito no transporte até a industrialização.

Outro resíduo agroindustrial que tem merecido atenção do grupo de pesquisadores do LEB é aquele proveniente da produção da cerveja e do chopp. A cerveja é uma bebida de amplo consumo nacional, com perspectivas de crescimento para os próximos anos. De acordo com o Jornal on-line Comtexto de Londrina no Paraná (2007), o Brasil é o 5º maior produtor de cervejas no mundo. Um dos fatores que contribui para isto, é a expectativa favorável da economia brasileira com a recuperação do poder de compra da população de baixa renda.

A região de Blumenau destaca-se no cenário catarinense como o local de maior incidência de indústrias de cerveja (COPEB, 2007). Em Santa Catarina, grandes indústrias também estão estabelecidas, contribuindo ainda mais para a geração de resíduos agroindustriais.

O bagaço de malte, resíduo proveniente da filtração do mosto (mistura do malte com água) na etapa do processo cervejeiro (SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS, 2005), é composto principalmente pela casca da cevada e apresenta em sua

composição hemicelulose, lignina e celulose, além de proteínas, extrativos e cinzas, em menores proporções (MUSSATTO, VAZ E ROBERTO, 2005).

Tanto o resíduo do processamento do palmito como o da produção de cerveja são constituídos por material lignocelulósico, e, a aplicação direta de materiais desta natureza no solo pode apresentar algumas desvantagens como fitotoxicidade, imobilização de nutrientes, como o nitrogênio, e concentração de sais desequilibrada (MAIA, 2003).

Assim, este trabalho pretende contribuir para o conhecimento de processos que utilizem resíduos sólidos provenientes do processamento da palmeira-real-da-austrália e da produção de cerveja e com isso promover, além da redução do impacto ambiental causado pelos resíduos, a geração de substâncias de interesse comercial. No presente trabalho teve-se como objetivo geral avaliar a produção das enzimas α -amilase e glucoamilase pelo fungo *Macrocybe titans* cultivado nos resíduos acima mencionados e suplementados com farelo de trigo, farelo de arroz e farelo de soja

Para que esse objetivo fosse alcançado, foi necessário, primeiramente, utilizar os resíduos de cervejaria e do processamento da palmeira-real-da-austrália, juntamente com os diferentes suplementos citados, como suporte alternativo e técnica do aproveitamento desses resíduos no processo de fermentação no estado sólido, visando avaliar o crescimento micelial axial do fungo *Macrocybe titans* para selecionar o melhor tipo e concentração dos substratos para posterior estudo da produção de α -amilase e glucoamilase. Por último, procurou-se determinar a atividade enzimática, em escala temporal, em meios sólidos contendo o melhor tipo e concentração dos substratos selecionados.

As estratégias empregadas na produção das enzimas α -amilase e glucoamilase pelo fungo *M. titans*, também permitiram o conhecimento de algumas características fisiológicas deste fungo que serão importantes para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como base teórica para um melhor entendimento do tema proposto e seus objetivos, a seguir, apresenta-se uma contextualização enfocando os diversos tópicos relevantes em relação ao setor agroindustrial e a geração de resíduos e o cultivo de fungos bem como a produção de enzimas por eles.

2.1 SETOR AGROINDUSTRIAL E A GERAÇÃO DE RESÍDUOS

O termo agroindústria, de acordo com Parré, Alves e Pereira (2002), tem sido definido de diversas maneiras, ou seja, compreendendo diferentes ramos industriais, o que acaba por gerar diversos graus de abrangência para o conceito. Segundo Hoffmann *et. al.* (1985), citado por Parré, Alves e Pereira (2002) para ser caracterizado como agroindústria, o estabelecimento comercial deve evidentemente utilizar matéria-prima de origem agrícola.

Para Lauschner (1995) o termo agroindústria é definido de dois modos:

- em sentido amplo, é “a unidade produtiva que transforma o produto agropecuário natural ou manufaturado para a sua utilização intermediária ou final”;

- em sentido restrito, é “a unidade produtiva que transforma para a utilização intermediária ou final o produto agropecuário e seus subprodutos não manufaturados, com aquisição direta do produtor rural de um mínimo de 25% do valor total dos insumos utilizados”.

Para Dalsenter (2000, p. 27), “agroindústrias são aquelas unidades fabris cuja atividade econômica consiste em transformar os produtos agrícolas em produtos de interesse comercial ou industrial”.

Segundo o IBGE (2008), no primeiro semestre de 2008 a agroindústria brasileira cresceu 4,2%, ritmo próximo ao registrado no mesmo período de 2007 (4,8%) e abaixo do assinalado pela média da indústria nacional (6,3%). Em bases trimestrais, a agroindústria apresentou resultados positivos nos dois primeiros períodos de 2008. Após crescer 6,1% no primeiro trimestre, o setor desacelerou no segundo (2,8%), por conta da redução do ritmo de crescimento da agricultura, que passou de 6,9% para 0,8%.

Ainda de acordo com o IBGE (2008), o bom resultado da agricultura foi influenciado positivamente pelas condições climáticas favoráveis e pelo aumento do uso de defensivos, adubos e fertilizantes, que contribuíram para o aumento da produtividade. O Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) estima para 2008, safra recorde de 143,6 milhões de toneladas de grãos, resultado 7,9% superior ao de 2007 (133,1 milhões de toneladas), com destaque para a produção de soja, milho e arroz, que representam cerca de 90% da safra.

Em resumo, o bom desempenho da agroindústria no primeiro semestre de 2008 (4,2%) está relacionado ao crescimento da safra, ao aumento do consumo do mercado interno, por conta da expansão da renda, e a um cenário externo favorável para a agricultura, com crescimento do volume exportado e dos preços.

Sabendo que as condições climáticas das diferentes regiões do Brasil proporcionam o plantio de várias culturas como o milho, arroz, feijão, soja, café, mandioca, trigo, frutas, algodão, cana-de-açúcar, óleos, entre outros, constituindo em um mercado de agronegócios que, segundo o site IT Mídia (2004) voltado para a comunicação de vários segmentos de negócios, inclusive, os agronegócios, a agroindústria movimentou cerca de R\$ 356,44 bilhões participando com 27% do PIB, contribuindo, desta forma, com 41% da exportação (SILVA, 2006).

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUTENBERT *et. al.*, 2003, APUD PINTO *et. al.*, 2005). O uso desses resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO *et. al.*, 2007).

Diante disso, é possível considerar que com o aumento e um bom desempenho das atividades agroindustriais, conseqüentemente, tem-se um aumento da geração de resíduos provenientes dessas atividades.

A princípio, o setor agroindustrial, não era reconhecido pela sociedade como um setor que afeta o meio ambiente. Isso ocorria devido ao fato da sociedade valorizar mais a contribuição da atividade agroindustrial na produção de alimentos, sem levar em consideração

os subprodutos poluidores por ela gerados, que são depositados no meio ambiente (MOMM, 2002).

Resíduo, segundo Ferreira (1986), citado por Farias e Fontes (2003) é “aquilo que resta de qualquer substância, resto”, ou ainda, “o restante daquilo que sofreu alteração de qualquer agente exterior, por processos mecânicos, físicos, químicos, etc.” ou ainda, para Evangelista (1992), “o sobranço da matéria-prima não aproveitada para a elaboração do produto alimentício e como subproduto, esse mesmo sobranço transformado industrialmente”.

Na indústria de alimentos, são conhecidos como “resíduos”, a parte da matéria-prima não utilizada no processamento do produto principal. Esse tipo de indústria produz uma série de resíduos com alto valor de (re) utilizações, que podem ser trabalhados com projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. Inúmeros estudos utilizando resíduos industriais do processamento de alimentos têm sido realizados com objetivo de aproveitamento destes. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos produtos do mercado (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional (ISRAEL, 2005).

Diversas áreas vêm desenvolvendo estudos para o aproveitamento desses resíduos visando minimizar impactos ambientais e através dos mesmos, obter uma das seguintes produções: alimentar, biomateriais, biomoléculas, bioenergia, combustíveis, calor e eletricidade, [...] e de acordo com Alexandrino *et. al.* (2007) vários desses bioprocessos têm sido desenvolvidos também utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos.

Alexandrino *et. al.* (2007), cita que o uso de resíduos agrícolas, que são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica, como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza.

De acordo com Israel (2005) a utilização de material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica.

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, representando 50% da biomassa terrestre (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004). O termo estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular, constituída por uma matriz dura e fibrosa, onde fibras flexíveis, celulose, hemicelulose e, também, pectina, estão embebidas em uma matriz de lignina, uma macromolécula tridimensional de natureza aromática.

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a lignina e a hemicelulose. O teor de nitrogênio é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes celulose, lignina e hemicelulose, assim como do teor de nitrogênio, depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (RAJARATHNAM *et. al.*, 1992).

A hemicelulose e a celulose, segundo Silva *et. al.* (2005), representam mais de 50% do peso seco de resíduos agrícolas. Esses podem ser convertidos em açúcares solúveis pela hidrólise enzimática, podendo com isso, serem usados como fonte abundante e barata de energia renovável no mundo.

A celulose é uma substância microfibrilar, composta por moléculas de β -1,4-glucano, com regiões cristalinas e amorfas, sendo a maior parte da celulose natural impura, devendo sujeitar-se a um processo de purificação (PUTZKE E PUTZKE, 1998). Segundo Rajarathnam, *et. al.*, 1992, a celulose constitui o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando entre 30 a 60% do seu peso seco total. Como polímero de D-glucose de elevada massa molar, ela é o principal componente das paredes celulares responsáveis pela sustentação vegetal, possuindo uma estrutura cristalina altamente resistente.

As hemiceluloses são compostas por misturas complexas de polissacarídeos com vários monômeros de açúcares diferentes, tais como glucose, galactose, manose, arabinose, xilose e ácido glucurônico. Pelo menos dois desses entram em sua composição. A molécula pode ser simples ou ramificada e ela é comumente acetilada (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

A lignina é composta por polímeros ramificados de monômeros derivados do álcool cinamil, sendo o polímero orgânico aromático natural mais abundante nas plantas vasculares, vindo depois da celulose, como fonte de carbono mais disponível no planeta. Encontra-se impregnada na madeira e em gramíneas, atuando como protetora do ataque de enzimas degradadoras de polissacarídeos. Dessa forma, se a lignina não for gradualmente degradada, não há condições de degradar-se madeira com eficiência (PUTZKE E PUTZKE, 1998). A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% do seu peso seco. Juntamente com a

hemicelulose, envolve as fibras celulósicas, desempenhando as funções de cimentante e preservadora (PAULI, 1997 APUD ISRAEL, 2005).

Com isso, a escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido leva em consideração uma série de fatores, principalmente, relacionados ao custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais (ALEXANDRINO *et. al.*, 2007).

Diante de tudo isso destaca-se que esses resíduos têm um grande potencial que não pode ser subestimado, exigindo que esses materiais tenham um aproveitamento mais racional.

2.1.1 Resíduos do processamento da palmeira-real-da-austrália (*Archontophoenix alexandrae*)

O gênero *Archontophoenix* compreende as espécies de palmeiras originárias do leste da Austrália. No Brasil é comumente chamada de palmeira-real-da-austrália e é tradicionalmente utilizada na arborização de praças e jardins. Existem seis espécies de palmeira-real-da-austrália, entretanto as de maior interesse para a extração do palmito são a *Archontophoenix alexandrae* e a *Archontophoenix cunninghamiana* (ADENESKY FILHO, 2007).

Por se tratar de uma planta exótica, a palmeira-real-da-austrália tem um forte apelo ecológico, pois pode diminuir a pressão sobre a extração das espécies nativas de palmito, como é o caso do palmito juçara (*Euterpe edulis*) (VIEIRA, 2006).

A palmeira *Archontophoenix alexandrae*, de nome popular palmeira-real, é uma palmeira rústica e adaptada às condições do sul e sudeste do Brasil, cultivada a pleno sol, porém também tolerando a meia-sombra. É exigente em água, podendo até se desenvolver em solos com pouca drenagem. Apresenta rápido crescimento, chegando a atingir até 1m por ano, e é tolerante ao frio subtropical. Sua origem é a Austrália, na floresta costeira da parte norte e central de Queensland, sendo que, nos últimos anos, essa palmeira vem sendo cultivada no sul do Brasil para produção de palmito (LORENZI *et al.*, 2004; VALLILO *et al.*, 2004).

O palmito é um alimento obtido da extremidade apical do estipe ou tronco de certas palmeiras, composto por folhas em formação (RAMOS; HECK, 2002). É encontrado nas pontas das palmeiras, onde se formam as folhas, sendo constituído por três camadas: bainhas externas, bainhas medianas e o coração do palmito. A camada externa que envolve o palmito é fibrosa, de cor esverdeada ou marrom e não é utilizada na industrialização do palmito,

representa de 25% a 35% do seu peso seco, dependendo da espécie de palmito. A segunda camada, de cor mais clara e que representa de 25% a 30%, são as bainhas medianas (Figura 2.1), que também não são utilizadas na industrialização do palmito. Por fim, tem-se o miolo, também denominado coração do palmito, que contém baixo teor de fibras. Desta parte é que se produz o palmito em conserva (TONINI, 2004).

A palmeira-real-da-austrália possui um potencial grande para produção de palmito de qualidade e atestam a viabilidade de seu cultivo em nosso meio (BOVI, 1998). Seu palmito é do tipo nobre, com padrão de qualidade e sabor ainda superior ao das palmeiras do gênero *Euterpe*, embora também apresente rápido escurecimento após o corte. A colheita de palmito, nas espécies do gênero *Archontophoenix*, é feita em plantas com idade a partir de 30 meses de campo, desde que cultivadas em regiões aptas e com adubação apropriada (BOVI, 2006).

O processo de extração do palmito das florestas manejadas se dá pelo corte total da palmeira, onde somente a bainha interna presente no estipe é utilizada para a comercialização do palmito o que significa apenas ± 1 m de uma palmeira de aproximadamente 15 m de altura. As folhas, o caule e as bainhas externas são descartadas nas florestas manejadas e as bainhas medianas são descartadas na indústria alimentícia (TONINI, 2004).

A altura da palmeira-real-da-austrália é de 2 a 3 metros para o corte, e no processamento do palmito são produzidas toneladas de resíduos. Considerando o material que segue para a industrialização, na produção de cada vidro de conserva de palmito são gerados mais de três vezes a sua massa em resíduos de bainhas medianas (OLIVEIRA E TAVARES, 2005).



Figura 2.1.: Bainhas medianas descartadas no meio ambiente
Fonte: A autora

A Figura 2.2, apresenta alguns processos e produtos desenvolvidos nestes estudos.

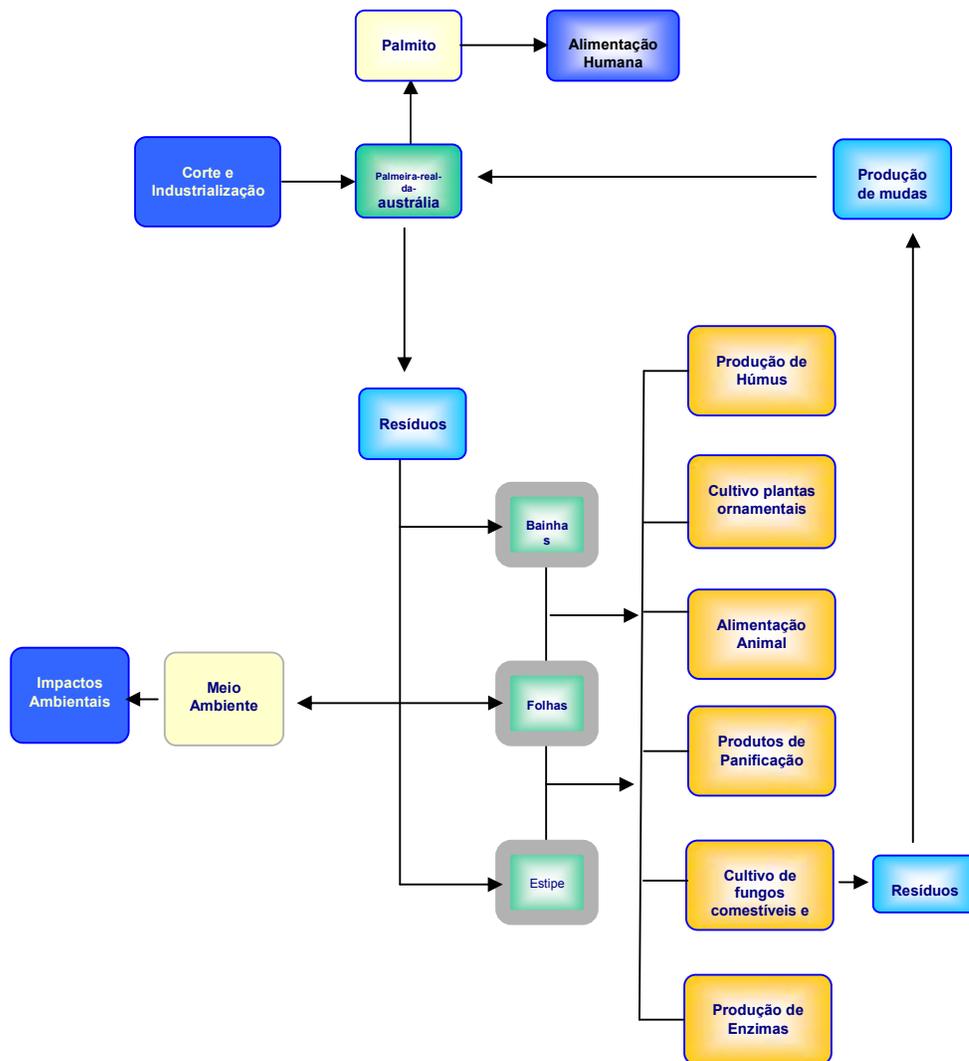


Figura 2.2.: Possibilidades de aproveitamento dos resíduos oriundos do processamento da palmeira-real-da-austrália

Fonte: Modificado de Wisniewski e Borderes, 2007.

2.1.2 O processo cervejeiro e seus resíduos

O Brasil hoje é o 5º maior produtor de cervejas no mundo, ficando atrás somente da China, Estados Unidos, Rússia e Alemanha. O consumo do brasileiro atingiu a marca de 51,9

litros/per capita no ano de 2006. Os dados são do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (Sindicerv). Com uma produção de 9,7 bilhões de litros, o mercado nacional cresceu 7,5% no período de 2005 a 2006. Em apenas um ano, o percentual foi maior que os 5,9% entre os anos de 1995 e 2004. O aumento na produção se deve ao fato de o brasileiro consumir cada vez mais cerveja, já que o consumo é que determina o aumento da produção (JORNAL ON-LINE COMTEXTO DE LONDRINA NO PARANÁ, 2007).

No processo tradicional de produção de cerveja, que prevalece até os dias de hoje, a cevada é, inicialmente, germinada para originar o malte. Neste estágio, são produzidas amilases e peptidases no grão que atuam nos polissacarídeos e proteínas, com produção de açúcares e aminoácidos que serão utilizados pela levedura no processo fermentativo subsequente (DEKKER, 1989 APUD COURI, 2008).

A cevada é uma gramínea utilizada há milhares de anos pelo homem, sendo bastante utilizada como fonte de energia na nutrição de ruminantes em países produtores desse cereal. O Brasil é um grande importador desse grão para utilização nas indústrias cervejeiras. O resíduo de cervejaria pode se apresentar na forma de resíduo úmido, resíduo prensado, resíduo seco e levedura de cerveja (SOUZA, 2004).

Contudo, deve-se considerar a necessidade de um gerenciamento adequado dos resíduos provenientes desse processo cervejeiro.

Sendo resíduo obtido da produção de cerveja, onde o malte é moído em mistura com o milho e o arroz ou outros cereais equivalentes, sendo então cozidos e posteriormente separados em frações sólidas e líquidas; a parte líquida (mosto) é fermentada para a produção de cerveja e a parte sólida denomina-se resíduo úmido de cervejaria (RUC); o RUC é obtido através da secagem automática, reduzindo o teor de umidade em torno de 1 a 2^{1/2} %; o produto RUC desidratado com 2^{1/2} % de umidade, passa a ser denominado de resíduo seco de cerveja (RSC), o qual ao ser processado adequadamente resulta na farinha de resíduo seco de cervejaria; denominado produto resultante (farinha de resíduo de cervejaria) é valorizada como fibra dietética na produção de cereais matinais, na produção de produtos de panificação e confeitaria, na produção de produtos cárneos, na produção de produtos embutidos (salsichas) e bebidas nutricionais (THAME, *et. al.*, 2001).

No processo cervejeiro, os resíduos sólidos são gerados principalmente nas etapas de filtragem, envase e tratamento de água e efluentes líquidos. Os principais resíduos gerados, segundo o Serviço Brasileiro de Respostas técnicas (2005) são:

- “grãos usados”: principal tipo de resíduo, em relação à quantidade gerada. São aqueles resíduos oriundos do aproveitamento do conteúdo dos grãos de malte, constituídos de restos

de casca e polpa dos grãos, misturados, em suspensão ou dissolvidos no mosto. Embora de origem semelhante, dependendo da etapa onde são retirados do mosto possuem características físicas e composição distintas, e, portanto são separados em três tipos:

- 1- bagaço de malte: resíduo gerado na filtração do mosto após a caldeira de mistura, antes da fervura;
- 2- trub grosso: resíduo tirado do whirlpool, na primeira filtração após o cozimento, composto de gordura vegetal e proteínas coaguladas;
- 3- trub fino: resíduo obtido na segunda filtração, composto de gordura vegetal, que sai misturado à terra diatomácea e parcelas de levedo.

Tanto o trub fino como o grosso possuem excelentes características nutricionais, assim como o bagaço de malte, e por esta razão são usados na fabricação de ração animal. Em alguns casos, estes são misturados ao bagaço de malte, e em algumas plantas até se utiliza deste trub no preparo de novas bateladas de mosto.

- excesso de levedura: durante o processo de fermentação as leveduras se reproduzem, obtendo-se ao final do processo mais levedo do que se utilizará na próxima batelada. Como já citado, parte desta levedura é utilizada no preparo de nova batelada, e parte é vendida para a indústria alimentícia.
- resíduos do envase: durante a etapa de envase existem dois tipos de resíduos gerados: pasta celulósica: composta dos rótulos removidos na lavagem das garrafas retornáveis é vendida a empresas de reciclagem de papel; garrafas quebradas, latas e tampas metálicas amassadas, plástico e papelão originários de embalagens;
- terra Diatomácea: usada na clarificação. É retirada e passa por um processo de secagem sendo posteriormente destinada para aterros como material inerte.
- lodo: tanto na Estação de Tratamento de Águas (ETA) como na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), geram-se quantidades consideráveis de lodo, que deve ser corretamente gerenciado como resíduo.

Devido à sua longa história, a produção de cervejas é considerada como um exemplo típico de biotecnologia tradicional.

Em resumo, e apesar de existirem variações na forma de elaboração dependendo do tipo de cerveja a ser produzida, o processo completo consiste basicamente em quatro etapas: 1) malteação (germinação da cevada); 2) produção do mosto cervejeiro (extração e hidrólise dos componentes da cevada malteada seguido de uma separação dos componentes insolúveis e posterior fervura com a adição de lúpulo); 3) fermentação (dividida em fermentação primária e maturação); e 4) processamento final (filtração, estabilização, engarrafamento,

etc.). A etapa mais lenta do processo é a fermentação, na qual as células livres em suspensão fermentam o mosto em reatores operados de forma descontínua, sem agitação.

O bagaço de malte, constituído basicamente pelas cascas da cevada malteada, é o principal subproduto da indústria cervejeira e se encontra disponível o ano todo, em grandes quantidades e a um baixo custo (MUSSATTO, DRAGONE E ROBERTO, 2006).

Este material é composto principalmente pela casca da cevada e apresenta em sua composição 28,4% hemicelulose, 27,8% lignina e 16,8% celulose, além de proteínas, extrativos e cinzas, em menores proporções (MUSSATTO, VAZ E ROBERTO, 2005).

Esse resíduo é considerado como o mais importante subproduto da indústria cervejeira, pois representa cerca de 85% dos subprodutos obtidos neste processo (REINOLD, 1997, APUD MUSSATO, VAZ E ROBERTO, 2004). Somente no Brasil, estima-se que a geração anual média de bagaço de malte é de 1,7 milhões de toneladas. Apesar de ser produzido em grandes quantidades durante todo o ano, este material tem sido muito pouco aproveitado, sendo sua principal aplicação como ração para animais (MUSSATO, VAZ E ROBERTO, 2004).

No entanto, devido ao bagaço de malte ser um material rico em proteínas e fibras (MUSSATO, VAZ E ROBERTO, 2004) o desenvolvimento de novas técnicas para aproveitamento deste subproduto agro-industrial é de grande interesse. A utilização do bagaço de malte em processos de bioconversão tem sido muito pouco explorada até agora.

A Figura 2.3 apresenta um fluxograma das principais etapas do processo cervejeiro, com suas respectivas entradas (matérias-primas, insumos) e saídas (resíduos gerados).

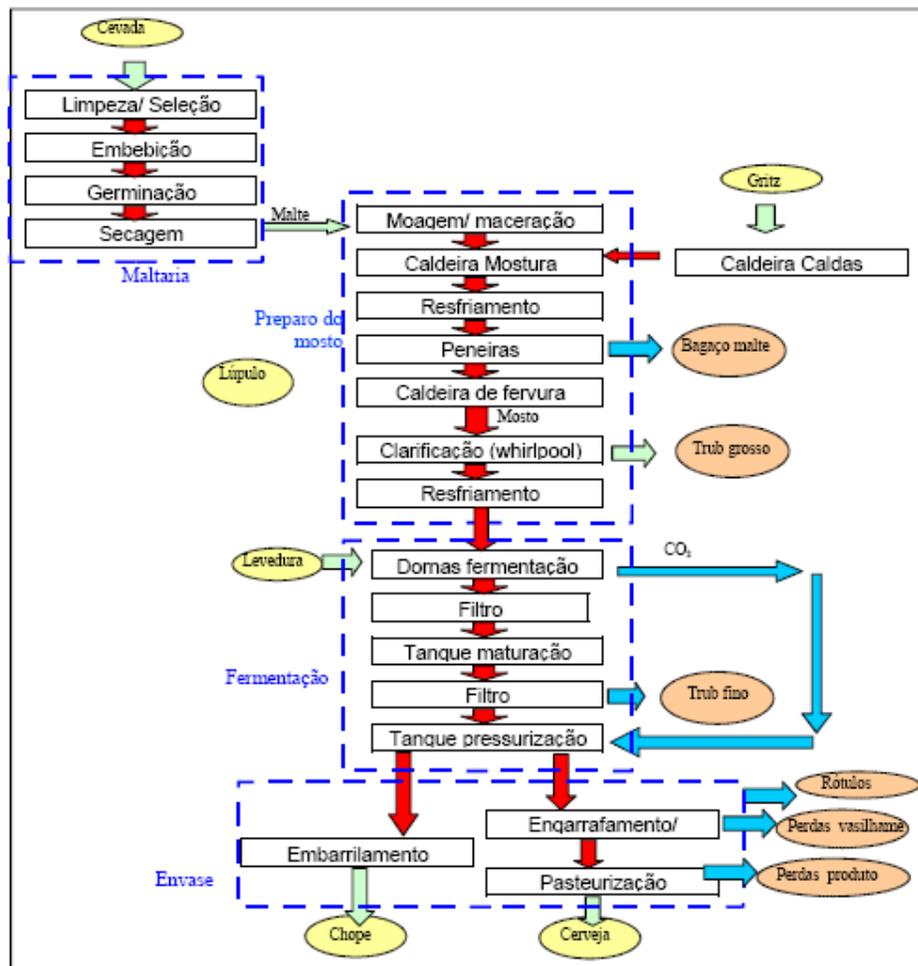


Figura 2.3.: Etapas do processo cervejeiro – entrada de matéria prima (cevada) e saída de produtos (cerveja e chopp), bem como resíduos gerados durante esse processo
Fonte: SANTOS (2005)

2.3 FUNGOS BASIDIOMICETOS

Os fungos são considerados biodegradadores naturais, pois encontram as substâncias necessárias ao seu desenvolvimento na natureza, principalmente como macromoléculas insolúveis, as quais precisam degradar primeiramente em unidades monoméricas solúveis antes de as incorporarem. Os fungos, dependendo de sua dieta, necessitam de diferentes nutrientes: os macronutrientes (exigidos em quantidades por volta de 10^{-3} mol/L) e os micronutrientes (requeridos em quantidades por volta de 10^{-6} mol/L ou menos). Os macronutrientes são: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio, dos quais o primeiro é o mais exigido, por ser um elemento estrutural, associado ao

hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Entre os micronutrientes são citados o ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio, entre outros (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

O carbono é um dos componentes estruturais dos fungos, sendo o mais amplamente utilizado. A glucose é a fonte de carbono mais amplamente utilizada [...]. Na natureza, a glucose é o açúcar mais comum, em função de sua participação na composição da celulose, do amido e de outros açúcares, justificando o seu amplo emprego. O nitrogênio é encontrado no solo, em maior quantidade na forma de nitrato, sendo amplamente utilizável por fungos [...]. Esse macroelemento é utilizado na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

Na Figura 2.4 apresentam-se as principais rotas metabólicas proporcionados pelos fungos, entre eles, a produção de enzimas de interesse comercial, objeto desse estudo.



Figura 2.4.: Principais rotas metabólicas proporcionados pelos fungos
Fonte: PUTZKE E PUTZKE, 2002

Os fungos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e sobre praticamente todos os substratos, desde que haja disponibilidade de nutrientes para os mesmos.

Esses microrganismos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico; pela produção de fármacos, como alguns antibióticos, pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulasas, lacases, xilanasas, pectinases e amilases [...] (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004).

Os fungos constituem um grupo de seres vivos com grande variedade de formas, cores e tamanhos. Segundo Bononi (1995) os cogumelos comestíveis fazem parte de dois grandes grupos: - Ascomicetos, como por exemplo, as trufas subterrâneas, a *Morchella* (cogumelo utilizado como aromático), a *Peziza* e outros. Não são cultivados no Brasil; e - Basidiomicetos, como, por exemplo, o champignon (*Agaricus*), o *Pleurotus*, as orelhas-de-pau, o shiitake (*Lentinula edodes*) etc.

No grupo dos Basidiomicetos, a maioria das espécies forma uma estrutura macroscópica, com hifas modificadas que originam pseudotecidos e estruturas de reprodução características: os basídios, esses, são especializados na formação de esporos exógenos, isto é, externos à estrutura. Os esporos são, por isto, denominados de basidiósporos, sendo geralmente formados nos ápices de prolongamentos denominados esterigmas (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

O micélio consiste de hifas septadas, bem desenvolvidas, microscópicas, mas que podem ser facilmente observadas quando formam a massa micelial. A cor pode variar do branco ao amarelado ou laranja, havendo casos de cores mais escuras, inclusive marrom e preto. Certas espécies formam agrupamentos de hifas mais ou menos paralelas, originando cordões de micélio, melhor conhecidos como rizomorfas (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

O basídio é uma das estruturas mais importantes para a organização sistemática dos grandes grupos, pois apresenta algumas características marcantes que permitem reunir grupos por afinidades ao nível desta estrutura. Assim, podemos separar os Basidiomycota em dois grandes grupos, dependendo se formam basídios em basidiocarpos ou se formam basídios a partir de um esporo de resistência e, ainda, se formam basídios septados ou inteiros (não septados) (PUTZKE E PUTZKE, 1998).

Certas espécies são utilizadas como fonte de proteínas e outras espécies são cultivadas comercialmente. Outras ainda são comestíveis, ou produtoras de substâncias antibióticas. Atualmente, algumas espécies vêm sendo utilizadas no clareamento de efluentes industriais (indústria têxtil e de celulose) ou ainda, na biorremediação (LOGUERCIO-LEITE, 2004),

2.3.1 O fungo *Macrocybe titans*

Maior cogumelo já visto no estado do Paraná, *Macrocybe titans* foi encontrado em outubro de 2003 no município de Antonina, em um local próximo à comunidade do Lageado, área vizinha à Reserva Natural da Cachoeira, mantida pela SPVS (Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental). A descoberta foi do pesquisador André de Meijer, e trata-se do primeiro registro brasileiro de *M. titans*, uma espécie dos trópicos da América, originalmente descrita na Flórida (EUA). Este cogumelo pode pesar até cerca de dois quilos (Figura 2.5), com píleo de 30 cm de diâmetro, estipe de até 40 cm de comprimento e 10 cm de espessura (BOLETIM INFORMATIVO, 2003).



Figura 2.5: *Macrocybe titans* no ambiente natural
Fonte: Amélia Now On Line (2001)

Uma colônia de macrofungos identificada como sendo *M. titans* também foi encontrada na empresa Kanebo Silk Ltda do Brasil, em Cornélio Procópio (PR), em solo com matéria orgânica em decomposição (SAIKA, 2008). Há um registro desse fungo no estado de Chiapas, no extremo sul do México, onde o cogumelo foi encontrado em uma plantação de café, pesando mais de 20 kg com uma altura de 70 cm. Outros registros mencionam a Costa Rica e Guatemala. Por ora não existem estudos de que a espécie seja comestível ou nociva (ANDRADE, 2007), apenas relatos de consumo deste fungo.

O gênero *Macrocybe* engloba diversas espécies como *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* e o *M. titans* (PEGLER, LODGE, NAKASONE, 1998) e é considerado pantropical, sendo o *M. titans* uma espécie neotropical.

Estudos iniciais descrevem que em termos de composição química, *M. titans* é isento de toxinas clássicas como muscarina, amatoxina e orelinas, tampouco ácido cianídrico foi detectado. Apresenta Fe, Mg, Mn, Se, Cu e diversas vitaminas como as do grupo B e a lipossolúvel D, enquanto que Hg, Pb e Cd estão presentes em pequenas quantidades (STIJVE *et. al.*, 2004).

M. titans ainda não é cultivado para consumo humano, entretanto foi verificado que a tribo indígena Hotĩ que habita a Serra de Maigualida na Amazônia venezuelana consome quase 30 espécies de cogumelos para diversos fins, sendo *M. titans* um deles (ZENT, ZENT, ITURRIAGA, 2004). Com isso, esse cogumelo tem chamado a atenção para seu potencial de alimento. Uma análise química foi realizada para determinar suas estruturas de carboidratos (CARBONERO *et. al.*, 2006).

Um estudo realizado por Saika (2008), que determinou o perfil químico e bioquímico do *M. titans*, estudando a cepa do fungo encontrado na empresa Kanebo Silk Ltda em Cornélio Procópio, identificou que a espécie apresenta fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose, sendo que, entre estes monossacarídeos, se destacaram principalmente, pela abundância, a glucose (41,3-85,8%), a manose (3,9-46,3%) e a ribose (0,5-19,2%). Já a fucose e a xilose se encontraram em poucos extratos e em baixas concentrações (0-5%) e (2-14%), respectivamente.

Ainda de acordo com Saika (2008), tanto o píleo como o estipe apresentaram predominância de glucose. Quanto ao teor de proteínas do cogumelo nativo, proveniente de Antonina (PR), o estudo revelou que a concentração detectada no estipe foi de aproximadamente 50% superior a do píleo. O valor observado para o píleo foi de 4,66% e o estipe foi de, em média, 6,58%. O valor observado de proteínas no cogumelo cultivado, fornecido pela empresa Kanebo Silk Ltda de Cornélio Procópio (PR) foi de 1,80% para o píleo e 2,02% para o estipe.

Foi observado com isso que o *M. titans* nativo possui uma maior concentração de proteínas do que o material cultivado. Esta característica, segundo Saika (2008) pode estar relacionada com o habitat de cada espécime, sendo que o seu metabolismo tem que atuar de maneira a se adequar ao meio e suas condições. Concluiu-se que o espécime possui baixo teor de proteínas em relação a outros cogumelos, porém podem fornecer todos os aminoácidos

indispensáveis, sendo mais importante a avaliação da qualidade protéica do que os aspectos quantitativos.

Saika (2008) ainda afirma que há presença de aldeídos, cetonas e açúcares, não sendo detectados fenóis nem alcalóides, podendo esses, estarem presentes em quantidades extremamente pequenas, sendo necessária a utilização de técnicas mais apuradas para sua identificação. Comparados parâmetros químicos e bioquímicos do *M. titans* nativo e cultivado, a presença de monossacarídeos essenciais e proteínas, o efeito não-lítico e a capacidade antioxidante moderada detectadas no cultivado contribuem positivamente para uma proposta de cultivo comercial.

Diversos estudos, entre eles o presente trabalho, vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de verificar se o fungo tem potencial biotecnológico.

2.3.2 Enzimas produzidas por fungos basidiomicetos

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais (SAID; PIETRO, 2004). As enzimas são bastante específicas quanto à sua função e, sendo assim, podem ser encontrados diversos tipos de enzima biossintetizada para catalisar os diferentes tipos de reação bioquímica (ÂNGELO, 2004).

As enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, além de biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos. A produção de enzimas é vital para as células, uma vez que estão muito ligadas ao catabolismo celular e, por essa razão, podem ser encontradas em todos os organismos vivos (ÂNGELO, 2004).

As enzimas de origem microbiana são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são controladas em laboratório. Essas enzimas ocupam lugar de destaque no mercado, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as proteases bacterianas na indústria de detergentes e couro, as amilases fúngicas e bacterianas na indústria do amido e panificação, as celulases e pectinases na indústria têxtil e de sucos naturais entre outras (SAID; PIETRO, 2004).

Os fungos Basidiomicetos destacam-se na biotecnologia pela sua capacidade biodegradadora de resíduos naturais. Isto se deve ao fato de um grande número desses fungos produzirem importantes grupos de enzimas, as hemicelulolíticas, as celulolíticas e as lignolíticas que desempenham um papel fundamental no ciclo do carbono, pela decomposição de resíduos vegetais (URBEN, 2001). Além disso, a aplicação das enzimas em diversos processos do setor produtivo tem merecido destaque nas últimas décadas. Isto se deve ao fato das enzimas atuarem como agentes que melhoram os processos industriais quanto à qualidade e eficiência do produto final, bem como aspectos de ordem econômica e ambiental (ISRAEL, 2005).

Todos os microrganismos capazes de decompor hemicelulose, celulose e lignina produzem uma série de enzimas com diferentes especificidades, que podem atuar em sinergia (BEGUIN, 1994).

2.3.3 Uso de enzimas na degradação do amido

O amido é o principal constituinte de muitos alimentos, sendo a principal fonte de energia e, também, um fator essencial para a estrutura, consistência e textura dos alimentos. Os grânulos de amido são formados por dois polímeros de glucose, designados por amilose e amilopectina, que se associam por meio de ligações de hidrogênio. Esses polissacarídeos freqüentemente formam complexos com outras substâncias presentes no vegetal. Esses grânulos são constituídos de 15 a 30% de amilose e 70 a 85% de amilopectina (VITOLLO, 2001).

A amilose é uma macromolécula linear constituída por pelo menos 500 unidades de glucose, podendo apresentar redobramentos e/ou torções que lhe conferem uma estrutura tridimensional. As unidades de glucose são unidas umas às outras por meio de ligações osídicas do tipo α -1,6. Os amidos provenientes de fontes diferentes apresentam propriedades químicas e físicas distintas. Em conseqüência, surgiram diferentes técnicas para a conversão industrial dos materiais amiláceos em xaropes, essencialmente usados como adoçantes (Tabela 2.1) (VITOLLO, 2001).

Durante as últimas duas décadas, a liquefação e a sacarificação do amido por meio de enzimas vêm crescendo, devido ao aumento da produtividade do processo hidrolítico, à melhor qualidade do produto final e à economia de energia. Alguns exemplos dessa conversão

enzimática do amido podem ser vistos na Tabela 2.1. As cifras envolvidas com o uso de enzimas na industrialização do amido giram em torno de US\$ 110 milhões (VITOLLO, 2001).

A capacidade de utilizar amido como fonte de carbono e energia é amplamente distribuída entre bactérias e fungos. Com o objetivo de hidrolisar o amido em diferentes nichos ambientais, os microrganismos produzem enzimas amilolíticas extracelulares com diferentes especificidades. As enzimas capazes de hidrolisar o amido estão entre as mais importantes produzidas em escala industrial. Estas enzimas são amplamente empregadas para a produção comercial de diversos tipos de xaropes de açúcares e de álcool a partir do amido, além de entrarem na formulação de detergentes, entre outras aplicações. A ação coordenada de muitas enzimas é, em geral, necessária para se obter uma eficiente conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, tais como glucose, maltose, ou maltotriose. Essas moléculas podem ser transportadas facilmente para o interior da célula e, dependendo do microrganismo, serem metabolizadas por vias metabólicas oxidativas ou fermentativas (BON *et. al.*, 2004).

As enzimas capazes de degradar polissacarídeos atacam a molécula a partir do interior da cadeia (endoenzimas) ou de suas extremidades (exoenzimas). A ação da α -amilase, que pertence ao primeiro grupo, dá origem a oligossacarídeos lineares e ramificados de diversos tamanhos e é acompanhada de uma rápida redução da viscosidade do meio. Esta enzima é amplamente distribuída entre os microrganismos. Já as exoenzimas atacam o substrato a partir do terminal não redutor, em etapas sucessivas, resultando em produtos de baixa massa molecular. A este grupo pertencem a β -amilase, a glucoamilase e a α -glicosidase. A glucoamilase, também conhecida por amilo-glicosidase, ou glucoamilase, é uma enzima típica de fungos, que ataca preferencialmente polissacarídeos de alta massa molecular. Esta enzima hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 e sua ação libera uma molécula de β -D-glucose por sua vez, causando a completa conversão do polímero em glucose (BON *et. al.*, 2004).

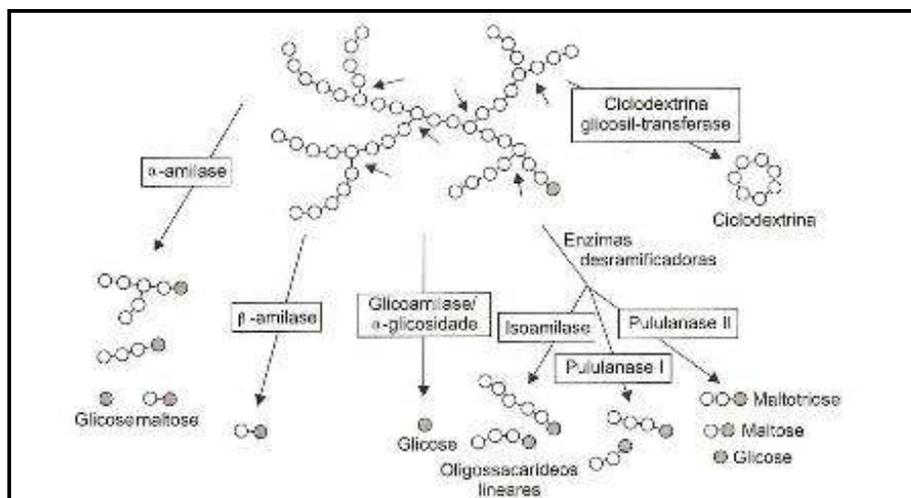


Figura 2.6: Hidrólise do amido por amilase com diferentes especificidades. Os círculos de cor cinza representam unidades de glicose com extremidades redutoras. As setas menores mostram os pontos de ramificação
 Fonte: Antranikian (1992) apud Bon *et. al.* (2004)

Tabela 2.1: Etapas de conversão enzimática do amido

ENZIMA	TRANSFORMAÇÃO	PRODUTOS
α -amilase bacteriana	Pasta de amido dextrinizada, liquefeita e viscosidade baixa	Maltodextrinas
α -amilase fúngica e glucoamilase	Oligossacarídeos hidrolisados (sacarificação)	Xaropes de maltose, de glicose e mistos
Glucoseisomerase	Isomerização da mistura sacarificada	Xaropes com alto teor de frutose
	Refino do resíduo resultante da isomerização	Oligossacarídeos residuais e glicose

FONTE: Adaptado de Vitolo, 2001

2.3.3.1 Amilases

As enzimas amilolíticas, também conhecidas como amilases, são responsáveis pela hidrólise do amido, um processo que, para ser completo, necessita de uma grande variedade de enzimas atuando em conjunto (amilases, glucosidases e pululanases). Entretanto, as amilases comerciais mais importantes são a α -amilase (α -D-1,4-glicana glicanahidrolase, EC

3.2.1.1), β -amilase (α -D-1,4-glicana maltohidrolase, EC 3.2.1.2) e a glucoamilase (α -D-1,4-glicana glicohidrolase, EC 3.2.1.3), e são muito utilizadas entre outras aplicações, principalmente na indústria de panificação, de biscoitaria, cervejeira e produção de xaropes de glucose (PANDEY *et. al.*, 2000).

As amilases atuam de diferentes maneiras durante a hidrólise do amido. Enquanto as glucoamilases atuam na hidrólise das ligações α -D-1,4 e α -D-1,6 terminais (exo-atividade) do polissacarídeo, liberando resíduos de D-glucose, as α -amilases demonstraram uma endo-atividade, ou seja, atuam na hidrólise das ligações internas da amilopectina, liberando também resíduos de D-glucose, conforme Figura 2.8 (HAMILTON *et. al.*, 2000; DUBEY *et. al.*, 2000 APUD ÂNGELO, 2004).

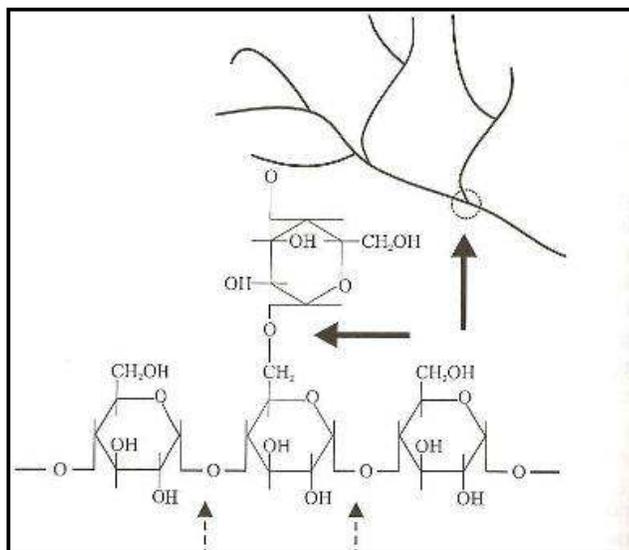


Figura 2.7: Representação esquemática de amilopectina

Fonte: Modificado de Lapasin e Pricl (1995) citado por Hamilton *et. al.*, (2000); Dubey *et. al.*, (2000) apud Ângelo (2004)

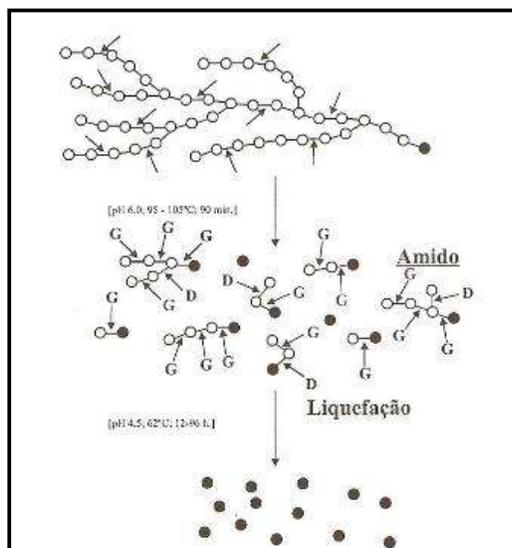


Figura 2.8: Hidrólise enzimática do amido em glucose: - representação de ligações glicosídicas α -D-1,4 e representação de ligações glicosídicas α -D-1,6; α -amilase na hidrólise do amido; G: Glicosidase na hidrólise de oligossacarídeos; D: enzimas amilolíticas de hidrólise das ramificações (debranching); o: resíduo de D-glucose não redutor; ●: resíduo de D-glucose redutor

Fonte: Modificado de Lévêque e cols (2000) citado por Hamilton *et. al.*, (2000); Dubey *et. al.*, (2000) apud Ângelo (2004)

2.3.3.1.1 α -amilase

A α -amilase é uma enzima amplamente encontrada na natureza (vegetais, animais e microrganismos). Atua sobre o amido, degradando-o aleatoriamente a partir de posições internas da cadeia polimérica (VITOLLO, 2001).

O peso molecular da α -amilase varia de 10 a 210 kDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 kDa (GUPTA *et. al.*, 2003), sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 kDa e as α -amilases fúngicas, de acordo com os resultados de diferentes autores citados por Pandey *et. al.*, 2005, entre 41 a 69 kDa de acordo

A ação da α -amilase sobre a amilose se dá em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glucose e maltose (VITOLLO, 2001)

Segundo Pandey *et. al.* (2005) a α -amilase quebra as ligações $\alpha(1,4)$ dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união $\alpha-1,4$.

A hidrólise da amilopectina pela α -amilase fornece como produtos finais (Figura 2.9): glucose, maltose e as α -dextrinas limite (oligossacarídeo contendo 4 ou mais unidades de glucose unidas por ligações osídicas do tipo $\alpha-1,6$). Amilases de origens diferentes produzem dextrinas diferentes. A α -amilase ataca os grânulos de amido danificados, formando dextrinas, as quais são hidrolisadas pela β -amilase (VITOLLO, 2001).

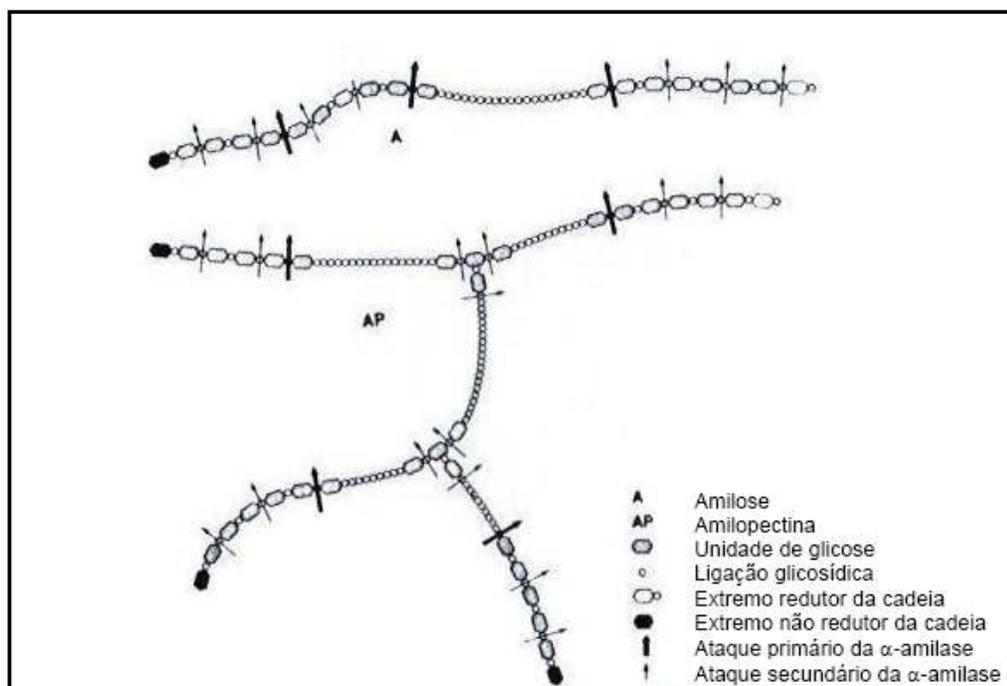


Figura 2.9 – Representação da enzima α -amilase sobre as frações de amido (amilose e amilopectina)
 Fonte: Bruchmann (1980) apud Spier (2005)

Essa enzima atua, isolada ou simultaneamente, com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de sementes de cereais são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto as de origem microbiana são empregadas em processos onde é necessária a sacarificação e a liquefação do amido (SPIER, 2005).

2.3.3.1.2 Glucoamilase

A amiloglucosidase, ou glucoamilase, ou glicoamilase, (1,4) (1,6)- α -D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.3, conforme a “*Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*”) é uma enzima extracelular que rompe as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glucose (LIN *et. al.*, 1993; PANDEY *et. al.*, 2005).

Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados pela enzima, que atua também sobre as ligações α -1,3. A amiloglucosidase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção. Entretanto, como a enzima é chamada de indução não típica, o microrganismo a sintetiza, mesmo se crescer em glucose como fonte de carbono (Reguly, 1991) citado por Costa, 1996. A enzima é encontrada no sangue, em meios de crescimento de bactérias e no malte de cevada; porém são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, assumindo importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK & SANTI, 1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glucose. Assim, a amiloglucosidase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glucose e dextrinas.

Aguero (1998) cita que o amido e a celulose são os mais abundantes polímeros encontrados na natureza dentre os quais o amido é constituído de dois compostos de elevado peso molecular, a amilose e a amilopectina. A amilose é formada por resíduos de α -D-glucose unidos por ligações α -1,4. A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, na qual os resíduos de α -D-glucose unidos por ligações α -1,4 são interconectadas por ligações α -1,6. O conteúdo desses dois polímeros varia com a fonte de amido.

Entre as sete enzimas amilolíticas capazes de hidrolisar substratos amiláceos a α -Amilase, Glucoamilase ou Amiloglucosidase (1,4- α -D-glicano glicanoglicoidrolase E.C.3.2.1.3), na qual suas propriedades específicas estão apresentadas de maneira resumida na Tabela 2.2, é uma enzima extracelular de ramificação única que hidrolisa as ligações glicosídicas α -1, 4, em alguns casos ligações α -1, 6 (quando esta estiver em posição terminal), e também ligações glicosídicas α -1,3, a partir do terminal não redutor da cadeia de aglicanos, gerando β -D-glucose (SILVA, 2006).

Tabela 2.2. Características de glucoamilases

Peso molecular (Dalton)	50.000 – 112.000
Conteúdo de carboidrato (5)	3,2 – 20
Ponto isoeletrico (PI)	3,4 – 7,0
pH ótimo	4,0 – 5,0
pH de estabilidade	3,0 – 7,0
Temperatura ótima (°C)	40 – 60
Estabilidade térmica (°C)	Até 60
Energia de ativação para a inativação térmica	57,31 kcal/mol
Requerimento de íons metálicos	Não
Substrato	Amilose, amilopectina, glicogênio, dextrinas, maltose, (substrato de menor tamanho)
Reação catalisada	Cliva ligações α -1,4 e α -1,6
Mecanismo de ataque	Exo
Produto	β -D-glucose (inversão da configuração)

Fonte: Saha; Zeikus, 1989 apud Agüero, 1998

Biologicamente esta enzima pode ser produzida pelos fungos *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Rhizopus oryzae* (AGÜERO, 1998; DALSENTER, 2000).

A ação das enzimas pode ser dividida em duas categorias: endoamilases (amilases), que rompem as ligações de maneira aleatória na molécula de amido; e exoamilases (glucoamilase), que hidrolisam o amido progressivamente a partir dos terminais não redutores, gerando produtos finais de baixo peso molecular (SILVA, 2006).

A glucoamilase é amplamente utilizada na indústria alimentícia para a produção de xaropes com alto teor de glucose e também empregada na produção de álcool e xarope com alto teor de frutose (LEMOS et al., 2003 APUD SILVA, 2006). Os mesmos autores complementam que vários microrganismos e plantas produzem a glucoamilase, das quais a maior parte disponibilizada comercialmente é produzida por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus* sendo a enzima produzida por *Aspergillus* mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas de 50-55°C sendo, entretanto, rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C [...]. Esta termoestabilidade limitada

afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária.

Deste modo, a obtenção de enzimas amilolíticas baseia-se no fato de que para que o microrganismo cresça num meio contendo polissacarídeos com principal fonte de carbono, existe necessidade de que o mesmo converta as macromoléculas em moléculas menores. Com este fim, o microrganismo sintetiza carboidrases, sendo a glucoamilase uma delas (AGUERO, 1998).

2.4 FERMENTAÇÃO ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação no estado sólido - FES, do inglês “*solid state fermentation*” ou “*solid state culture*”, pode ser definida como o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre e/ou dentro de partículas em 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 à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI, CAPALBO E MORAES, 2001).

A técnica da FES envolve o crescimento e o metabolismo de microrganismos na ausência de água livre, enquanto emprega um meio sólido para o crescimento do mesmo. Processos que usam meios sólidos são economicamente importantes para diferentes países, como o Brasil, com uma abundância de biomassa e resíduos agroindustriais que podem ser usadas como matérias-primas baratas (CASTILHO *et. al.*, 2006 APUD DAMASO, *et. al.*, 2008).

A FES é distinta da fermentação submersa, em que, via de regra, os substratos e outros nutrientes encontram-se na forma solúvel. Os substratos, tradicionalmente utilizados na FES, são resíduos agrícolas, como palhas de arroz, trigo, painço, cevada, milho e soja, além de substratos não-convencionais, como os resíduos agroindustriais e florestais (BON *et. al.*, (2004).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Contudo são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos

presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003, APUD PINTO *et. al.*, 2005).

Geralmente, os resíduos agroindustriais são os melhores substratos para a FES, principalmente devido ao baixo custo.

Segundo Pinto *et al.*, (2005), a FES apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas.
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais.
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais.
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo

Condições ambientais como a temperatura, pH, atividade água, aeração, umidade afetam o crescimento microbiano e a formação de produtos (PRIOR *et. al.*, 1992).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS e MOLIN, 2003 APUD PINTO *et. al.*, 2005).

Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação também tem-se estendido as indústrias farmacêuticas e bioquímicas (MITCHELL *et. al.*, 2000a., PANDEY *et. al.*, 2000a; PANDEY, 2003 APUD PALMA, 2003). Estudos recentes indicam o potencial da FES para produção de metabólitos de basidiomicetos para cremes dermatológicos para uso despigmentante (MOHORCIC *et. al.*, 2007)

Algumas linhas de pesquisa em FES engajam o enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais, onde microrganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (PINTO *et. al.*, 2005).

Outros estudos, de acordo com a Tabela 2.3 foram desenvolvidos utilizando essa metodologia.

Tabela 2.3: Trabalhos desenvolvidos visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais para diferentes finalidades.

AUTOR	Microrganismo utilizado	Substratos utilizados na FES	Produto
Vandenberghé (2000) citado por Israel (2005)	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de mandioca	Ácido cítrico
Brand <i>et. al.</i> (2002)	<i>Aspergillus niger</i>	Cascas de café	Processo de detoxificação biológica de cascas de café
Tunga & Tunga (2003)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz, farelo de milho e bagaço de cana-de-açúcar	Amilase extracelular
Azevedo (2004)	<i>Aspergillus soyae</i>	Farinha de soja	Isoflavonas bioativas
Tonini (2004) e Bittencourt (2007)	<i>Lentinula edodes</i>	Resíduos de palmeira-real-da-austrália	Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)
Silva (2006)	Bagaço de mandioca e farelo de trigo	Bagaço de cana-de-açúcar	Enzimas glucoamilase
Spier (2005)	<i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i>		Enzimas α -amilase e glucoamilase
Damaso <i>et. al.</i> (2008)	-	Subprodutos de refino do óleo de milho ou óleo de oliva	Enzimas Lipases

2.5 SUPLEMENTOS PARA O CRESCIMENTO DE FUNGOS

2.5.1 Farelo de Soja

A soja cultivada (*Glycine max*) pertence ao gênero *Glycine*, da família das leguminosas, ou *Fabaceae*. Reputavam-na, juntamente com o arroz, o trigo, a cevada e o painço, um dos cinco “grãos sagrados”. Embora natural da China, os Estados Unidos hoje lideram sua produção. Os Estados Unidos produziram 74 milhões de toneladas de soja em 1997, aproximadamente 50% da produção mundial, sendo seguido pelo Brasil, com 26,5 milhões de toneladas (SANTOS, 2000).

O grão de soja contém aproximadamente 38% de proteína, 18% de óleo, 30% de carboidratos e fibras e 14% de umidade, cinzas e componentes secundários. A soja contém também importantes minerais e vitaminas (SANTOS, 2000).

Segundo Tonini (2004) esta fonte de nitrogênio é importante pois atua na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas por algumas espécies de fungos. Normalmente, a velocidade de miceliação diminui à medida que se aumenta a concentração de nitrogênio.

Acredita-se que altas concentrações de nitrogênio limitam a degradação da lignina presente no substrato. Ainda de acordo com Tonini (2004), quando se aumentou a suplementação de farelo de soja no meio de cultura, diminuiu a velocidade de crescimento micelial, e aumentou o vigor micelial acompanhada da formação de micélio aéreo.

O farelo de soja é obtido a partir da moagem dos grãos de soja, para extração do óleo, que é destinado para o consumo humano, e representa um dos ingredientes de maior importância utilizado em rações animais.

Por se tratar de um subproduto obtido após a extração do óleo de soja, o farelo de soja, passa por uma série de processamentos que podem afetar a sua qualidade nutricional. Além disso, a soja é uma planta leguminosa, que possui alguns fatores antinutricionais para os monogástricos, como: inibidores de tripsina, hemaglutininas, e outros, que devem ser destruídos pelo processamento térmico, antes que o ingrediente seja incluído em rações de aves e suínos (RUNHO, 2001).

De acordo com Braga (1998), o farelo de soja é citado como complemento nutricional para o cultivo de fungos basidiomicetos.

2.5.2 Farelo de Arroz

O arroz, cujo nome científico é *Oryza sativa*, é uma gramínea semi-aquática, sua cultura requer temperatura entre 24° C e 30°C e radiação solar elevada, uma vez que a disponibilidade hídrica não é um fator limitante, devido ao fato da cultura ser cultivada em condições de solo inundado nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. É o segundo cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o trigo. Atualmente, o Rio Grande do Sul é responsável por 50% do arroz produzido no país e por 73,8% do arroz irrigado, sistema

que também é empregado em larga escala por Santa Catarina, em boa parte do Mato Grosso (ARROZ CRISTAL, 2002).

O arroz é um alimento energético de vital importância uma vez que, pouco mais de $\frac{3}{4}$ de sua composição é amido, com isso, gera energia para o corpo humano desempenhar todas as funções. Recomendado na dieta convalescente de quase todas as doenças, o arroz contém também, aproximadamente, 7% de proteína, 12% de água e, em menor quantidade, celulose, matéria graxa, cloreto de potássio, magnésio, manganês, sais de cálcio, sais de potássio, enxofre, óxido de ferro, cloro, ácido fosfórico e demais vitamina (ARROZ CRISTAL, 2002). A Tabela 3.6 mostra a composição química aproximada do farelo de arroz.

Segundo Momm (2002), depois da colheita e da limpeza, o arroz é transportado para o descascador de pedra de esmeril ou de borracha. O descasque remove a lema e a pálea que recobre os grãos. A casca retirada é o primeiro valioso subproduto, com dezenas de usos. A segunda etapa do beneficiamento tem o objetivo de extrair a película fina e escura que fica aderida ao endosperma amiláceo, o grão que comemos. A eliminação ocorre nos brunidores que dão ao arroz a coloração branca. O brunimento é feito por pedras de esmeril cônicas, que giram em caixas revestidas de chapas perfuradas, por onde sai o farelo, uma casca fina pardacenta.

2.5.3 Farelo de trigo

O trigo é uma gramínea, um cereal fasciculado, de fruto oval pertencente à família Gramínea e do gênero *Triticum*, possuindo diversas espécies. O tipo de maior interesse comercial é o *Triticum aestivum* L. (trigo comum) utilizado na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitaria (ABITRIGO, 2005).

Cheek (1991), explica que existem numerosas espécies; entretanto, apenas três apresentam importância econômica, o trigo duro (*Triticum durum*), o trigo comum (*Triticum aestivum*) e o trigo compacto (*Triticum compactum*). Outras espécies de menor importância incluem *Triticum spelta* e *Triticum dicoccum* que são cultivados em uma reduzida extensão dos Estados Unidos da América. No Brasil a espécie mais cultivada é *Triticum durum*. Estes são utilizados primeiramente para fins alimentares usados respectivamente para a fabricação de panifícios e massas.

Segundo Silva (2006), como o consumo do trigo não se dá de forma direta, os grãos precisam ser processados através da moagem e refinamento para obtenção da farinha de trigo. É do interior dos grãos que é extraído a farinha. Neste processo, o resíduo gerado é a casca do grão, também conhecido como farelo de trigo. A farinha é comercializada para fins industriais e alimentícios enquanto o farelo é comercializado para ser incorporado em rações animais, tendo em vista ser um material rico em fibras e proteínas.

O farelo é produzido em todo mundo em grandes volumes como subproduto da indústria de moagem do trigo e este material não deve ser desprezado, pois, concentra ainda, fonte considerável de açúcares, que podem ser utilizados, como por exemplo, na FES para produção de enzimas e cultivo de fungos basidiomicetos.

2.5.4 Bagaço de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), originária da América do Sul, é uma planta bastante cultivada em países de clima tropical, sendo a principal fonte de energia para a alimentação humana e animal nestes países e sua cultura é amplamente difundida no mundo. De acordo com Pandey *et. al.* (2000) a cultura da mandioca é a sexta cultura mais importante do mundo e é básica para mais de 700 milhões de pessoas em muitos países.

O bagaço de mandioca (farelo) é gerado em grandes quantidades, sendo um grande problema para os industriais, que doam ou vendem este resíduo a preços muito baixos a fazendeiros para a alimentação animal (TONINI, 2004).

O processamento de produtos agroindustriais, tais como a mandioca, geram grandes quantidades de resíduo, cujo acúmulo tem constituído grave problema de poluição ambiental.

Da produção da mandioca no Brasil, 35% se destinam somente à produção de fécula, cujo resíduo industrial é de aproximadamente 20 a 25% da matéria-prima utilizada. Uma quantidade equivalente a 17% da fécula total é perdida com o não aproveitamento do bagaço (DALSENTER, 2000).

O processo de produção de fécula de mandioca compreende as seguintes etapas: lavagem e descascamento das raízes, desintegração das células, liberação dos grânulos de amido, separação das fibras e do material solúvel e, finalmente, a secagem. Como resíduos da industrialização da mandioca tem-se: sólidos – casca marrom, entrecasca, descarte, crueira,

fibra, bagaço (farelo) e varredura; líquidos – manipueira e a água de lavagem das raízes (DALSENTER, 2000).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca também conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. É cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (PANDEY *et. al.*, 2000).

Em 2004, a produção nacional foi de 23,9 milhões de toneladas de mandioca segundo o IBGE e a previsão para 2005 é a colheita de 25 milhões de toneladas conforme estimativa da CONAB (PANDEY *et. al.*, 2000). Uma parte da produção é destinada à obtenção de farinha ou usada diretamente no consumo alimentar e o restante é destinado à industrialização, que consiste basicamente na extração de amido.

O bagaço de mandioca é um resíduo gerado na etapa da extração da fécula e possui em média, 70% de amido, 15% de fibras e 2% de proteínas. No Brasil, as fecularias processam de 200 a 600 toneladas de mandioca por dia (CEREDA, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica e de Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Química do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

3.1 ENSAIOS REALIZADOS

Foram realizados dois ensaios, sendo o Ensaio I dividido em dois experimentos, conforme descrito abaixo.

No Ensaio I teve-se por objetivo conhecer o efeito dos resíduos e dos suplementos no crescimento micelial de *Macrocybe titans* e a seleção do meio para os experimentos de atividades enzimáticas (Ensaio II). O Ensaio I foi constituído dos Experimentos A e B que diferiram apenas no tipo de resíduo empregado, sendo constituído por 9 tratamentos em cada experimento.

Experimento A:

-Com substrato lignocelulósico constituído por bainhas medianas trituradas (resíduo sólido obtido do processamento da palmeira-real-da-austrália) e amiláceo constituído pelo bagaço de mandioca, e com diferentes tipos e concentrações de suplementos (farelo de soja, farelo de trigo e farelo de arroz), avaliou-se o desempenho de *M. titans* por meio da análise do crescimento vegetativo. Para tanto foi empregada a medida do comprimento do micélio (crescimento micelial axial), dos valores de pH, do teor de umidade, cinzas e da atividade de água dos substratos, antes da inoculação e após o término de experimento, além da concentração em proteínas do meio e da atividade de glucoamilase.

Experimento B:

-Com substrato lignocelulósico constituído por bagaço de malte (resíduo sólido do processamento de cerveja), este experimento seguiu o mesmo procedimento do Experimento A.

No Ensaio II, teve-se por objetivo avaliar as atividades enzimáticas de α -amilase e glucoamilase durante o crescimento de *M. titans* no substrato selecionado no Ensaio I.

Nos Ensaios I e II, o sistema de cultivo utilizado foi a FES em frascos de 350 mL a 25°C. Os parâmetros de análises físico-químicas foram realizados antes da inoculação e após término do experimento no substrato.

Em resumo, os ensaios do trabalho tiveram início com o processo de produção de inóculo, a matriz secundária, do fungo *M. titans*, produzida a partir da matriz primária (original) proveniente da EMBRAPA FLORESTAS, – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária localizada no município de Colombo – PR, no ano de 2007. Após o crescimento e a obtenção de matrizes secundárias, suficientes para o processo de avaliação do crescimento micelial axial do fungo *M. titans* no Ensaio I, promoveu-se a inoculação dessas em frascos de 350 mL contendo os resíduos, bagaço de malte e bainhas medianas, juntamente com diferentes combinações de suplementos (farelo de mandioca, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de arroz). Com os melhores resultados do Ensaio I, em termos de crescimento e selecionando a melhor fonte de nitrogênio para o seu desenvolvimento, montou-se o Ensaio II onde foi determinada a produção, em escala temporal, das enzimas α -amilase e glucoamilase, verificando o melhor momento dessa produção na fase vegetativa do fungo estudado.

3.2 MICRORGANISMO UTILIZADO E SUA CONSERVAÇÃO

Para os dois ensaios realizados, o microrganismo utilizado foi o fungo *Macrocybe titans* linhagem CNPF 131, fornecido pela pesquisadora Maria Ângela Lopes Amazonas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Florestas - EMBRAPA FLORESTAS, Colombo – PR.

O microrganismo foi conservado em tubos de ensaio contendo meio BDA (Batata Dextrose-Ágar), e armazenado a 4° C \pm 1° C.

3.3 COMPOSIÇÃO DO MEIO SÓLIDO

Como substrato para crescimento micelial axial do fungo *M. titans*, foram utilizados dois tipos de resíduos agroindustriais. O primeiro, as bainhas medianas da palmeira-real-da-austrália, são provenientes de palmeiras cultivadas no município de Luis Alves – SC. As mesmas foram trituradas em picador de forrageira até obter uma granulometria entre 0,5 a 2 cm de comprimento e um diâmetro de aproximadamente 2 mm. Em seguida foram transferidas para o Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da FURB e acondicionadas em bandejas apropriadas em uma desidratadora de alimentos, sendo esse material desidratado a 80°C, até obtenção de uma umidade aproximada de 15%, para sua conservação (Figura 3.1) (TONINI, 2004). O segundo, bagaço de malte, foi obtido de cervejarias do Vale do Itajaí já na granulometria adequada ao experimento, sendo de aproximadamente 0,2 cm. O bagaço de malte é proveniente da produção de cerveja Pilsen



Figura 3.1: Bainhas medianas trituradas e desidratadas
Fonte: O autor

As bainhas medianas e o bagaço de malte foram utilizados como substratos base devido ao teor em material lignocelulolítico, carboidratos totais, proteínas e relação C:N, conforme apresentado nas Tabelas 3.1, 3.2. e 3.3.

Tabela 3.1: Composição química das bainhas medianas da palmeira-real-da-austrália

Composição	Bainhas medianas (g/100g)
Umidade	8,81 ± 0,02
Cinzas	4,28 ± 0,05
Extrato Etéreo	0,98 ± 0,08
Proteína (N x 6,25)	3,62 ± 0,09
Fibra alimentar total	72,9 ± 0,03
Fibras solúveis	3,65 ± 0,02
Fibras insolúveis	69,2 ± 0,03
Carboidratos totais	82,3 ± 0,05
kcal / 100g	352 ± 0,07

Fonte: Vieira, 2006

Tabela 3.2: Composição química das bainhas medianas da palmeira-real-da-austrália

Composição	Bainhas medianas % (g/100g)
Carbono Orgânico Total	47,15
Nitrogênio Total	0,54
Relação C:N	87:1
Extrativos Totais	23,30
Lignina	15,75
Holocelulose	60,95

Fonte: Tavares, 2008

Tabela 3.3: Composição química do resíduo de cervejaria úmido (RMU)

Composição	RMU
Matéria seca (%)	21
Proteína Bruta (PB)	25,4 – 27,1
NDT (%)	13,83
EM (Mcal/kg)	489,3 – 516,6
ED (Mcal/kg)	2790
EE (%)	1,36
EB (%)	3,13
FDA	4,83
FDN	8,82

NDT – Nutrientes Digestivos Totais; EM – Energia Metabolizável; ED – Energia Digestível; EE – Extrato Etéreo; EB – Energia Bruta; FDA – Fibra de Detergente Ácido; FDN – Fibra de Detergente Neutro.

Fonte: adaptado de Santos, 2004

Como fontes de nitrogênio foram empregados os seguintes suplementos, os quais estão representados na Fotografia 3.2.:

- farelo de soja cedido pela Empresa Búngue Alimentos, unidade localizada em Mato Grosso. Esse resíduo foi triturado em liquidificador industrial e peneirado para obtenção de um farelo, obtendo uma granulometria de 2 mm a 5 mm;
- farelo de trigo comercial adquirido em agropecuárias no município de Blumenau;
- farelo de arroz, fornecido pela indústria Roza Cereais e Beneficiamento de Arroz da cidade de Massaranduba – SC;

Como fontes de carbono foi utilizado o bagaço de mandioca, representado na Fotografia 3.2., fornecido pela empresa Amafíl de Cianorte (PR), já desidratado e com a granulometria de 1 a 2 mm.

Todos os resíduos foram conservados em freezer até o momento de sua utilização.



Figura 3.2: Substratos base e suplementos utilizado nos ensaios. A) Bainhas medianas; B) Bagaço de malte; C) Bagaço de mandioca; D) Farelo de soja; E) Farelo de trigo e F) Farelo de arroz.

Fonte: A autora

Nas Tabelas 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7 estão apresentadas as composições dos resíduos utilizados como fonte de nitrogênio e amido.

Tabela 3.4: Composição química do farelo de soja peletizado (46%) conforme certificado de garantia de Qualidade da Bungüe Alimentos

Composição	Porcentagem (%)
Umidade	12,62
Óleo	1,84
Proteína	45,25
Fibra	6,20
Cinzas	5,43
Sílica	0,03
Urease (mg N/g.min.)	0,07

Fonte: Tonini, 2004

Tabela 3.5: Composição nutricional do farelo de trigo cru

Composição Centesimal	Umidade	Valor por 100g de amostra
Umidade	G	8,18
Energia	kcal	184
Proteínas	g	17,48
Lipídios Totais	g	4,74
Carboidratos Totais	g	64,25
Carboidratos disponíveis	g	17,82
Cinzas	g	5,35
Fibra Alimentar Total	g	46,43

Fonte: Mendez *et. al.*, 1995, Filisetti *et. al.*, 1991 apud Silva, 2006

Tabela 3.6: Composição química do farelo de arroz (% matéria seca)

Proteína Bruta	13,12
Matéria Orgânica	90,43
Extrato Etéreo	13,73
Fibra Bruta	8,54
Material Mineral	9,57
Nutrientes digestíveis totais	62,60
Cálcio	0,11
Fósforo	1,59

Fonte: Rodrigues Filho et al., 1993; Valadares Filho et al., 2001, Vieira et al., 1999, Camarão et al., 1993, apud Filho e Camarão, 2005

Tabela 3.7: Composição físico-química do bagaço de mandioca

pH	5,10
Umidade	13,91
Cinzas (g/100gms)	3,07
Lipídios (g/100gms)	0,14
Proteínas (g/100gms)	1,56
Fibras (g/100gms)	42,04
Amido (g/100gms)	51,27
Açúcares Redutores Totais (g/100gms)	53,97
Açúcares Redutores (g/100gms)	1,06
Capacidade máxima de retenção de água (% v/v)	65

Fonte: Dalsenter, 2000

3.4 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia aqui aplicada é baseada em outros estudos conduzidos por pesquisadores do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURB e outros autores descritos no decorrer dos ensaios.

3.4.1 Produção do inóculo, matriz secundária

Em condições assépticas, aproximadamente 25 mL de meio de cultura BDA, previamente esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 120° C, foram vertidos em placas de Petri. Após solidificação do meio, foram inoculados fragmentos de micélio, com discos de 7 mm de diâmetro proveniente de cultura estoque (Figura 3. 3), no centro de cada placa. Estas foram mantidas em estufa a 25° C \pm 1° C até completo preenchimento (BITTENCOURT E TAVARES, 2007). Estas placas denominadas matriz secundária foram utilizadas para obtenção das fatias, para os ensaios I e II.

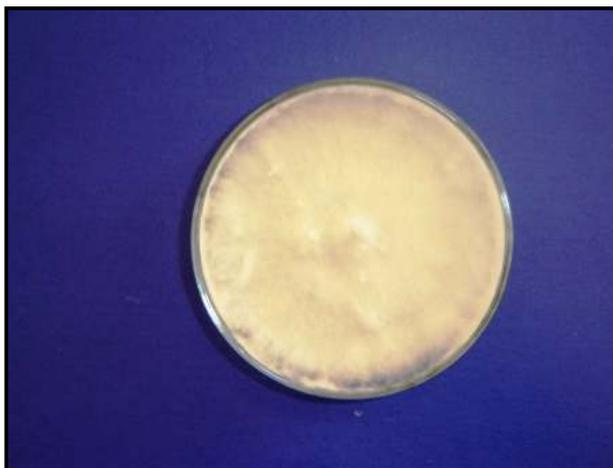


Figura 3.3: Inóculo de *Macrocybe titans* em meio BDA
Fonte: A autora

A Figura 3.4 apresenta, em resumo, a seqüência dos procedimentos adotados para a produção de inóculo do fungo.

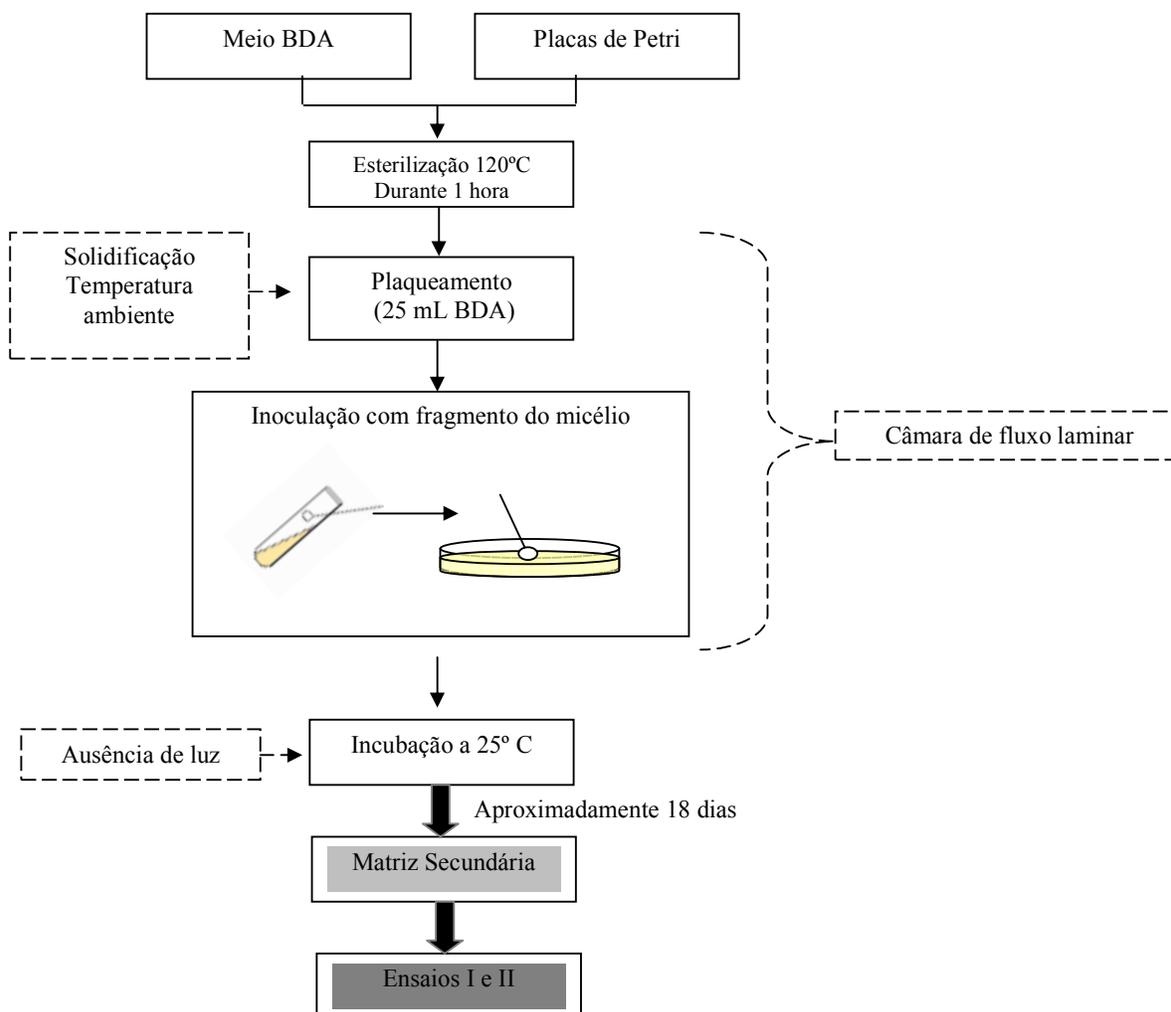


Figura 3.4: Esquema do procedimento para a produção do inóculo de *Macrocybe titans* em meio BDA
Fonte: A autora

3.4.2 ENSAIO I - Estudo do crescimento micelial axial em FES

Resíduos provenientes dos processos agroindustriais descritos no item 3.3 foram utilizados como substratos e suplementos nutricionais no preparo dos meios de cultivo para avaliação do crescimento micelial axial do fungo *M. titans* e posterior seleção do meio para o estudo de atividades enzimáticas. A metodologia é baseada no estudo de Tonini (2004).

Para discussão dos resultados deste ensaio, dividiu-se o Ensaio I em dois experimentos, sendo o Experimento A, os tratamentos contendo como substrato base o resíduo de bainhas medianas e o Experimento B, os tratamentos contendo como substrato base o resíduo de bagaço de malte.

Os dois ensaios foram conduzidos em frascos de 350 mL, transparentes, autoclaváveis, cilíndricos, vedados com tampas metálicas perfuradas com abertura de ½ polegada coberta com papel filtro, sendo o ensaio I realizado com cinco repetições para maior confiabilidade dos resultados, totalizando 90 frascos, sendo 45 com o resíduo da palmeira-real-da-austrália como substrato e 45 com o resíduo do processo cervejeiro, bagaço de malte, como substrato. Os frascos receberam a composição dos meios conforme Tabelas 3.8 e 3.9, e as quantidades também foram baseadas no trabalho de Tonini (2004), respeitando a capacidade volumétrica dos frascos.

Após pesar os resíduos, misturou-se os mesmos, juntamente com a adição de 200 mL de água destilada. Após a retirada do excesso da água por compressão manual, foi obtida uma umidade de aproximadamente 70%, e colocou-se os resíduos dentro dos frascos. Esses, foram esterilizados na autoclave por 1 hora a uma temperatura de 120°C e resfriados a temperatura ambiente. Depois, os frascos foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para a inoculação com micélio fresco que ocorreu de forma a espalhar o micélio na superfície superior do substrato preenchendo totalmente a superfície, utilizando fragmentos do meio de cultivo contendo o micélio do fungo. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em estufa BOD, a uma temperatura de 25°C para verificar o crescimento micelial axial do fungo.

A cada dois dias, no Experimento A e diariamente, no Experimento B, devido a velocidade de crescimento, e após a fixação do fungo ao substrato, ou seja, após a colonização da camada superior dos meios, foram realizadas medidas do crescimento micelial axial com auxílio de uma fita milimetrada (Figura 3.6). Os experimentos foram cessados quando o primeiro frasco apresentou preenchimento integral do substrato com as hifas, se dando assim, por encerrado cada experimento.

A metodologia utilizada para análise do crescimento micelial axial foi baseada no estudo de Tonini (2004). Os cálculos referentes ao crescimento estão descritos nos itens 3.4.2.1 e 3.4.2.2.1 .

Durante este ensaio, realizaram-se diferentes determinações, sendo elas pH, umidade, cinzas, proteínas totais, A.a. e determinação da enzima amilolítica glucoamilase.

Tabela 3.8: Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Experimento A

Substratos	Material	Fonte de	Fonte de Nitrogênio		
	Lignocelulósico	amido	Farelo de	Farelo de	Farelo de
Tratamentos	Bainhas medianas	Farelo de mandioca	soja	arroz	trigo
(g)					
01	30	4,0	1,5		
02	30	4,0		1,5	
03	30	4,0			1,5
04	30	4,0	4,0		
05	30	4,0		4,0	
06	30	4,0			4,0
07	30	4,0	7,0		
08	30	4,0		7,0	
09	30	4,0			7,0

Tabela 3.9: Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Experimento B

Substratos	Material	Fonte de	Fonte de Nitrogênio		
	Lignocelulósico	amido	Farelo de	Farelo de	Farelo de
Tratamentos	Bagaço de malte	Farelo de mandioca	soja	arroz	trigo
(g)					
01	30	4,0	1,5		
02	30	4,0		1,5	
03	30	4,0			1,5
04	30	4,0	4,0		
05	30	4,0		4,0	
06	30	4,0			4,0
07	30	4,0	7,0		
08	30	4,0		7,0	
09	30	4,0			7,0

A Figura 3.5 apresenta, em resumo, a seqüência dos procedimentos adotados para o desenvolvimento do Ensaio I.

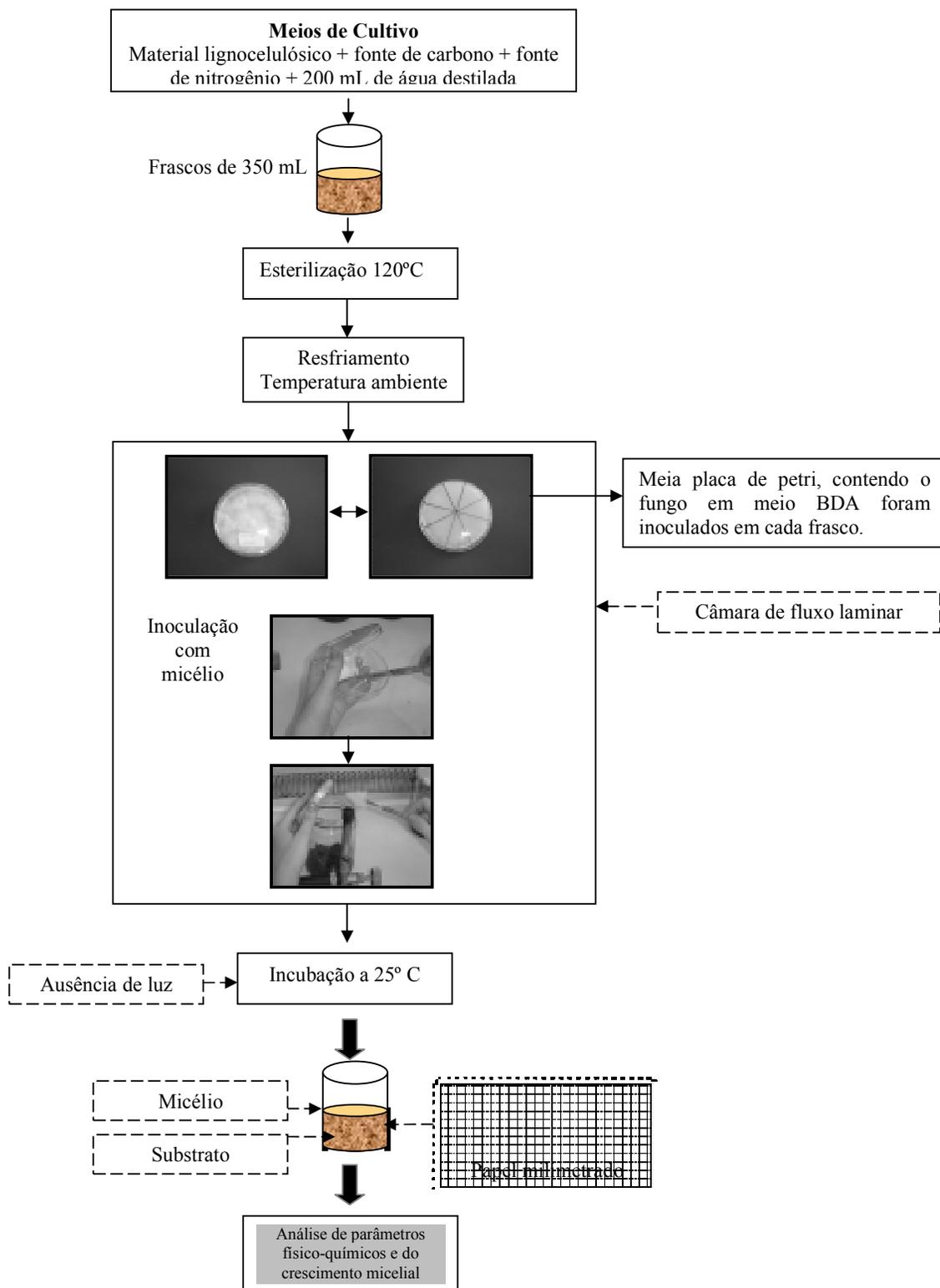


Figura 3.5: Esquema representativo dos procedimentos para o desenvolvimento do Ensaio I
Fonte: A autora

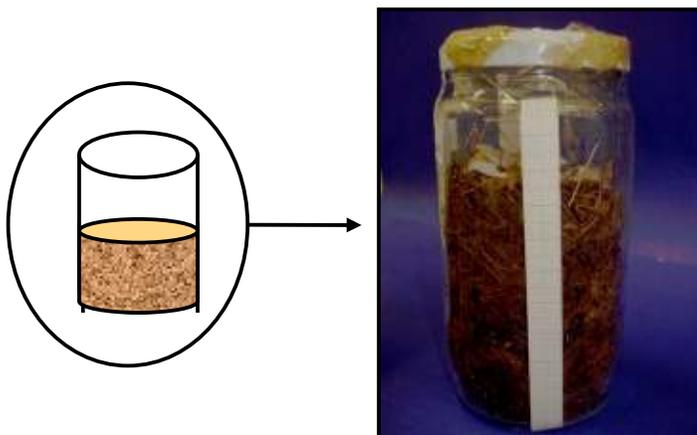


Figura 3.6: Papel milimetrado utilizado para marcar o crescimento micelial axial
 Fonte: A autora

3.4.2.1 Cálculo da velocidade média do crescimento micelial

A determinação da velocidade de crescimento micelial axial em frascos teve por objetivo verificar os melhores suplementos nutricionais para seu crescimento, para, no Ensaio II, trabalhar com os melhores tratamentos, obtendo assim melhores resultados em menor tempo.

A velocidade média de crescimento micelial axial do fungo foi obtida através da razão entre a distância total percorrida pelo micélio, calculada através de um papel milimetrado, e o tempo gasto para que ocorresse o crescimento.

A velocidade média de crescimento micelial foi calculada pela equação 01:

$$V_m = \frac{V_f - V_i}{T_f} \quad (01)$$

Na qual:

V_m = velocidade média de crescimento micelial (cm/dia)

V_f = medida do crescimento micelial no tempo final (cm)

V_i = medida do crescimento micelial no tempo inicial, período de fixação do micélio a camada superior do substrato (0 cm)

T_f = Tempo final (dias)

3.4.2.2 Cálculo do crescimento micelial total

A partir do comprimento de micélio foram calculadas as médias totais, obtendo-se a média de crescimento micelial total pela equação 02, visando a comparação entre os diferentes tratamentos.

$$CT = \frac{C}{10} \quad (02)$$

Na qual:

CT = Média total dos frascos (cm) (5 repetições).

C = Somatória de todos os valores (cm)

10 = Número de leituras realizadas

3.4.2.3 Determinação do pH em meio sólido

O pH foi medido em todas as amostras, em triplicata, no Ensaio I, utilizando um potenciômetro digital (DIGIMED, modelo DM 20). As amostras (1g) foram suspensas em 10 mL de água destilada. Esperou-se 10 minutos com agitação intermitente e procedeu-se a leitura em potenciômetro digital.

3.4.2.4 Determinação da A.a. (Atividade de água)

A A.a. foi medida em todas as amostras, do Ensaio I, utilizando o aparelho AQUALAB, que utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado. Essa técnica é originária da média de umidade relativa aprovada pelo AOAC (Associação de Químicos Analistas) (BOLETIM TÉCNICO INFORMATIVO BRASEQ – BRASILEIRA DE EQUIPAMENTOS LTDA, 2005).

3.4.2.5 Determinação da umidade do meio sólido

Para esta determinação utilizou-se a adaptação feita por Maiorano (1990) do método nº 14004 da A. O. A. C. (Association of Official Analytical Chemistry) de determinação de umidade em cereais. A adaptação resultou no seguinte procedimento:

Em uma balança semi analítica, previamente tarada, pesou-se aproximadamente 1g de material. Levou esta placa em estufa a 80°C por 24 horas, após a qual foi transferida para um dessecador. Atingida a temperatura ambiente procedeu-se a segunda pesagem.

O cálculo da umidade foi feito conforme a equação 03:

$$U = \frac{100xN}{P} \quad (03)$$

Na qual:

N = diferença entre as duas pesagens (g);

P = massa da amostra úmida (g);

3.4.2.6. Determinação de cinzas

Resíduo por incineração ou Cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550°-570°C. Nem sempre este resíduo apresenta toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento.

Pesou-se 1g da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla, resfriada em dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo, na seqüência pesada. Em seguida, levou-se para a mufla a uma temperatura de aproximadamente 550°C durante 4 horas. Foi resfriado em dessecador e feito uma nova pesagem até obter um peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O cálculo para determinar o % de cinzas foi realizado segundo a equação 04:

$$\frac{100 \times N}{P} = p / p \quad (04)$$

Na qual:

p/p = cinzas por cento

N = nº de g de cinzas

P = nº de g da amostra

3.4.3 ENSAIO II – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.4.3.1 Procedimento para coleta de amostras

Determinou-se a atividade de amilases (α -amilase e glucoamilase), em escala temporal, tendo como base os melhores substratos e condições definidos no Ensaio I.

No decorrer do trabalho, também foi avaliada a concentração das proteínas totais dos meios para posterior determinação da atividade específica das enzimas estudadas.

Este ensaio foi trabalhado com 10 frascos de cada tratamento selecionado no Ensaio I, conforme Tabela 3.10, contendo os melhores resultados em termos de crescimento micelial e fontes de nitrogênio. Foram realizadas 10 leituras das atividades enzimáticas em intervalos de 48 horas após a fixação do micélio em todo o substrato, fazendo as dosagens das enzimas do presente estudo. A incubação foi conduzida a 25°C por diferentes tempos 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 e 40 dias.

Tabela 3.10: Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) nos diferentes tratamentos do Ensaio II e os intervalos de leitura

Tratamentos		Bagaço de Malte (g)			Farelo de Mandioca (g)			Farelo de Soja (g)			
4		15			2			2 (13%)			
7		15			2			3,5 (23%)			
Após fixação		10 leituras									
Leituras (Dias de cultivo)		22	24	26	28	30	32	34	36	38	40

O meio fermentado proveniente dos frascos foi congelado em freezer, sempre que definido o momento de parar a fermentação até ser usado no momento da extração para as determinações das atividades enzimáticas e de proteínas.

3.4.3.2 Extração das enzimas do meio sólido

O método para extração da enzima do meio sólido fermentado foi adaptado daquele descrito por Maiorano (1990), como utilizado por Dalsenter (2000) e Palma (2003) descrito abaixo.

Pesou-se, em um becker, 1 g de amostra, adicionando, em seguida, 15 mL de água destilada. O meio foi deixado em repouso durante 30 minutos, utilizando o extrato resultante para a determinação da atividade das enzimas α -amilase e glucoamilase e das proteínas totais.

3.4.3.2.1 Atividade de α -amilase

Para esta determinação adaptou-se o método proposto por Bernfield (1955) citado por Ayver (2004) descrito a seguir e representado, em resumo, na Figura 3.7.

Em um banho termostático a 37°C, colocou-se um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de amido solúvel 1% (MERCK) juntamente com 0,2 mL da amostra proveniente da extração, conforme o item 3.4.3.2. O pH da amostra foi ajustado para aproximadamente 5,2 e a reação ocorreu por 30 minutos. Em seguida foi levada a um banho de gelo a fim de parar a atividade da enzima.

Para o preparo de amido solúvel 1%, suspendeu-se 1 g de amido solúvel (MERCK) em 100 mL de água destilada. Ferveu-se por 2 minutos. Após resfriado imediatamente, até atingir uma temperatura aproximada de 30°C, completou-se o volume para 100 mL de solução.

A glucose liberada na reação de hidrólise descrita foi analisada pelo método da glucose-oxidase, conforme Silva (2006) utilizando procedimento descrito no Kit enzimático Glucose Enz – Color, adquirido do Laboratório de Análises Clínicas – Laborclin de Vargem Grande Pinhais - Paraná. As amostras foram lidas na absorbância de 500nm em espectrofotômetro UV-1650 PC, UV-Vis Shimadzu. O preparo das amostras, está descrito na Figura 3.7.

A atividade da enzima α -amilase foi determinada de acordo com a seguinte equação (IKASARI, 1997 APUD DALSENTER, 2005):

$$A\alpha = \frac{G}{TR} \times \frac{V_{Amido}}{VA} \times \frac{PMg}{VR} \times \frac{VE}{ME} \quad (05)$$

Na qual:

G = concentração da glucose pelo método glucose-oxidase (g/L)

Vamido = (volume do amido) (0,5 mL)

VR = Volume de meio reacional (0,7 mL)

VA = Volume de amostra utilizada (0,2 mL)

PMg = Peso molecular da glucose (5,56 μ mol/L)

TR = Tempo de reação (30 minutos)

VE = Volume da extração (15 mL)

ME = Massa seca da amostra utilizada (1g)

Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de glucose por minuto, nas condições padronizadas.

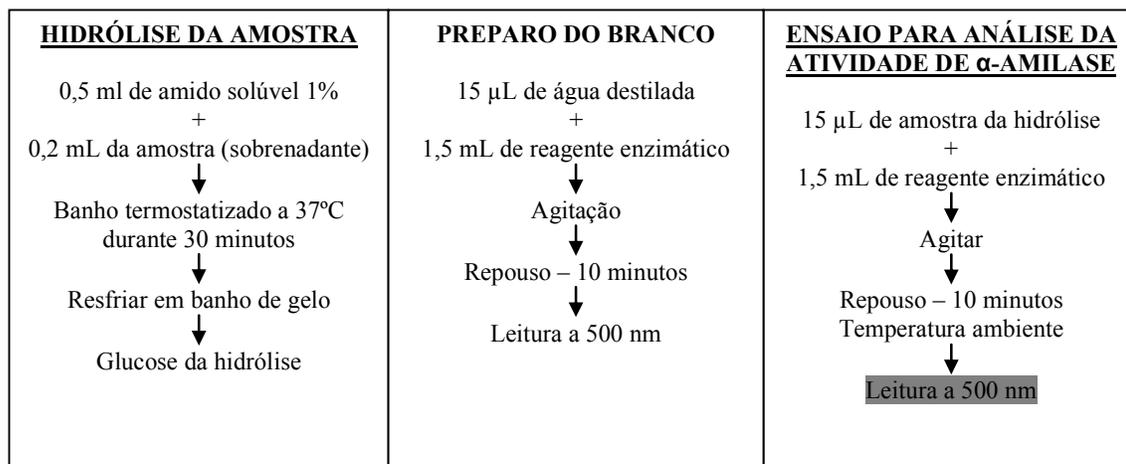


Figura 3.7: Seqüência dos passos para dosagem da enzima α -amilase. A seqüência apresenta o procedimento adotado para a obtenção da amostra da enzima hidrolisada bem como o procedimento para a leitura da glucose em espectrofotômetro

Fonte: A autora

3.4.3.2.2 Atividade de Glucoamilase

A atividade da glucoamilase foi determinada pelo método da glucose-oxidase, após reação de hidrólise, conforme adaptado da metodologia descrita por Dalsenter (2005) que procedeu uma adaptação de Ikasari (1997). Para tal procedimento, transferiu-se 5 mL de solução de amido 4% (MERCK) para os tubos de ensaio, levando-se em seguida ao banho termostático até atingir a temperatura de 60° C. Adicionou-se 1 mL da amostra proveniente da extração, diluída conforme necessidade e a reação ocorreu por 30 minutos. Após esse procedimento, levou-se os tubos de ensaio a um banho de gelo com o objetivo de parar a atividade da enzima.

Para a preparação da solução de amido 4%, suspendeu-se 4 g de amido solúvel (MERCK) em 100 mL de água destilada. Ferveu-se por 2 minutos. Após resfriado imediatamente, até atingir uma temperatura aproximada de 30°C completou-se o volume para 100 mL de solução.

A medida da glucose, liberada na etapa de hidrólise descrita anteriormente, foi medida conforme descrito para a enzima α -amilase.

Esses procedimentos, estão representados, em resumo, na Figura 3.8, juntamente com o preparo das amostras para leitura.

A atividade da enzima glucoamilase foi determinada de acordo com a seguinte equação (IKASARI, 1997 APUD DALSENTER, 2005):

$$Ag = \frac{G}{TR} \times \frac{V_{Amido}}{VA} \times \frac{PMg}{VR} \times \frac{VE}{ME} \quad (06)$$

Na qual:

G = concentração da glucose pelo método glucose-oxidase (g/L): (Glucose da hidrólise 6) – (Glucose livre).

Vamido = (volume do amido) (5 mL)

VR = Volume de meio reacional (6 mL)

VA = Volume de amostra utilizada (1 mL)

PMg = Peso molecular da glucose (5,56 μ mol/L)

TR = Tempo de reação (30 minutos)

VE = Volume da extração (15 mL)

ME = Massa seca da amostra utilizada (1g)

Uma unidade de atividade de glucoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de glucose por minuto, nas condições padronizadas.

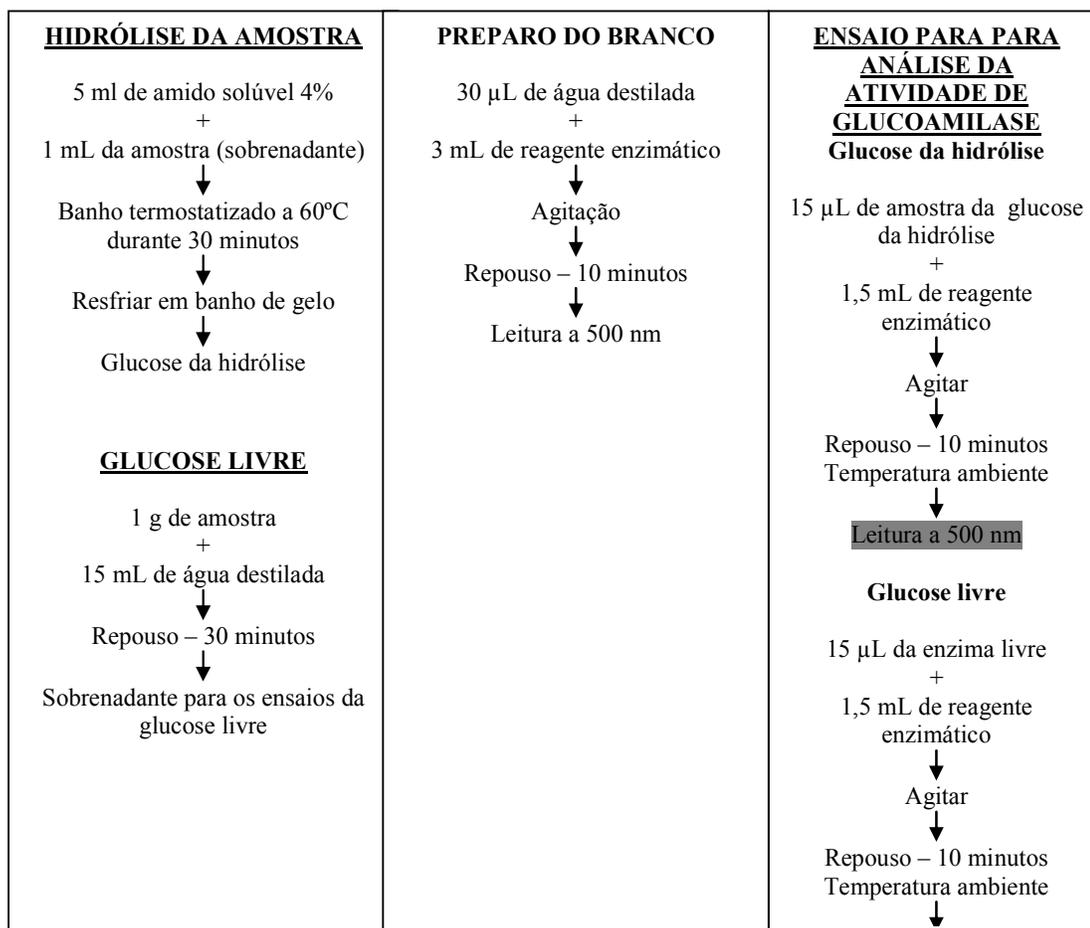


Figura 3.8: Seqüência dos passos para dosagem da enzima glucoamilase. A seqüência apresenta o procedimento adotado para a obtenção da amostra da enzima hidrolisada e da enzima livre bem como o procedimento para a leitura da glucose em espectrofotômetro
Fonte: A autora

3.4.3.2.3 Produtividade máxima

A produtividade enzimática máxima nos cultivos (PEM) em frascos foi realizada através da equação 07:

$$PME = \frac{AE}{T_{AE}} \quad (07)$$

Na qual:

AE = Atividade Enzimática no tempo t de valor mais elevado (U/g)

TAE = tempo t referente ao cultivo com valor mais elevado de AE (dias).

3.4.3.3 Extração das proteínas do meio sólido

Pesou-se, em um becker, 0,1g, de amostra (homogeneizada), adicionando-se em seguida 1 mL de NaOH mol/L (0,4 g de NaOH em 10 mL de água destilada), juntamente com 1 mL de água destilada. Os meios foram colocados em tubos de plástico (tubos de Duran) e após agitação, foram levados a água fervente durante 5 minutos, sendo resfriados na seqüência em um banho de gelo. Em seguida, foram centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm, utilizando o sobrenadante para dosagem de proteínas totais.

As proteínas totais livres foram medidas sem o processo de centrifugação. Ambas as extrações estão representadas, na Figura 3.9.

3.4.3.3.1 Determinações de proteínas totais

A concentração de proteínas das amostras foi determinado pelo método proposto por Bradford (1976), representado, em resumo, na Figura 3.9. Para cada 300 µL de amostra extraída (sobrenadante), foram adicionados 3 mL de Bradford, deixando reagir por 5 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, foi realizada a leitura em espectrofotômetro medindo a Absorbância de 595 nm.

Para preparar o reagente Comassie (Bradford), diluiu-se 50mg de reagente “Coomassie brilliant blue” G-250 em 25 mL de etanol. Adicionou-se ao meio 50 mL de Ácido Fosfórico 85%, mantendo a solução em repouso durante 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 425 mL de água destilada e deixou-se a solução em agitação por 24 horas.

A curva padrão feita com soluções de albumina bovina na concentração de 50 – 200 mg/L e está representada no Apêndice, Figura A1.

A concentração de proteínas totais foi expressa em mg/g através da equação 08:

$$PT = \frac{CxV}{M} \quad (08)$$

Na qual:

PT = concentração de proteínas totais em mg/g;

C = concentração das proteínas totais em mg/mL obtida da equação da curva feita com soluções padrões de albumina;

V = quantidade de NaOH e água utilizadas na extração da enzima do meio sólido, em litros;

M = massa da amostra seca (em gramas), utilizada na extração acima referida.

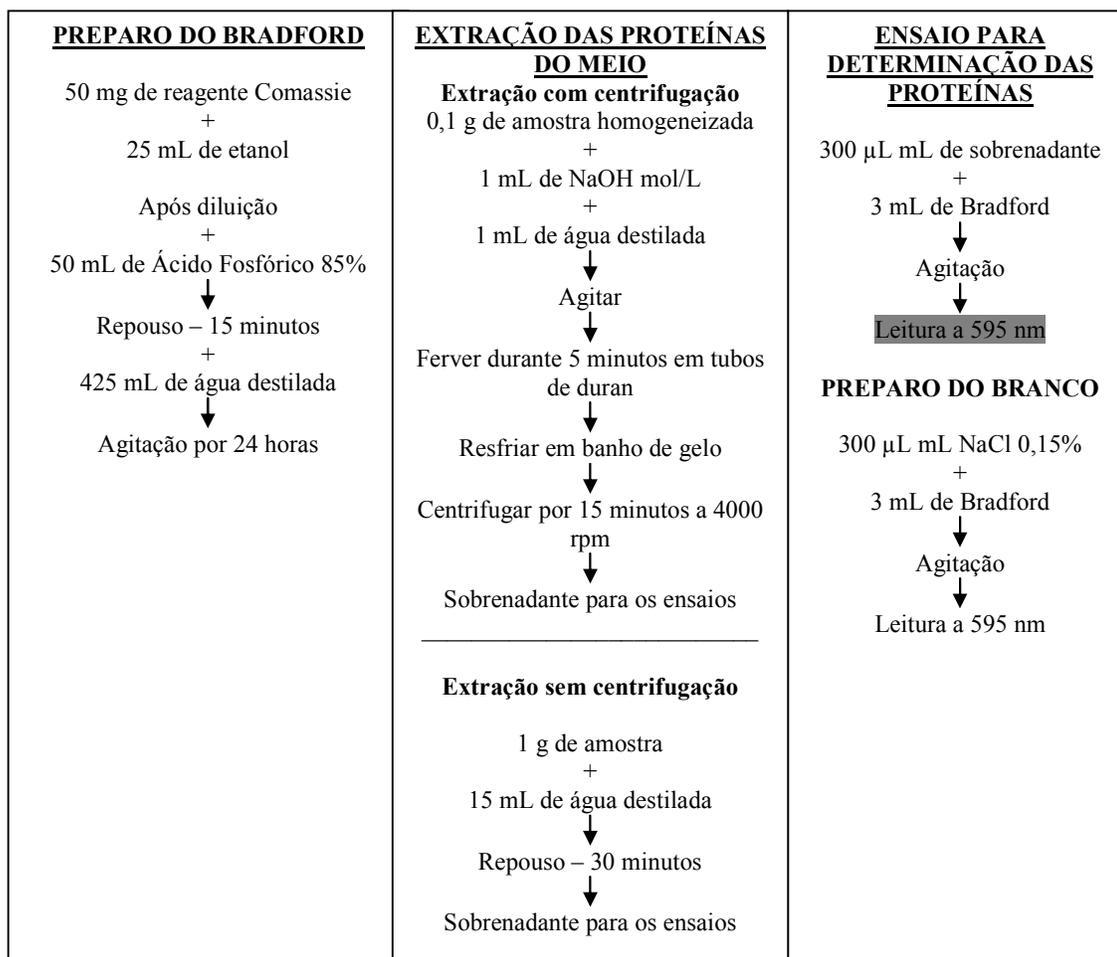


Figura 3.9: Seqüência dos passos para dosagem de proteínas totais nos meios de cultivo estudados. A seqüência apresenta o método de preparo do reagente, a extração da amostra do meio e o procedimento para leitura em espectrofotômetro

Fonte: A autora

3.4.3.4 Cálculo da atividade enzimática específica

A atividade específica dos cultivos (AS) em frascos foi realizada através da equação abaixo:

$$AS = \frac{AE}{PT} \quad (09)$$

Onde:

AS = Atividade específica (U/mg);

AE = Atividade Enzimática no tempo t (U/g);

PT = Proteínas totais no tempo t (mg/g).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O planejamento estatístico foi realizado através de uma análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa confeccionado pelo Professor Msc. Carlos Efrain do Departamento de Matemática (FURB) com desenvolvimento em planilha Excel.

A análise de Variância (ANOVA) é o conjunto de tratamentos estatísticos que envolve, entre outros, os seguintes planejamentos:

- Planejamento Fatorial

É usado para estudar como certos fatores influenciam sobre uma determinada resposta, sendo de grande importância prática. Pode ser ampliado para resultar em outro planejamento mais sofisticado. Tal técnica consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis escolhidas requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Assim, para n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, e n_k do fator k, o planejamento terá no mínimo $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos e será chamado de

fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. O planejamento em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis (superior + e inferior -) é o mais simples e mais utilizado dos fatoriais. O planejamento de dois níveis, havendo k variáveis em estudo, irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes. Tal planejamento é, assim, chamado de fatorial 2^k . Já o planejamento estudado em três níveis (-1, 0,+1) , onde k é o número de variáveis, é chamado de fatorial 3^k (BARROS-NETO *et. al*, 1995).

- Planejamento Fatorial Fracionário

O número de experimentos necessários para um planejamento fatorial completo 2^k aumenta, geometricamente, com k . Se k for grande, e os experimentos realizados forem de duração considerada, sua realização prática fica inviabilizada. O fato de poderem-se estimar todos os efeitos de um fatorial completo não implica que todos eles possuam magnitudes semelhantes. Assim, interações de ordem mais elevadas tendem a tornarem-se pequenas, podendo, muitas vezes, ser negligenciáveis. Além disso, quando um número relativamente grande de variáveis é escolhido para ser estudado, é comum acontecer de algumas não possuírem efeito global significativo, e as informações poderem ser obtidas pela realização de somente uma fração do fatorial. Havendo necessidade, o fatorial será completado pela realização de experimentos complementares (BARROS-NETO *et. al*, 1995).

Por definição (KHURI & CORNELL, 1987), um fatorial fracionário 2^{k-m} é um planejamento que consiste de uma fração correspondente a $1/2^m$ do fatorial completo 2^k , onde “ m ” deve ser um número inteiro não negativo tal que $2^{k-m} \geq k+1$.

Como o número de ensaios não é completo, existe uma perda de informações e de precisão na análise dos resultados. Assim, as respostas obtidas não são valores dos efeitos isolados, mas sim mistura (“*confounded*”) deles (KHURI & CORNELL, 1987). Para analisar esta mistura de efeitos, BOX *et al* (1978) apresentaram o conceito de Resolução do Fracional: “um fracional de resolução R é aquele em que nenhum efeito de ordem p é misturado com qualquer outro efeito que possua ordem menor que $R-p$. Logo, para um fatorial de resolução IV (quatro) os efeitos principais (primeira ordem) não são confundidos com os de 2ª ordem, porém, os efeitos de 2ª ordem são confundidos com outros de segunda ordem”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO I: EFEITO DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DO SUPLEMENTO E DO RESÍDUO NO CRESCIMENTO MICELIAL AXIAL DE *Macrocybe titans* BEM COMO NA PRODUÇÃO GLUCOAMILASE

4.1.1 Análise do crescimento micelial axial de *Macrocybe titans*

Este ensaio, conforme detalhado no capítulo anterior, teve por objetivo verificar o efeito de dois substratos base com diferentes tipos e concentrações de suplementos no crescimento micelial axial (cinética e vigor micelial) do fungo *M. titans*, visando a seleção dos resíduos para posterior estudo das atividades enzimáticas de α -amilase e glucoamilase.

Na Figura 4.1 são mostradas imagens do micélio de *M. titans* colonizado nos substratos dos 9 tratamentos dos Experimentos A e B.

Consta-se que a colonização do micélio foi mais intensa nos tratamentos em que havia maior quantidade de farelo de soja. Isso pode ser explicado pelo fato deste suplemento apresentar maior concentração em nitrogênio (45%) comparativamente ao farelo de trigo e farelo de arroz. Observando a composição nutricional dos farelos utilizados (Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6), o farelo de soja contém um teor em proteínas quase duas vezes superior ao farelo de arroz e de trigo.

De acordo com Fernandes *et. al.* (2008) que estudou o efeito dos mesmos farelos no crescimento micelial radial de *Lentinula boryana*, o farelo de soja também mostrou maior eficiência como suplementação no crescimento do fungo. Depcke *et. al.* (2008) estudando o efeito da concentração do farelo de soja no crescimento micelial radial de *M. titans*, constatou aumento da velocidade de formação do micélio de 26% em relação ao meio não suplementado.

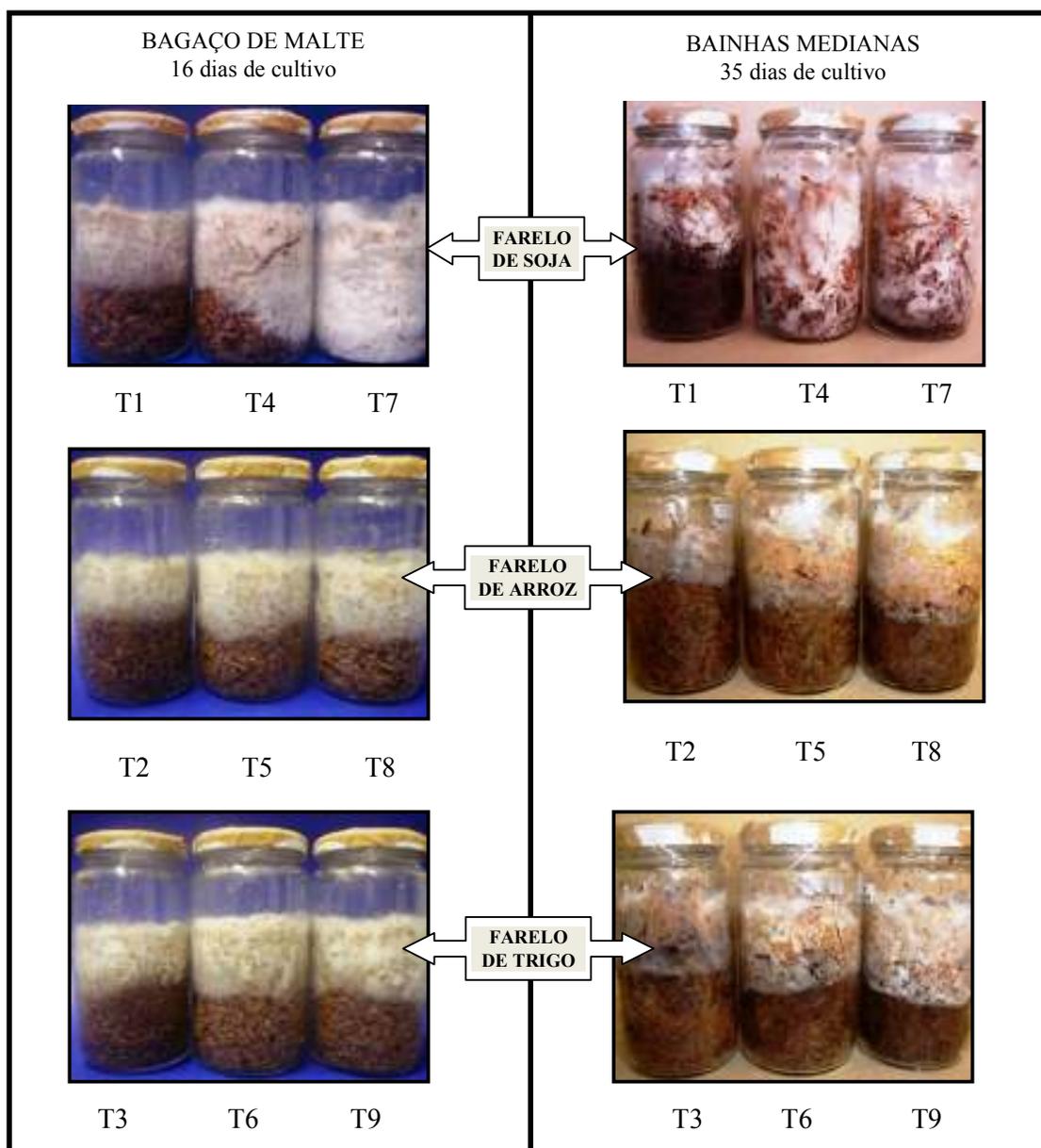


Figura 4.1: Imagens do crescimento micelial axial (cm) de *Macrocybe titans* nos substratos do Experimento A (resíduo de bainhas medianas) e B (resíduos de bagaço de malte) comparando concentrações diferentes de um mesmo suplemento

T1 = 1,5 g Farelo de soja **T4** = 4,0 g Farelo de soja **T7** = 7,0 g Farelo de soja
T2 = 1,5 g Farelo de arroz **T5** = 4,0 g Farelo de arroz **T8** = 7,0 g Farelo de arroz
T3 = 1,5 g Farelo de trigo **T6** = 4,0 g Farelo de trigo **T9** = 7,0 g Farelo de trigo

Quanto as características macroscópicas do micélio de *M. titans*, foi observado micélio mais denso nos tratamentos com bagaço de malte, bem como uma aderência mais intensa ao substrato.

Micélio de cor branca próprio de basidiomicetos foi observado em todos os tratamentos com odor fraco e indeterminado. O crescimento do micélio foi uniforme, sendo o vigor, ou seja, uma maior formação de hifas, verificado por meio de medida visual, proporcional ao teor de nitrogênio, já que os tratamentos que continham farelo mais rico em proteínas (farelo de soja), indicaram mais intensamente esta característica. Os tratamentos com farelo de arroz e o farelo de trigo apresentaram densidade semelhante entre si com leve superioridade sobre o de trigo. Tal fato pode ser decorrente do maior teor em proteínas do trigo e da transferência de oxigênio e dióxido de carbono, já que o meio com arroz era muito mais compacto.

O crescimento axial do micélio em substrato com bainhas medianas (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4) e no bagaço de malte (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7) ao longo do cultivo, mostrou uma representação linear nos gráficos cartesianos de X e Y das figuras citadas. Os valores do crescimento micelial axial médio diário de cada tratamento estão apresentados no Apêndice, nas Tabelas A1 e A2.

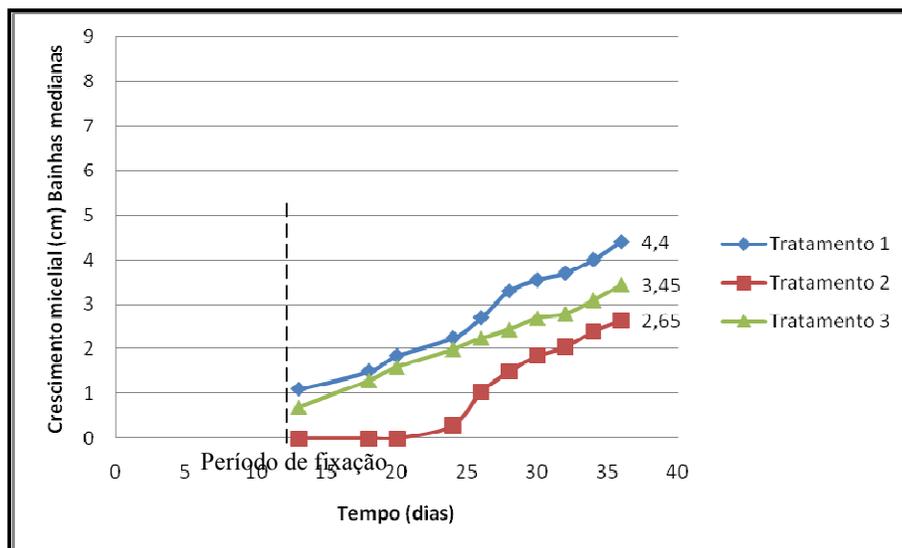


Figura 4.2: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T1; farelo de arroz: T2; farelo de trigo: T3) na concentração de 1,5g

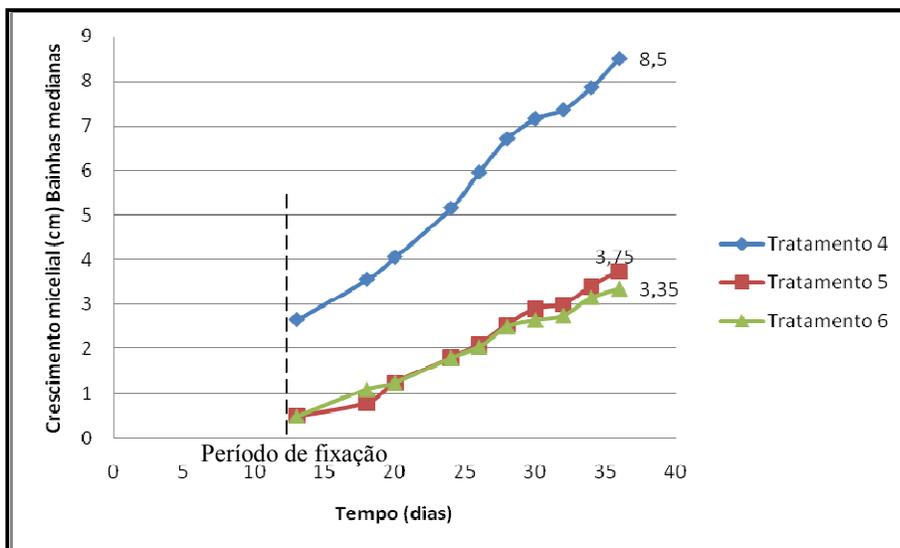


Figura 4.3: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T4; farelo de arroz: T5; farelo de trigo: T6) na concentração de 4,0 g

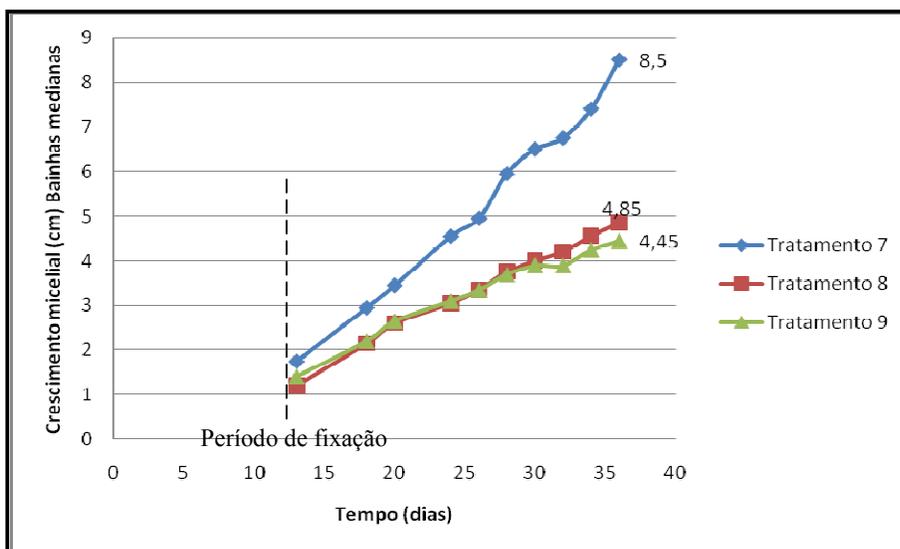


Figura 4.4: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bainhas medianas com os suplementos (farelo de soja: T7; farelo de arroz: T8; farelo de trigo: T9) na concentração de 7,0g

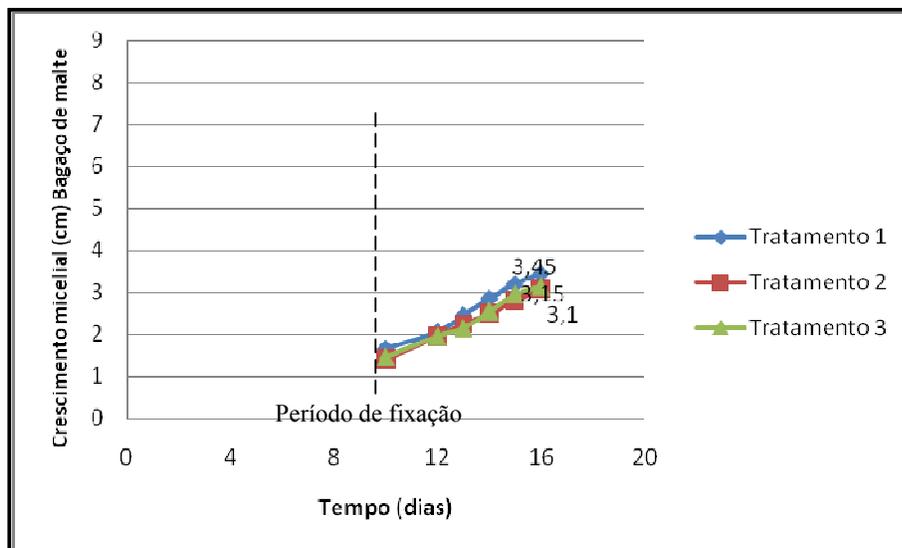


Figura 4.5: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T1; farelo de arroz: T2; farelo de trigo: T3) na concentração de 1,5g

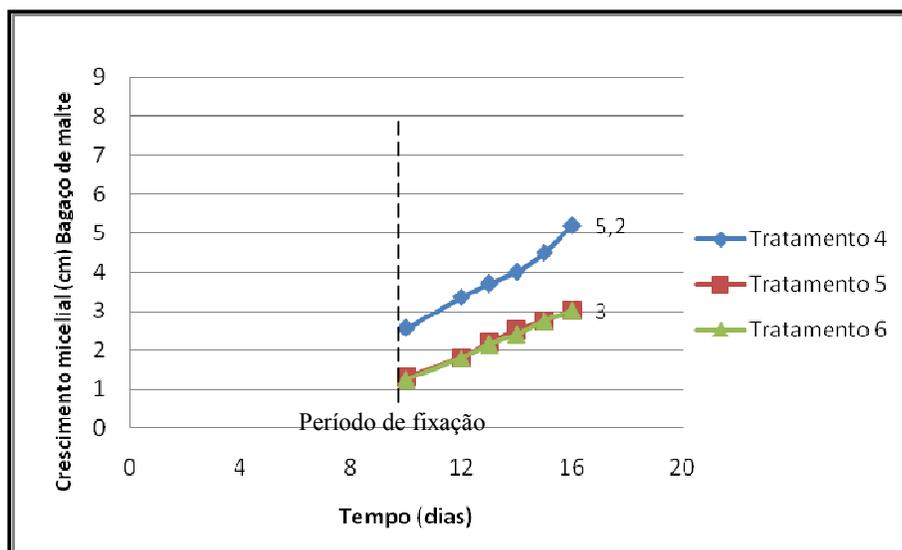


Figura 4.6: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T4; farelo de arroz: T5; farelo de trigo: T6) na concentração de 4,0g

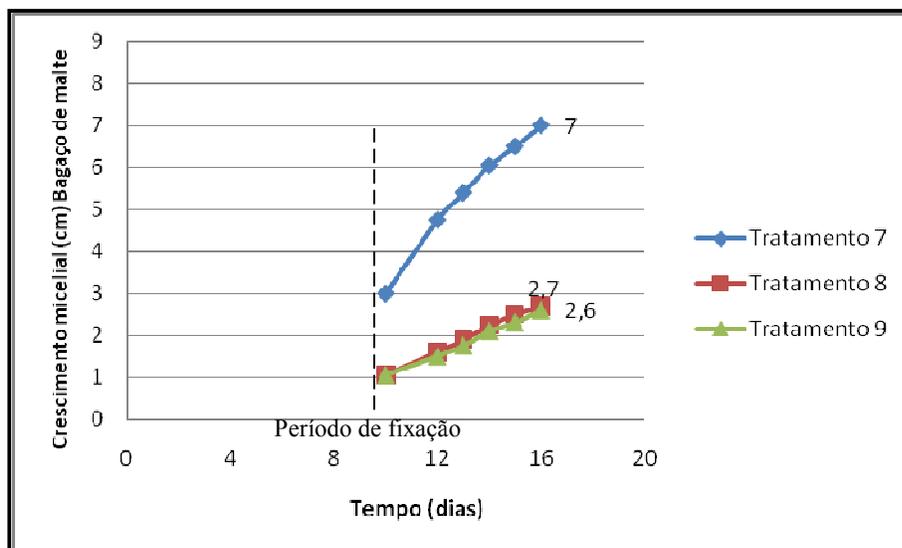


Figura 4.7: Crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* para os tratamentos com substrato base em bagaço de malte com os suplementos (farelo de soja: T7; farelo de arroz: T8; farelo de trigo: T9) na concentração de 7,0g

Pelas Figuras 4.2 a 4.7 pode-se constatar que os tratamentos suplementados com farelo de soja, nas concentrações de 4,0 g e 7,0 g, foram mais efetivos no crescimento micelial quando comparado aos demais tratamentos, promovendo o crescimento do micélio de *M. titans* em ambos os substratos, integralmente (até o final do frasco). No entanto, na quantidade de 1,5 g de farelo de soja a mesma eficiência não foi obtida.

O efeito dos tipos e concentrações de suplementos, e do tipo de substrato é melhor visualizado nos gráficos das Figuras 4.8 e 4.9.

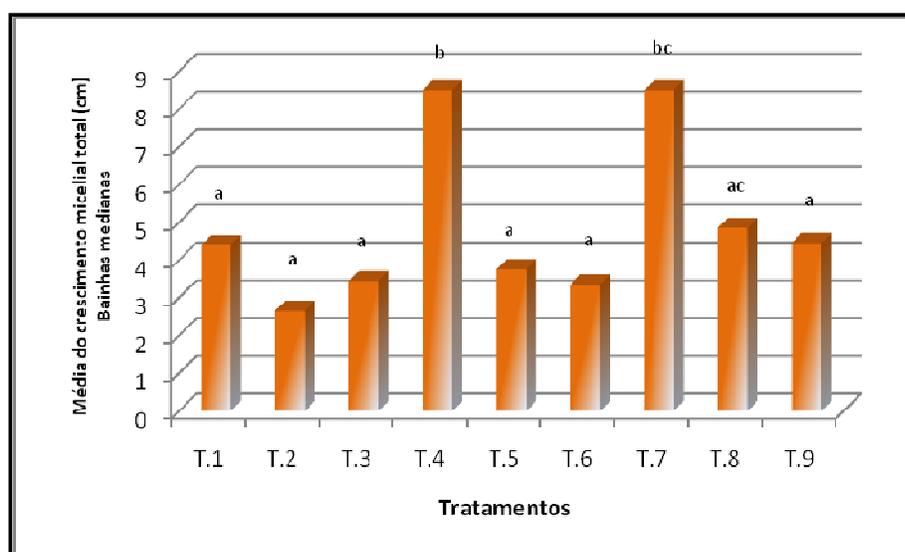


Figura 4.8: Valores do comprimento médio do micélio de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato a base de bainhas medianas tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY, onde letras diferentes representam diferença significativa ANOVA 1 Fator: (P=0,0000016) – 5 repetições

Analisando a Figura 4.8, constata-se que o farelo de soja promoveu maior crescimento micelial, comparativamente aos outros farelos. O mesmo foi observado quando empregado o substrato contendo bagaço de malte, Figura 4.9.

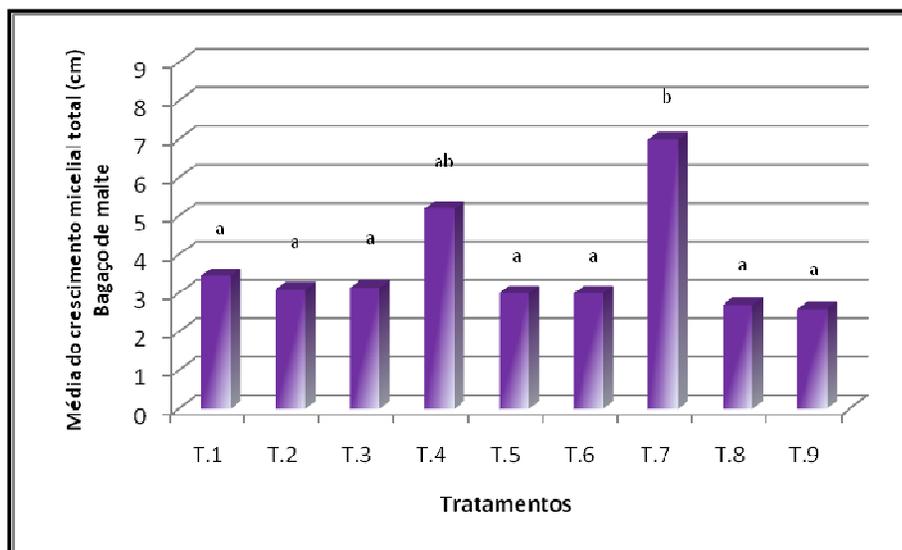


Figura 4.9: Valores do comprimento médio do micélio de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato a base de bagaço de malte tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY, onde letras diferentes representam diferença significativa. ANOVA 1 Fator: (P=0,0066) - Média de 5 repetições

Nas Figuras 4.8 e 4.9 também fica evidente que entre o farelo de trigo e o de arroz, não há diferença estatística entre a média do crescimento micelial total do fungo. Comparativamente aos substratos base, a cinética de crescimento observada entre os mesmos indica que o bagaço de malte foi superior as bainhas medianas (Figuras 4.10 e 4.11).

De acordo com as Figuras 4.10 e 4.11, que representam a velocidade de crescimento micelial axial, constatou-se que o bagaço de malte apresentou valores superiores em todos os tratamentos, com valores máximos de 0,35cm/dia frente aos 0,19cm/dia do substrato contendo bainhas. Os valores na íntegra da velocidade média encontram-se no Apêndice, Tabela A3.

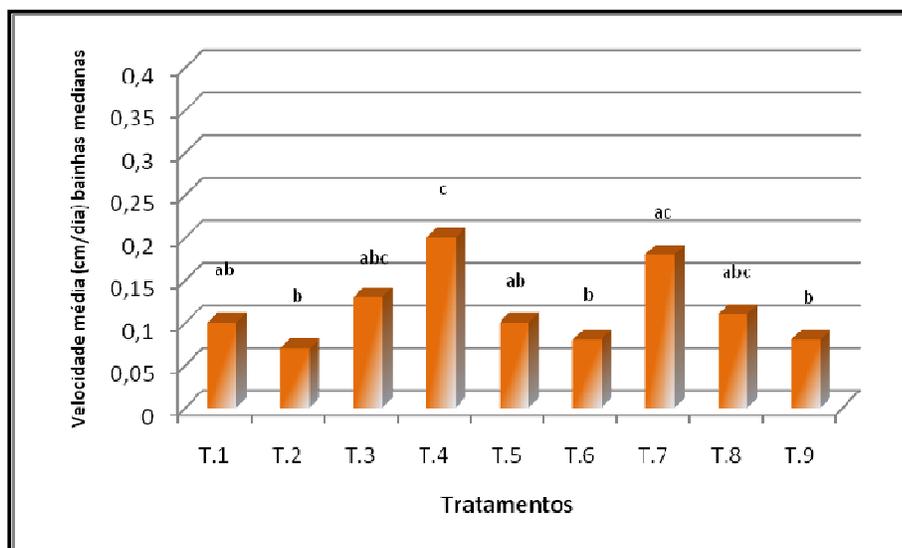


Figura 4.10: Valores da velocidade média do crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY, onde letras diferentes representam diferença significativa. ANOVA 1 Fator: (P=0,00084) - Média de 5 repetições

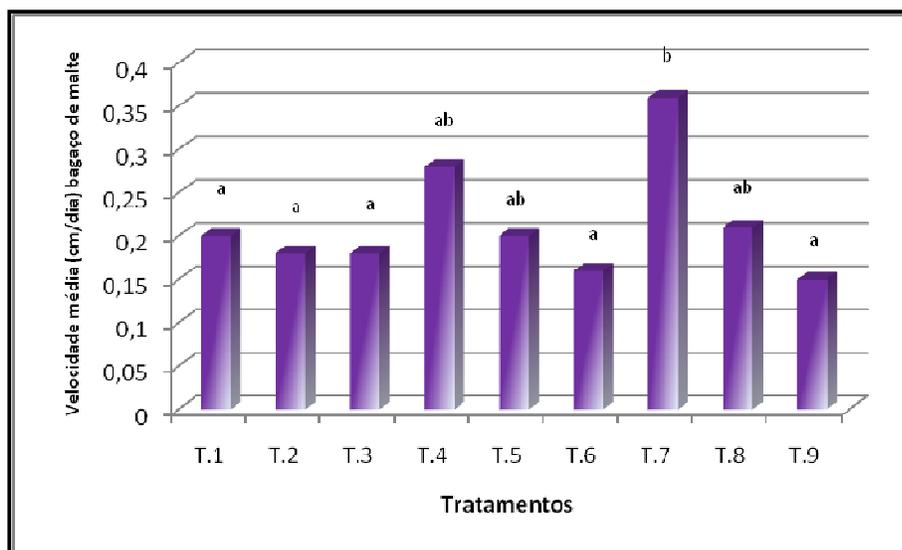


Figura 4.11: Valores da velocidade média do crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte tratados estatisticamente pelo teste ANOVA e de TUKEY, onde letras diferentes representam diferença significativa. ANOVA 1 Fator: (P=0,0060) – Média de 5 repetições

Saika (2008), relata que o fungo *M. titans* se desenvolve em meio compostado para produção de *Agaricus blazei*, na qual os nutrientes encontram-se em uma forma mais disponibilizada. Este fungo também apresenta características de fungo lignocelulotico, especialmente pela sua capacidade em produzir micélio em meio contendo serragem de eucalipto (DEPCKE *et. al.*, 2008). Estes mesmos autores estudaram o crescimento micelial

radial de *M. titans* em meio Batata Dextrose-Agar (BDA) com diferentes concentrações de glicose. Foi constatado que diferenças nos tratamentos sem glicose adicional e com adição de 5, 10, 20 e 40 g/L de glicose igualmente não foram significativas, com uma velocidade média de 0,29 cm/dia. Na concentração mais elevada (80 g/L), porém, o crescimento foi de 0,18 cm/dia, uma queda de aproximadamente 40%.

Comparando os resíduos bagaço de malte e bainhas, um fator que deve ser observado é a relação C:N dos substratos empregados. Segundo Harbs (2007) e Tavares (2008) as bainhas de palmeira-real-da-austrália apresentam C:N entre 70:1 a 87:1, enquanto o bagaço de malte apresenta uma relação C:N de 13,5:1. Segundo Tonini (2004), valores entre 25:1 a 55:1 proporcionam bom desempenho micelial e condições de produção de basidiomas para fungos lignocelulolíticos como *L. edodes*. A mistura de componentes na formulação do substrato contendo bagaço de malte com os demais suplementos, atingiu uma relação C:N em níveis que facilitaram a multiplicação celular do fungo e promoveram o aumento da cinética de produção das hifas.

Outra questão que deve ser mencionada é o fato de que no substrato com bainhas, o material lignocelulósico pode não se encontrar em uma forma facilmente assimilável pelo fungo, o que pode ter influenciado a cinética de crescimento. Como o perfil enzimático de *M. titans* é desconhecido, tal afirmação necessita de maior aprofundamento.

A importância do nitrogênio no crescimento micelial foi observada por Kim *et. al.* (2002), que utilizaram fontes inorgânicas e orgânicas de nitrogênio e concluíram serem as últimas, melhores pra incrementar a produção de biomassa.

Justifica-se a importância da suplementação com fonte de nitrogênio no meio de cultura, já que este elemento atua na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e de algumas vitaminas pelo fungo. No entanto, altas concentrações de nitrogênio inibem a síntese de enzimas lignolíticas. Segundo Kamra & Zadrazi (1988) citados por Mazieiro (1990), o nitrogênio em elevada concentração, reprime a degradação da lignina, retardando ou até inibindo completamente o desenvolvimento do fungo. Mazieiro (1990) relata que substratos ricos em nitrogênio não devem ser utilizados isoladamente para o cultivo de cogumelos, devido ao fato de não proporcionarem uma total colonização do substrato e não permitirem a produção de basidiomas.

De acordo com Silva, Machuca e Milagres (2005), analisando a concentração de suplementos em estudo sobre produção de enzimas constataram que o tipo e a concentração dos suplementos nutricionais influenciam a expressão de enzimas lignolíticas e conseqüente disponibilidade de nutrientes para o crescimento de *L. edodes*.

Israel (2005), verificou que as menores médias do comprimento micelial total do fungo *P. tricholoma* e do fungo *P. tenuiculous* foram nos tratamentos com fonte de nitrogênio, sendo as maiores médias observadas nos tratamentos com concentrações de 3g de farelo de soja. Essa concentração foi próxima ao tratamento 4 desse experimento, com uma concentração de 4g de farelo de soja o que representa em ambos os experimentos, meio com aproximadamente 10% de farelo de soja.

Tonini (2004) em estudos com *L. edodes*, observou que a velocidade de miceliação diminui à medida que é aumentada a concentração de nitrogênio, sendo utilizado em seu trabalho o farelo de soja como fonte do mesmo.

Silva e Milagres, (2002) também estudaram a velocidade de miceliação de *L. edodes* em farelo de soja disperso em meio contendo bagaço de mandioca. Os autores verificaram que a densidade micelial por proporcional à concentração de nitrogênio, o mesmo não aconteceu com a velocidade de crescimento micelial que foi inversamente proporcional. Segundo esses autores, altas concentrações de nitrogênio limitam a degradação da lignina presente no substrato.

Bittencourt (2007), verificou a velocidade média de crescimento micelial radial do fungo *L. edodes*, obtendo também valores semelhantes a esse experimento com velocidades médias entre 0,17cm/dia a 0,29cm/dia, nos tratamentos com resíduos de bainhas medianas e estipe da palmeira-real-da-austrália.

No trabalho de Israel (2005), foi constatado a viabilidade do resíduo bainhas medianas ser uma fonte viável para o cultivo dos fungos basidiomicetos *P. tenuiculos* e *P. tricholoma*.

Os resultados deste trabalho comparados ao de Israel (2005), que avaliou o cultivo dos fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*, em bainhas de palmito como substrato base, mostraram velocidades inferiores frente as obtidas pela autora (velocidades médias de 0,45 cm/dia a 0,60 cm/dia para *P. tricholoma* e 0,20 cm/dia a 0,35 cm/dia para *P. tenuiculus*).

Bittencourt (2007), apresentou resultados semelhantes quanto a velocidade média do crescimento micelial de *L. edodes*, na qual a autora trabalhou com os resíduos de palmeira-real-da-austrália. Os valores obtidos ficaram entre 0,20 cm/dia a 0,39 cm/dia.

Constatou-se que, da mesma forma que os tratamentos contendo bainhas medianas, quanto ao farelo de soja como fonte de nitrogênio, a concentração de 4 g é suficiente, uma vez que proporcionou um crescimento similar com a concentração de 7 g.

Relatos indicam que a adição de suplementos naturais melhora a produção de enzimas pelo *L. edodes*, e por conseqüência, o seu crescimento micelial, sendo o extrato de malte o que promoveu o melhor crescimento (HATVANI; MÉCS, 2002).

O fungo *M. titans*, nos tratamentos contendo bainhas medianas, começou a fixar-se nos substratos, após 13 dias de cultivo, atingindo o preenchimento integral do resíduo com 36 dias de cultivo, para os tratamentos T4 e o T7, contendo farelo de soja. Já no caso dos tratamentos contendo bagaço de malte, o fungo começou a se fixar após 10 dias de cultivo, atingindo total colonização do substrato ao final com 16 dias de cultivo, no tratamento T7, seguido do T4. Os demais tratamentos contendo bagaço de malte também se desenvolveram com superioridade frente aos tratamentos com bainhas medianas.

4.1.2 Análise de parâmetros físico-químicos durante o crescimento micelial axial

- Variação dos valores de pH

No decorrer do estudo do crescimento micelial axial do fungo *M. titans*, foram realizados testes para quantificação dos valores de pH dos meios de cultivo estudados. Foram realizadas análises de cada tratamento, no início do cultivo e no término, visando verificar a variação do mesmo no meio durante o crescimento do fungo. Vale lembrar que é importante realizar a determinação do pH dos meios de cultivo para verificar com isso a acidez, neutralidade ou alcalinidade do meio onde o fungo é cultivado.

O pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio em alguns casos elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA *et. al*, 2003).

Nas Figuras 4.12 e 4.13 são apresentados os valores de pH dos tratamentos contendo bainhas medianas e bagaço de malte como substrato base.

Nos tratamentos contendo bainhas medianas, os valores de pH iniciaram-se entre 4,0 e 4,5, e no final do experimento encontravam-se entre 4,5 e 5,5, o que indicou um aumento do pH durante o período de cultivo, podendo chegar até 23% do pH inicial. Esse aumento ocorreu em todos os tratamentos com bainhas medianas de palmeira. Os valores médios de pH encontram-se no Apêndice, Tabela A4.

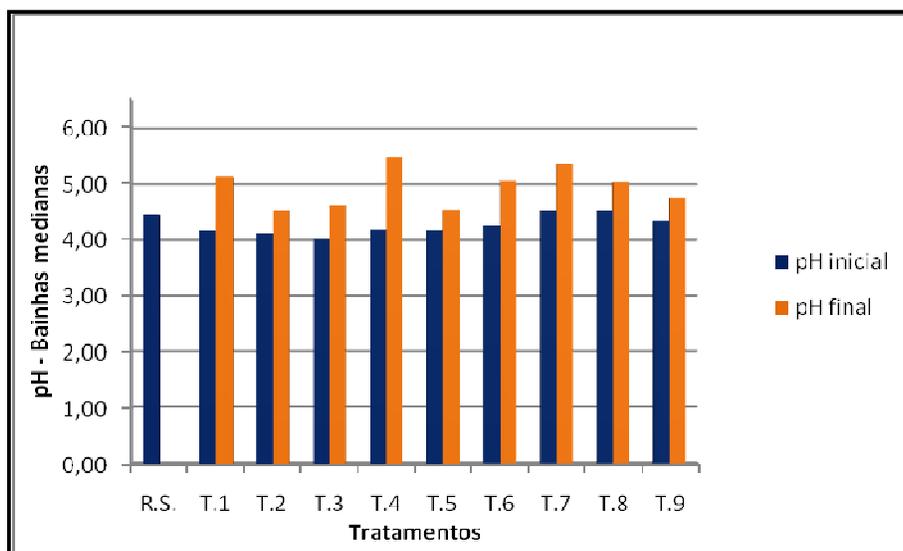


Figura 4.12: Variação do pH (inicial e final) do cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas. (R.S. = resíduo seco)

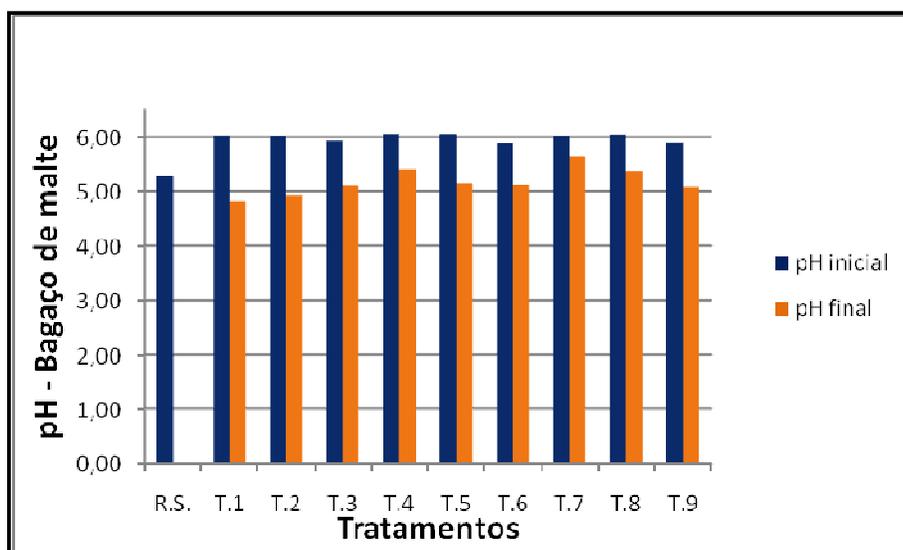


Figura 4.13: Variação do pH (inicial e final) do cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte. (R.S. = resíduo seco)

Nos tratamentos contendo bagaço de malte como substrato base, os valores de pH iniciaram-se entre 5,88 e 6,05, e no final do experimento encontravam-se entre 4,80 e 5,65, o que indicou uma diminuição do pH durante o período de cultivo. Essa diminuição ocorreu em todos os tratamentos. Os valores médios de pH encontram-se no Apêndice, Tabela A4.

Os resultados do pH indicam que o fungo *M. titans*, independente do tipo de substrato base, concentração e tipo de suplemento, também apresenta capacidade auto-reguladora do pH, para valores próximos de 5,0, a semelhança de outros basidiomicetos.

Segundo Santos (2000), o crescimento micelial implica na secreção de exoenzimas, polissacarídeos, antibióticos e ácidos orgânicos, os quais reduzem o pH.

Conforme Zadrazil (1997) citado por Santos (2000), algumas espécies de fungos basidiomicetos possuem uma característica auto-reguladora de pH do substrato, ou seja, a tendência é de que se estabilize no valor de pH ótimo, ou seja, o pH adequado para seu crescimento, independente do valor de pH inicial, isso ocorre dependendo do substrato e do microrganismo. Este fato também foi constatado em estudo com *Polyporus tricoloma*, em estudo para produção de antibiótico (VIEIRA, *et. al.*, 2008).

Depcke *et. al.* (2008) avaliaram o efeitos dos valores de pH inicial (5, 6, 7, e 8) no crescimento micelial radial de *M. titans* em meio BDA. Segundo os autores o pH inicial não influenciou o crescimento, tendo a velocidade média de crescimento micelial radial ficado em torno de 0,35 cm/dia.

É importante salientar que, de acordo com Barbosa *et. al.* (1997) os fungos de podridão branca apresentam melhor crescimento em pH ácido em torno de 4,0 e 5,0.

Ainda quanto ao pH e atividade enzimática, Wallis *et al.* (2001) estudando o efeito do pH na produção de glucoamilase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa, concluíram também que o pH regula a produção de glucoamilase.

Esta relação também foi observada por Gunasekaran *et al.* (2005), descrito por Israel (2005) que buscavam otimizar a produção de xilanase em cultivo semi-sólido constituído por farelo de trigo. Controlando o pH, observaram que a atividade de xilanase aumentou quando se dá a queda do pH, e através deste controle, conseguiram inclusive, diminuir consideravelmente a atividade de proteases do meio sólido.

Hassegawa (1998) cita em seu experimento, que a redução do pH do meio de cultivo por *L. edodes* é consequência da produção de diversos ácidos orgânicos em meio líquido, como ácido acético e succínico produzidos pelo fungo. O aumento do pH no meio de caldo de milho macerado resultou da liberação de amônia pela desaminação dos aminoácidos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Spier (2005), concluiu que o melhor pH para a produção de α -amilase e glucoamilase para o fungo *Aspergillus niger* foi entre 4,0 e 6,0, valores esses similares ao deste estudo com *M. titans*.

Outro estudo que comprova o pH ótimo para a produção de α -amilase e glucoamilase foi de Silva e Peralta (2000), que obteve como 5,0 o pH ótimo para a produção das enzimas pelo fungo de solo *Aspergillus fumigatus*.

- Variação da Umidade e Atividade de água (A.a)

No decorrer do estudo do crescimento micelial axial do fungo *M. titans*, foram quantificados o teor de umidade e a atividade de água dos meios de cultivo testados. Conforme mencionado no capítulo anterior, foram realizadas análises em cada tratamento, no início e no término do cultivo, visando verificar a variação dos mesmos durante o crescimento do fungo.

Os valores e a variação de umidade em função do tempo nos cultivos são apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, onde observa-se que a mesma manteve-se em torno de 70%, sendo que no final dos tratamentos, ocorreu uma perda de umidade de aproximadamente 4%. Bano *et. al.* (1987), explicam que teores de umidade acima de 80% no substrato, poderiam levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica [...].

Zadrazil & Kurtzman (1982), citado por Israel (2005), recomendam um teor inicial de umidade do substrato entre 65% e 75%, uma vez que a água é essencial para a colonização do substrato, assim como para aumentar e agilizar a degradação da lignina.

Tabela 4.1: Percentual de umidade inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bainhas medianas

Substrato base: bainhas medianas		
Tratamentos	Umidade Inicial (%)	Umidade Final (%)
R.S.	9,59	-
T.1	76,67	73,49
T.2	75,29	69,00
T.3	75,03	71,69
T.4	76,42	76,65
T.5	77,63	70,59
T.6	73,45	73,62
T.7	75,20	74,22
T.8	75,19	74,35
T.9	73,57	70,69

Legenda:

T1 = 1,5 g Farelo de soja **T4** = 4,0 g Farelo de soja **T7** = 7,0 g Farelo de soja
T2 = 1,5 g Farelo de arroz **T5** = 4,0 g Farelo de arroz **T8** = 7,0 g Farelo de arroz
T3 = 1,5 g Farelo de trigo **T6** = 4,0 g Farelo de trigo **T9** = 7,0 g Farelo de trigo

Tabela 4.2: Percentual de Umidade inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bagaço de malte

Substrato base: bainhas medianas		
Tratamentos	Umidade Inicial (%)	Umidade Final
R.S.	12,63	-
T.1	71,92	68,87
T.2	70,17	67,49
T.3	69,48	67,44
T.4	68,07	64,80
T.5	71,90	70,76
T.6	69,04	67,85
T.7	68,34	67,02
T.8	68,43	71,00
T.9	70,35	70,75

Legenda:

T1 = 1,5 g Farelo de soja **T4** = 4,0 g Farelo de soja **T7** = 7,0 g Farelo de soja
T2 = 1,5 g Farelo de arroz **T5** = 4,0 g Farelo de arroz **T8** = 7,0 g Farelo de arroz
T3 = 1,5 g Farelo de trigo **T6** = 4,0 g Farelo de trigo **T9** = 7,0 g Farelo de trigo

Um alto teor de umidade diminui a porosidade, a difusão de oxigênio, a eliminação de dióxido de carbono e aumenta o risco de contaminação por bactérias. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento (LONSANE *et. al.*, 1985, APUD DALSENTER, 2000). Frente a isso, é certo que a umidade é um fator relevante no cultivo de fungos, onde a umidade deve ser sempre controlada para se ter uma otimização do processo em fermentação sólida.

No que se refere à umidade, O trabalho apresentado por Silva (2006), que utilizou o bagaço de mandioca juntamente com o farelo de trigo para a produção de glucoamilase, a umidade apresentou um perfil de variação ao longo do tempo, mostrando leve decréscimo, que pode estar diretamente associado ao início do cultivo, quando os microrganismos estão adaptando-se ao meio sólido e as condições de cultivo, gerando, conseqüentemente, calor para o meio. Ao longo do cultivo a autora constatou que quando a produção chegou a 14U/gms, a umidade sofreu uma queda, não representativa ao ponto de afetar o cultivo, e na seqüência mantém-se estável até o final.

Quanto a atividade de água (A.a.) dos tratamentos contendo bainhas medianas como substrato base, os valores estiveram entre 0,996 e 1,000 em todos os tratamentos, sendo a atividade mais baixa no final dos tratamentos (0,993) conforme Apêndice, Tabela A5. O valor da A.a. do resíduo seco das bainhas medianas foi de 0,743.

Os valores de A.a. dos tratamentos contendo bagaço de malte como substrato base foram de 1,000 em todos os tratamentos, sendo a atividade mais baixa no final dos mesmos ficando entre 0,991 e 0,999 conforme Apêndice. O valor da A.a. do resíduo seco do bagaço de malte foi de 0,44.

A temperatura externa do ar no momento da medição da mesma estava em torno de 25°C.

De acordo com Boletim Técnico Informativo da BRASEQ – Brasileira de Equipamentos Ltda (2005), a presença de água nos produtos químicos ou biológicos ocorre como atividade de água e água ligada, resultando em conteúdo total de água (umidade). A água contida no produto encontra-se de 2 formas:

- a) água ligada: a água está intimamente ligada às moléculas constituintes do produto, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação.
- b) atividade de água: a água está disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas, tornando-se a principal responsável pela deterioração do

produto. Esta água pode ser medida e através do seu valor pode-se determinar a suscetibilidade do produto a degradação.

Ainda de acordo com o boletim, a velocidade das reações químicas desejáveis ou não, dependem da mobilidade e concentração dos compostos e enzimas envolvidos, que são conferidas pela quantidade de atividade de água.

O comportamento microbiano frente a A.a. é extremamente variável, sendo que as bactérias são mais exigentes, quanto à disponibilidade de água do que os bolores e leveduras.

Os substratos com A.a. inferior a 0,600 estão assegurados quanto a contaminação microbiana. A partir de A.a. 0,650 começa a ocorrer a proliferação de microrganismos específico, sendo que até A.a. 0,750, somente alguns tipos microbianos tais como: bactérias halofílicas, leveduras osmofílicas e bolores xerofílicos podem se desenvolver (Boletim Técnico Informativo da BRASEQ, 2005).

O conhecimento do teor da A.a. de um substrato em FES é essencial para o acompanhamento da sua integridade, preservação e manutenção do tempo de processo.

- Cinzas (minerais totais)

Segundo Park *et. al.* (2001), citado por Tonini (2004), íons minerais são frequentemente reconhecidos como eficientes elementos para o crescimento micelial e produção de metabólitos secundários em fungos.

Portanto, foram quantificados os valores do percentual em cinzas (minerais totais) nos diferentes tratamentos no instante inicial e final do crescimento micelial axial do fungo *M. titans*. Os percentuais encontrados estão representados nas Figuras 4.14 e 4.15 abaixo e na íntegra, no Apêndice, Tabela A6.

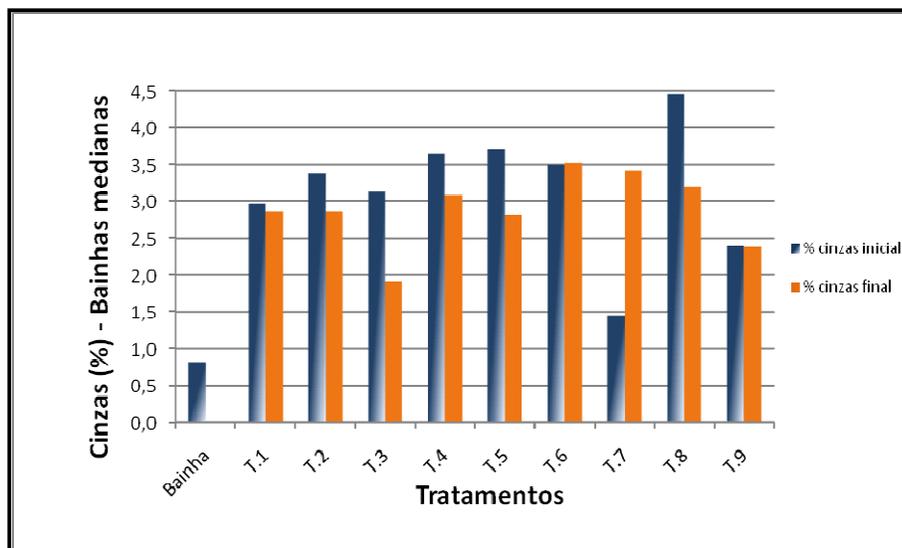


Figura 4.14: Variação do percentual de cinzas (inicial e final) do cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bainhas medianas

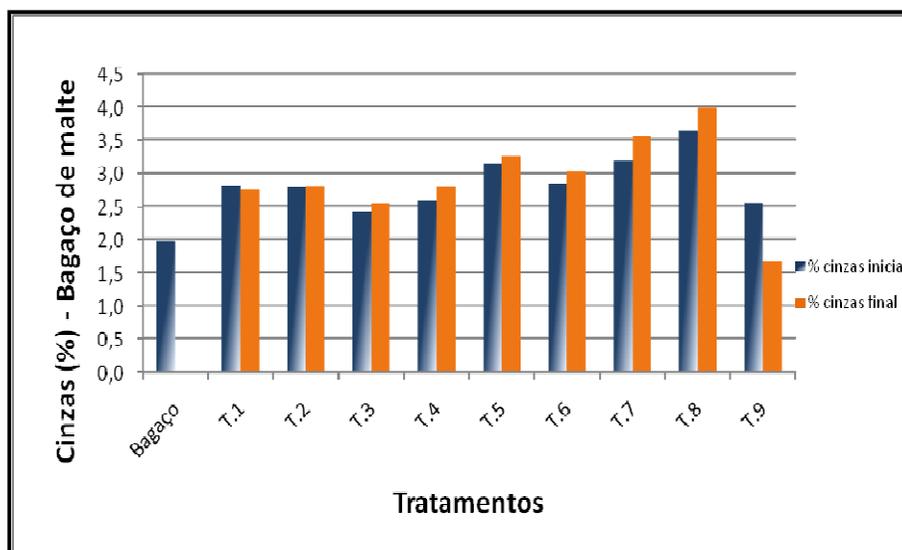


Figura 4.15: Variação do percentual de cinzas (inicial e final) do cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato base de bagaço de malte

Os resíduos por incineração ou Cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550-570°C. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Constata-se nas Figuras 4.14 e 4.15 que as bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália apresentam um teor em cinzas inferior (0,81g/100g) ao bagaço de malte

(1,92g/100g). Os valores de cinzas das bainhas diferem dos dados de Vieira (2006) que obteve valores próximos de 4g/100g (Tabela 3.1).

Este método não atendeu ao esperado neste estudo, pois esperava-se investigar a variação do teor de minerais dos diferentes tratamentos e seu efeito sobre o crescimento vegetativo e de produção de enzimas, sendo que a referida análise não possibilitou verificar com precisão o consumo de minerais totais para o crescimento do fungo, sendo necessário um estudo específico de diferentes minerais encontrados nos meios, verificando com isso, qual desses estariam influenciando no crescimento do mesmo.

Na Tabela 4.3, apresenta-se as quantidades de minerais expressas em mg/100g das bainhas medianas e do bagaço de malte, sendo o maior de cálcio, seguido do magnésio.

Tabela 4.3: Conteúdo dos minerais em mg/100g das bainhas medianas de palmeira-real-da-austrália e do bagaço de malte

Composição	Bainhas medianas (mg/100g)	Bagaço de malte (mg/100g)
Ca	892	69
Mg	850	34
Fe	6,94	0,483
Zn	3,11	0,63
Mn	5,19	0,84
Na	3,87	48
P	31,5	115
K	695	19

Fonte: Adaptado de Vieira, 2006 e NRC, 1988.

- Variação do teor de proteínas totais e atividade enzimática

Foi realizado no decorrer desse ensaio a determinação de proteínas totais dos diferentes tratamentos, visando analisar a atividade específica da enzima glucoamilase produzida nos meios de cultivo.

Os valores, em mg/g, estão apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4: Valores de Proteínas Totais expressos em mg/g, inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bainhas medianas

Tratamentos	Proteína (mg/mL)	
	INICIAL	FINAL
T.1	44,75	95,11
T.2	21,73	33,23
T.3	17,40	32,05
T.4	31,31	71,19
T.5	33,50	50,16
T.6	27,58	48,75
T.7	47,07	122,02
T.8	32,96	92,96
T.9	25,90	95,55
Bainhas	12,73	

Legenda:

T1 = 1,5 g Farelo de soja **T4** = 4,0 g Farelo de soja **T7** = 7,0 g Farelo de soja
T2 = 1,5 g Farelo de arroz **T5** = 4,0 g Farelo de arroz **T8** = 7,0 g Farelo de arroz
T3 = 1,5 g Farelo de trigo **T6** = 4,0 g Farelo de trigo **T9** = 7,0 g Farelo de trigo

Tabela 4.5: Valores de Proteínas Totais expressos em mg/g, inicial e final dos meios contendo como substrato base o resíduo bagaço de malte

Tratamentos	Proteína (mg/mL)	
	INICIAL	FINAL
T.1	182,73	152,53
T.2	150,78	110,37
T.3	160,76	140,13
T.4	197,79	196,24
T.5	151,19	122,46
T.6	161,90	155,89
T.7	163,85	291,86
T.8	178,57	101,06
T.9	179,07	110,10
Bagaço	94,07	

Legenda:

T1 = 1,5 g Farelo de soja **T4** = 4,0 g Farelo de soja **T7** = 7,0 g Farelo de soja
T2 = 1,5 g Farelo de arroz **T5** = 4,0 g Farelo de arroz **T8** = 7,0 g Farelo de arroz
T3 = 1,5 g Farelo de trigo **T6** = 4,0 g Farelo de trigo **T9** = 7,0 g Farelo de trigo

O resíduo de bainhas medianas mostrou um valor em proteínas totais de aproximadamente 90 % menor que o valor obtido para o bagaço de malte. Com a adição dos suplementos para formação dos 9 tratamentos, os tratamentos com farelo de soja, como era esperado, apresentaram maior concentração em proteínas, especialmente nos tratamentos com bainhas.

Ao final do cultivo, obteve-se aumento das proteínas totais, nos tratamentos com bainhas medianas. Tal comportamento não foi obtido nos tratamentos com bagaço de malte, onde, no final do cultivo, observou-se diminuição no teor de proteínas totais, isto pode ser um indicativo de maior consumo das proteínas pelo fungo, justificando assim, seu maior crescimento nesse resíduo.

Com o objetivo de verificar qual tratamento apresentou maior atividade enzimática foi determinada a produção da enzima glucoamilase pelo fungo *M. titans*, ao final do experimento. Os valores obtidos encontram-se no Apêndice, Tabela A7 e estão representados nas Figuras 4.16 e 4.17.

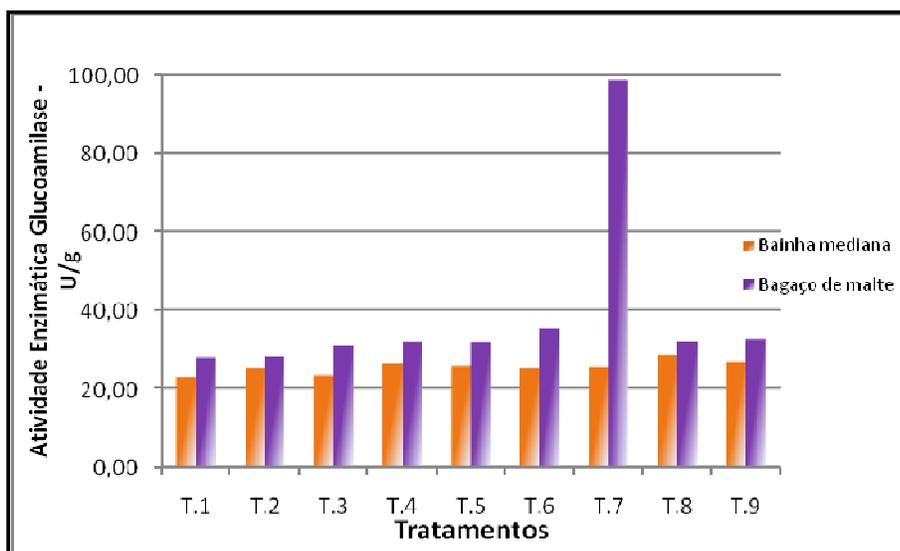


Figura 4.16: Atividade Enzimática de Glucoamilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato bainhas medianas e bagaço de malte

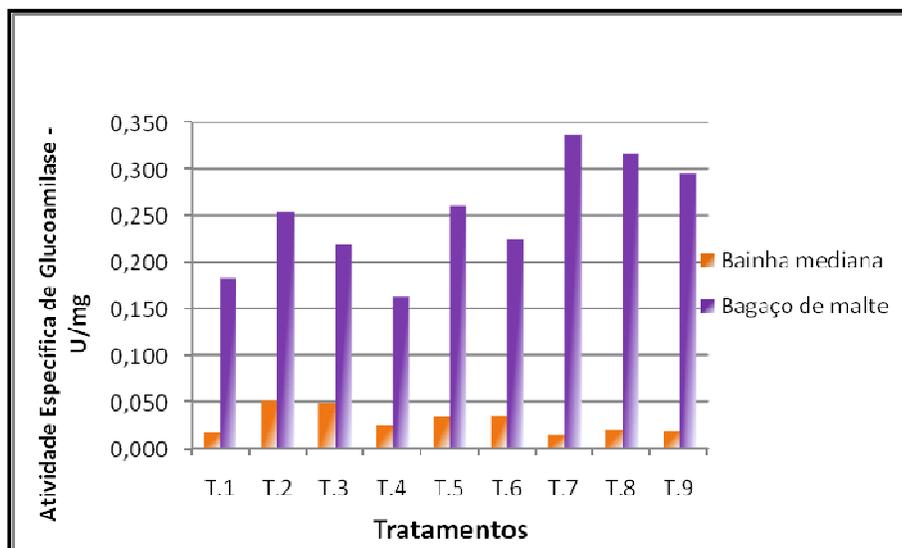


Figura 4.17: Atividade Específica de Glucoamilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato bainhas medianas e bagaço de malte

Observou-se maior atividade enzimática em todos os tratamentos com o resíduo bagaço de malte, especialmente para aqueles em que a concentração dos farelos foi de 7g (T7, T8, T9). Embora o tratamento T4 que continha farelo de soja não tenha mostrado atividade específica superior, este foi selecionado para o ensaio II, juntamente com o T7, por ter apresentado maior crescimento micelial. A alta atividade enzimática no tratamento T7 pode estar diretamente ligada a um erro experimental, uma vez que se apontou muito superior aos demais tratamentos em estudo.

4.2 ENSAIO II – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE EM SUBSTRATO A BASE DE BAGAÇO DE MALTE

Neste ensaio foi analisado, comparativamente, os dois tratamentos selecionados no ensaio I, tendo como base os melhores substratos, em relação ao crescimento micelial axial do fungo *Macrocybe titans*. Os tratamentos T4 e T7 com substrato a base de resíduo com bagaço de malte, suplementados com 4,0 g e 7,0 g de farelo de soja, respectivamente, foram os selecionados. O objetivo desse ensaio, foi verificar em escala temporal, a produção das enzimas α -amilase e glucoamilase pelo fungo.

A Figura 4.18, representa o novo cultivo realizado com os melhores tratamentos selecionados.

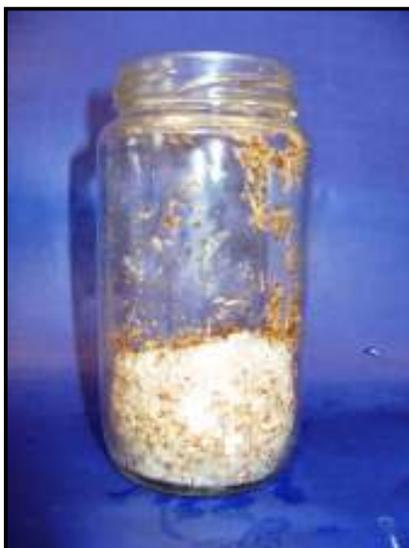


Figura 4.18: Fotografia do sistema de cultivo de *Macrocybe titans* em bagaço de malte (Tratamento 4) para o Ensaio II.

Fonte: A autora

Optou-se por reduzir a massa de substrato no frasco para que houvesse menor área a ser preenchida e com isso menor tempo de colonização, comparativamente ao ensaio I (Figura 4.1). No entanto, observou-se redução da velocidade de formação das hifas. No Ensaio I foram necessários 7 dias para o preenchimento do substrato após sua fixação (Apêndice, Tabela A2) com o dobro de material. Já neste experimento (Ensaio II) foram necessários 10 dias para a completa colonização após sua fixação.

Tal fato nos leva a questionar qual é a necessidade de oxigênio para o crescimento micelial de *M. titans*. Considerando a produção de basidiomas deste fungo, Depcke (2009) constatou que os primórdios apresentaram melhor desenvolvimento em meio com menor disponibilidade de oxigênio e maior concentração de CO₂.

Os dados de atividade enzimática e atividade específica de α -amilase dos tratamentos T4 e T7 estão representados através de uma linha de tendência nas Figuras 4.19 e 4.20, respectivamente, e os valores encontram-se no Apêndice, Tabela A8.

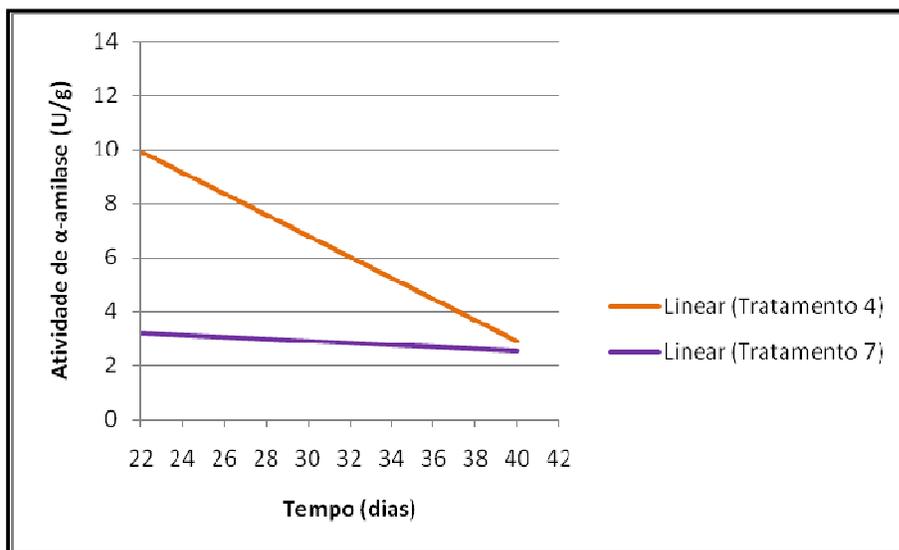


Figura 4.19: Atividade Enzimática de α -amilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans*

A atividade de α -amilase apresentou um ponto de pico no tratamento T7 no 28º dia de cultivo, tendo uma redução dos valores até o término do mesmo. Resultado similar a este comportamento foi observado por Israel (2005) em trabalho com xilanase, onde nos cultivos de *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*, os mesmos levaram a obtenção das maiores atividades enzimáticas no início dos experimentos, reduzindo, em todos os tratamentos, no final do cultivo. No trabalho de Dare, Clark e Chu-Chou. (1998), com *L. edodes*, que é um fungo de podridão branca, a produção de xilanases é superior no início da fase vegetativa, ou seja, no início do cultivo.

Outro fato que justifica é que as enzimas são de fundamental importância para o crescimento micelial, pois são responsáveis pela despolimerização da celulose, hemicelulose e do amido. Os açúcares formadores destes polímeros constituem uma fonte de carbono necessária para a atividade metabólica (BUSWELL, CAI E CHANG, 1995). *M. titans* é fungo de podridão marrom (fungo que utiliza a celulose e outros componentes afins da parede da célula e deixa a lignina em condições praticamente idênticas), e mesmo assim há necessidade do fornecimento de material de mais fácil assimilação para promover melhor crescimento micelial. Tanto que fungos de podridão marrom são cultivados preferentemente em material já compostado.

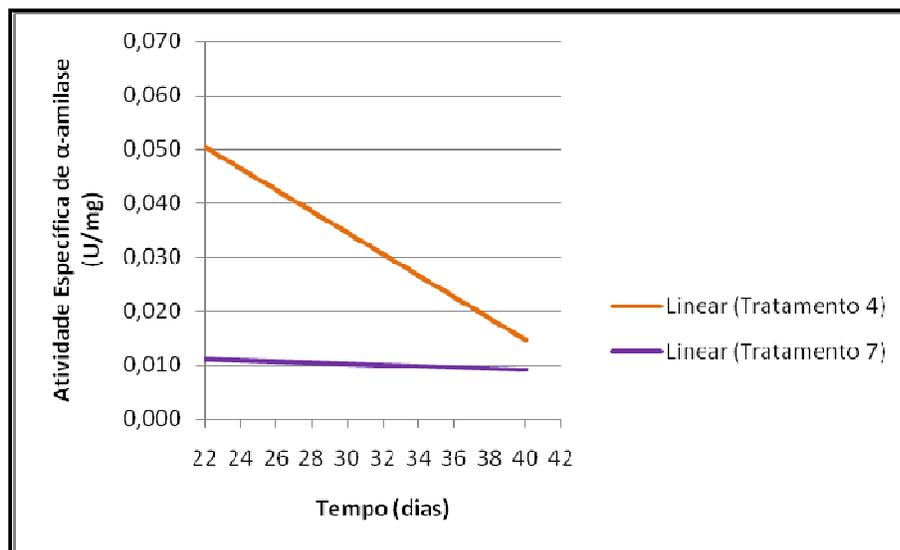


Figura 4.20: Atividade Específica de α -amilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo *Macrocybe titans*

Quanto a queda da atividade enzimática de α -amilase, esta pode estar ligado a produção de proteases, uma vez que essa enzima converte proteínas em aminoácidos.

Analisando os dados de atividade específica de α -amilase entre os tratamentos do Ensaio II, constata-se que em meio com maior concentração de nitrogênio (T7), a atividade é inferior quando comparada ao meio menos concentrado (T4). Concentrações mais elevadas em nitrogênio inibem a síntese de enzimas, portanto, no T7, o fungo pode ter utilizado o nitrogênio inicialmente para multiplicação das hifas em detrimento da síntese de enzimas para degradação dos polímeros do substrato.

Os dados de atividade enzimática e atividade específica de glucoamilase dos tratamentos T4 e T7 estão representados através de uma linha de tendência nas Figuras 4.21 e 4.22, respectivamente, e os valores encontram-se no Apêndice, Tabela A9.

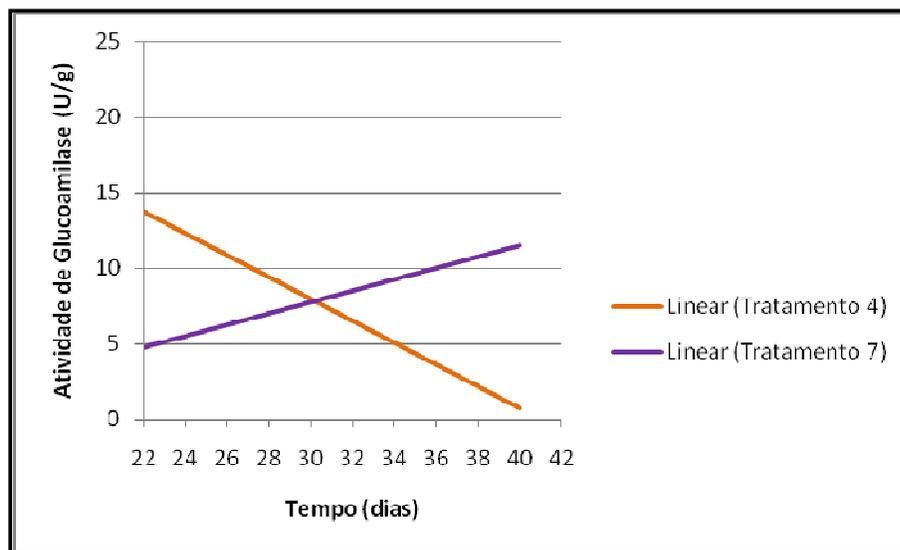


Figura 4.21: Atividade Enzimática de glucoamilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans*

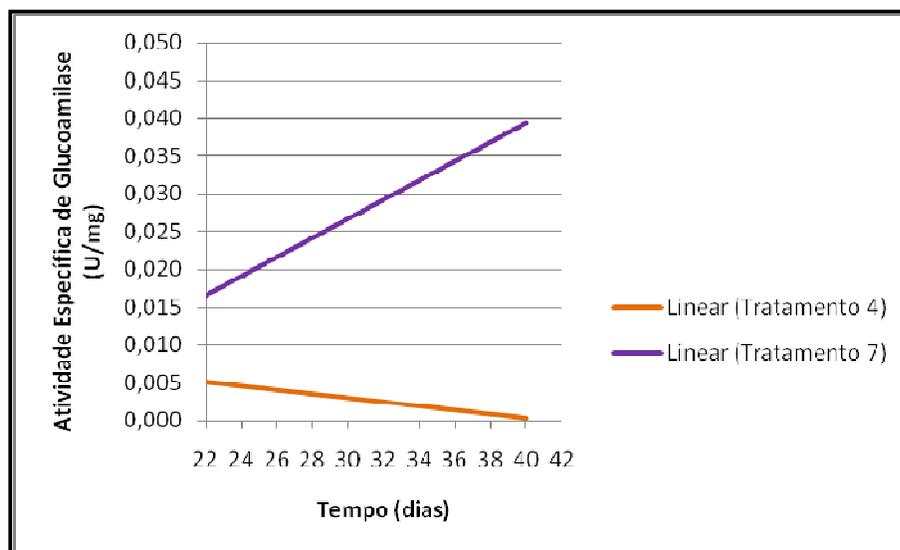


Figura 4.22: Atividade Específica de Glucoamilase expressa em U/mg de proteínas totais pelo fungo *Macrocybe titans*

A atividade de glucoamilase mostrou perfil similar a α -amilase, onde os maiores valores foram obtidos no início do cultivo.

Outro fator importante sobre a baixa produtividade de amilases é sua relação com a baixa concentração de Ca, uma vez que Pires *et. al.* (2002) verificaram que a atividade amilásica é dependente da presença de Ca, embora a β -amilase age sem nenhum tipo de metal para a sua ativação. Comparando os dados de cálcio da Tabela 4.3, constata-se que este mineral mostrou valores de 69 mg/100g no bagaço de malte e de 892 mg/100g nas bainhas. Considerando os valores superiores de cálcio nas bainhas e a melhor atividade enzimática de glucoamilase e crescimento micelial no bagaço de malte, concluiu-se que o cálcio não é fator inibidor da síntese de glucoamilase em *M. titans*.

Em trabalho de Alexandrino *et. al.* (2007), estudando o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, não foi detectado amilases no meio de cultivo, mas sim lacase e manganês peroxidase. Outro fator citado pelos autores, é que a presença de metais pesados têm mostrado poder de inibição da atividade amilásica, tais como o mercúrio, a prata, o cobre e o chumbo. Alguns desses metais são encontrados no bagaço de malte, e nos resíduos de palmeira-real-da-austrália, principalmente pelo fato desta não ser uma cultura usualmente isenta de agroquímicos.

Os valores encontrados nesse trabalho para a produção de α -amilase e glucoamilase, são baixos, quando comparados com fungos tais como *Aspergillus Niger*, Spier (2005), 530,55 U/g para α -amilase e 770,66 U/g para glucoamilase. No entanto, o conhecimento obtido sobre a síntese destas enzimas em *M. titans* abre um caminho sobre as necessidade nutricionais deste fungo.

5 CONCLUSÕES

Os dados sobre crescimento micelial de *M. titans*, um fungo de podridão marrom, nas bainhas medianas do processamento da palmeira-real-da-austrália mostraram que este resíduo, por ser constituído de concentrações elevadas de lignina, dificultou a formação das hifas. No entanto, a determinação de enzimas lignolíticas é necessária para que esta consideração seja verificada.

Além do que, a baixa concentração em proteínas e conseqüente nitrogênio orgânico deste resíduo é fator limitante para sua utilização como substrato para produção de basidiomas de *M. titans*, sendo a suplementação desta fonte obrigatória para tal êxito.

O bagaço de malte mostrou-se um resíduo mais efetivo para o crescimento micelial de *M. titans*, pois apresentou uma relação C:N mais adequada ao metabolismo deste fungo.

Concentrações mais elevadas em nitrogênio mostraram ser um fator essencial no crescimento do fungo, enfatizando o uso de farelo de soja como fonte. Já o valor de pH do meio mostrou ser um fator indiferente ao crescimento, pois o fungo apresentou capacidade de regulação do pH do meio, sendo os valores estabelecidos para índices próximos de 5,0.

Como a maioria dos fungos basidiomicetos, a umidade do substrato em torno de 70% mostra-se adequada ao cultivo micelial.

Quanto a produção das enzimas α -amilase e glucoamilase, *M. titans* mostrou atividades mais efetivas no início da colonização do substrato. Este fungo também mostrou atividade enzimática pouco superior no substrato em que a concentração em nitrogênio era menor, sendo a atividade ligeiramente maior para glucoamilase em relação a α -amilase. Dentro das condições do trabalho, verifica-se que o fungo não é um produtor proeminente de amilases.

Estas enzimas estão relacionadas a produção de glicose a partir do amido, portanto, com estes dados de atividade enzimática, pode-se concluir que o bagaço de mandioca é um suplemento adequado a composição do substrato para crescimento de *M. titans* devendo ser melhor estudado em trabalhos sobre produção de basidiomas deste fungo.

REFERÊNCIAS

ABITRIGO – **Associação Brasileira da Indústria do Trigo**, 2005. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/curiosidades.asp>>. Acesso em: 20/06/2007.

ADENESKY FILHO, E. **Resíduos agroindustrial da palmeira-real-da-austrália da Austrália *Archontophoenix alexandrae* H. Wendl. & Drude, como componente para substratos de espécies ornamentais**. 2007. 134p, il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/DS/2007/322263_1_1.pdf>. Acesso em: 19/04/2008.

AGUERO, J.M.Z. **Estudo da Inativação da Glicoamilase e da Influência de Fosfatos na Produção da Enzima em Cultivos de *Aspergillus awamori***. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1998.

AIYER, P. V. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2004/Oct/Aiyer.pdf>>. Acesso em: 13/03/2008.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. de; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 2007, v. 27, n. 2, p. 364-368.

AMBEV – Companhia de bebidas das Américas. **AmBev apresenta sua política de gestão ambiental para reciclagem de subprodutos no Forest, 2006**. Disponível em: <http://bardaboa.com.br/not_04.php?noticia=192>. Acesso em: 17/11/2007.

ANDRADE, R. **Cogumelo Gigante no México**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Ciencia/0,,MUL67174-5603,00.html>> e <<http://sigma21.wordpress.com/2007/07/16/63/>> Acesso em: 12/07/2007.

ÂNGELO, R. S. IN: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510p, il.

ARROZ CRISTAL - **Tudo Sobre Arroz**, 2002. Disponível em: <<http://www.arrozcrystal.com.br/arrozcrystal>>. Acesso em: 20/06/2007.

AZEVEDO, J. A. M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Isoflavonas Bioativas (daidzeína, genisteína) de Soja (*Glicine Max L. Merrill*) por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2004. 50 p.

BARBOSA, M. C. S.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; TODESCHINI, M. L.; TONIAL, T.; FLORES V. **Prospect for production of *Pleurotus sajor* – caju RO cassava fibrous waste advances in Solid State Fermentation FMS**, 1997. Montpellier, France: Edites By ROUSSOUS, S; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT and VINIEGRA -, G. Kluwer Academic Publishers.

BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I.S. ; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299p.

BEGUIN, P. E.; HUBERT, J. P. The Biological Degradation of Cellulose. **Fems Microbiol Rev**, 1994, v. 13, p. 25 – 28.

BITTENCOURT, C. N. V.; TAVARES, L. B. B. Produção Axênica de Shiitake (*Lentinula edodes*) em Resíduos do Processamento de Palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae*). In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2007, Curitiba-PR. Anais Sinaferm, 2007.

BITTENCOURT, C. N. V. **Cultivo axênico de shiitake (*Lentinula edodes*) em resíduos do processamento da palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae*)**. 2007, 96p, il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2007. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/TE/2007/318808_1_1.pdf>. Acesso em: 12/07/2005.

BOLETIM INFORMATIVO: Nov. 2003. Disponível em: <<http://spvs.org.br/download/boletins/binov03.htm>> Acesso em: 19/06/2007

Boletim Técnico Informativo da BRASEQ - Brasileira de Equipamentos Ltda. **Entendendo a Atividade de água (Aa) e sua importância para a qualidade de alimentos e outros produtos em geral**, 2005. Disponível em: < <http://www.braseq.com.br/pdf/decagon.pdf>>. Acesso em: 14/12/2008.

BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia:** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, 506p, il.

BONONI, V. L. R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995. 206p, il.

BOVI, M. L. A. **Cultivo da palmeira-real australiana visando à produção de palmito**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998, 26p.

BOVI, M. L. A. Palmeiras cultivadas para processamento de palmito. Características agronômicas e comerciais. In: **CURSO – PROCESSAMENTO DO PALMITO EM CONSERVA**, 2006, Campinas. Apostila. Campinas: ITAL – FRUTHOTEC, 2006.

BOX, G.E.P. ; HUNTER, W.G. ; HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters – Na Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987.

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

BRAGA, G. C. **Manual do cultivo de Agaricus blazei Murr: Cogumelo-do-sol**. Botucatu : FEPAF, 1998. 44p, il.

BRAND, D.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; ROUSSOS, S.; BRAND, I.; SOCCOL, C. R. Relationship between coffee husk caffeine degradation and respiration of *Aspergillus* sp. in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Jul-Dez. 2002. v. 102-103., p.169-177.

BRUM, A. A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos**, 2005, 127p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2005.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lacase production by *lentiniula (Lentinus) edodes*. **Fems Microb Lett**, 1995. v. 128, p. 81-88.

CARBONERO, E. R. A. et al. **Further Investigations on the Polysaccharides Obtained from the Stems and Caps of *Macrocybes titans***, 2006. Disponível em: <<http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/2006/cdlivro/resumos/R8199.html>>. Acesso em: 25/06/2007.

CEREDA, M. P. **Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca**. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, 1996. 56p.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**. Jun. 1985 v. 34, n.6, p.358-362.

CHEECK, P. R. Concentrates: energy sources. In: **Applied animal nutrition: feeds and feeding**. 1991, cap 2. p. 28.

COMTEXO, JORNAL ON-LINE. **Consumo de cerveja aumenta no Brasil**. Ano IV. Ed. 117. 15/08/2007. Disponível em: <<http://www13.unopar.br/unopar/publicacao/manchete.action?m=486>>. Acesso em 23/05/2008.

COPEB. **9º Congresso Brasileiro de Eletrônica de Potência**, 2007. Disponível em: <<http://www.furb.br/especiais/interna.php?secao=619>>. Acesso em: 06/07/2007.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1996. 203 p.

COSTA, A.; BORDERES, J.; VALLE, R. S. C.; TAVARES, L. B. B. Avaliação de diferentes fatores na velocidade de crescimento micelial radial de *Pycnoporus sanguineus* cultivado em resíduos da palmeira-real-da-austrália (*Archontophoenix* spp). In: **14º Farmapólis**, 2009, Florianópolis.

COURI *et. al.*, 2008 – IN: **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p, il.

DALSENTER, F. D. H. **Contribuição ao estudo da aplicação da proposta zero para um resíduo agroindustrial utilizando processo biotecnológico**. 2000. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2000.

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da Temperatura na Cinética de Crescimento de *Rhizopus oryzae* em Cultivo em Estado Sólido**, 2005. 123p. Tese (Doutorado em Bioquímica) Centro de Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

DAMASO, M. C. T. et al. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2008, v. 39, n. 4, p. 676-681.

DARE, P. H.; CLARCK, T. A.; CHU-CHOU, M. Consumption of substrate components by de cultivated mushroom *Lentinula edodes* during growth and fruiting on softwood and hardwood-based media. **Process Biochem.** 1988. p. 156-160.

DEL BIANCHI, V. L.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. Fermentação em estado sólido. In: **Biotecnologia Industrial**, Coord. Schmidell, W. et al., 2001. v. 2, p. 247-276.

DEPCKE, M.; KOPYTOWKI FILHO, J.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. Análise da cinética do crescimento micelial radial de *Macrocybe titans* em diferentes condições. In: IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil SICOG, 2008, Caxias do Sul. **Anais - Proceedings**. Brasília - DF : Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 133.

EIRA, A. F. da; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 115p.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510p, il.

FARIA, R. O. **Análise de polissacarídeos e tirosinase de *Lentinula boryana* (berk & mont) pegler: um macrofungo com potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2008.

FARIAS, J. S.; FONTES, L. A. M. **Gestão Integrada de Resíduos Sólidos: O lixo de Aracajú analisado sob a ótica da gestão de meio ambiente**. Caderno de Pesquisas em Administração, São Paulo, abril/junho 2003. v. 10, n. 2. p. 95-105. Disponível em: <<http://www.cepis.org.pe/bvsacd/cd48/aracaju.pdf>>. Acesso em 16/11/2007.

FERNANDES, L.S.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. Cinética de crescimento micelial radial de *Lentinula boryana* em resíduo de palmeira-real-da-austrália. In: IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil SICOG, 2008, Caxias do Sul. **Anais - Proceedings**. Brasília - DF : Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 153-153.

FILHO, J. A. R.; CAMARÃO, A. P. Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina. In: **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/sconcentrada.htm>>. Acesso em: 16/11/2007.

GARRAWAY, O. M.; EVANS, C. R. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley, 1984. 230p.

GIORDANO, B. N. E. **Resíduo do Processamento da Palmeira-Real (*Archontophoenix alexandrae*) na Fazenda Princesa do Sertão: Implantação da Indústria para a Fabricação de Biscoitos Fibrosos**. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônoma), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2007. p. 68. Disponível em: <<http://www.tcc.cca.ufsc.br/agronomia/ragr020.pdf>> Acesso em: 23/09/2007.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 485p.

GUEDES, A.; ROSSA, A.T.; DALMARCO, E. M.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. Atividade antibacteriana, antioxidante e citotóxica de *Lentinula boryana*. In. Brasília - DF: **Embrapa Recursos Genéticos**, 2008. p. 152-152.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 08/11/ 2003.

HARBS, R. M. P. **Compostagem de resíduos de abatedouro de aves e da indústria de arroz, madeira e palmito**. 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2007.

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

HASSEGAWA, R. I. **Produção de micélio com atividade antibacteriana de *Lentinula edodes***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa, 1998. 135p.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002. v. 30, p.381-386.

HWANG, H. J. et al. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. **Journal of Applied Microbiology**, 2003. v. 94, p. 708-719.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985. 523 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2008: **Agroindústrias**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 03/11/2008.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA ORT. **O que é Biotecnologia?**. Jul. 2008. Disponível em <<http://www.ort.org.br/biotecnologia/o-que-e-biotecnologia>>. Acesso em 25/09//2008.

ISRAEL, C. M. **Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero Polyporus**, 2005. 135 p, il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2005. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/TE/2005/290465_1_1.pdf>. Acesso em: 15/07/2007.

KHURI, A.; CORNELL, J. A. **Response Surface: Designs and Analyses**. American Society for Quality Control, 1987

KIM, S. W. *et. al.* Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, 2002. v. 34, p. 389-393.

LAUSCHNER, R. **Agribusiness, cooperative e produtor rural**. São Leopoldo: UNISINO, 1995. 2ª ed. 296p.

LIEBL, M.; VIEIRA, G. R. T.; ENDER, L.; GUEDES, A; TAVARES, L. B. B. Produção de Antibiótico em Reatores de Coluna em Sistema Sólido utilizando *Polyporus tricholoma*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife. **Anais do SINAFERM**. Recife-PE : UFPE, 2005.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Farinha de palmito**. Projeto apresentado à EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí-SC. 2002.

LIMA, U. A. de; AQUARONI, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1, p. 285.

LIN, W. L.; FELDBERG, R. S.; CLARK, E. D. B. Kinetics of Cell Growth and Heterologous Glucoamylases Production in Recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, 1993. v. 41, p. 273-279.

LOGUERCIO-LEITE, C. L., 2004 IN: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510 p, il.

LORENZI, H. et al. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004. 432p.

MACEDO, R. C.; BERBERT, V. H. C.; RIZZO, A. C. de L.; TRINDADE, P. V. O.; LEMOS, J. L. S. Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos. In: **X Jornada de Iniciação Científica - CETEM**, 2002, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2002-037-00.pdf>>. Acesso em: 27/08/2007.

MAEDA, S.; ANDRADE, G. de C.; FERREIRA, C. A.; SILVA, H. D.; AGOSTINI, R. B. Resíduos Industriais e Dejetos da Caprinocultura como Componentes de Substratos para Produção de Mudanças de *Eucalyptus badjensis*. In: **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo-PR, jan./dez. 2006 n. 53, p. 3-20. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim53/BPF_53_p3-20.pdf>. Acesso em: 16/11/2007.

MAIA, C. M. B. de F. **Compostagem de resíduos florestais: um guia para produção de húmus através da reciclagem e aproveitamento de resíduos florestais**. Colombo-PR : Embrapa Florestas, 2003. 28 p, il. (Documentos, 87).

MAIORANO, A. E. **Produção de Pectinase por Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo, 1990, 262p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Escola Politécnica – USP.

MOMM, R. C. **Estudo da velocidade e intensidade de colonização de resíduos agroindustriais para produção de “sementes” de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em engenharia ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2002.

MOHORCIC, M.; FRIEDRICH, J.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 12, p. 200-206, 2007.

MUSSATTO, S. I.; VAZ, A. C. S.; ROBERTO, I. C. Efeito da concentração inicial de xilose na produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de malte. In: **VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica**, 2004, São José dos Campos- P. Anais de resumos / CD-ROM de trabalhos completos do VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, 2004. p. 527-530.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, 2006. v. 43, n. 1, p. 1-14.

OLIVEIRA, A. G. S.; TAVARES, L. B. B. Aproveitamento energético no processamento da palmeira-real-da-austrália da Austrália. In: **Anais do III Encontro nacional de produtores de palmito de palmeira-real-da-austrália**, Balneário Camboriú - SC. EPAGRI-ABRAPALMER, 2005. v. 1. p. 93.

ORGANIZAÇÃO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DOS MUNICÍPIOS, 2007. **Rio Mudás**. Disponível em: <http://www.riomudas.com.br/palm_ra.htm> Acesso em: 14/05/2007.

PALMA, M. B. **Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em Cultivo em Estado Sólido**, 2003. Tese (Doutorado Engenharia Química). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003, 169p.

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

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

PARK, Y. K.; SANTI, M. S. S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**. 1977. v. 55, p. 193-195.

PARRÉ, J. L.; ALVES, A. F.; PEREIRA, M. F. Desempenho do setor agroindustrial da região Sul do Brasil. In: MONTOYA, M. A.; ROSSETO, C. R. **Abertura econômica e competitividade no agronegócio brasileiro**. 1ª ed. Passo Fundo - RS, 2002, v. 1, p. 161-179. Disponível em: <http://www.pensaconference.org/arquivos_2001/41.pdf>. Acesso em: 23/08/2008.

PEGLER, D. N; LODGE, D. J.; NAKASONE, K. K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Micologia**, 1998. v. 90, n. 3, p. 494-504.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, 2007. v.2 , issue 1, p. 118-127.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. de S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico**. Agosto, 2005. Fortaleza - CE. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf> Acesso em: 19/06/2007.

PIRES, T. da C. R.; E. M. da; FINARDI-FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, set./dez, 2002, p. 278-284,

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

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: DUNISC, 1998. v. 1. il.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L.. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: DUNISC, 2002. v. 2. il.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, 1992. v. 37, p. 223-361.

RAMOS, M. G.; HECK, T. C. **Cultivo da palmeira-real para produção de palmito**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 32p. (Boletim didático nº40).

RIGONI, D.; CORADIN, J. H.; ROSSO, M. L. DE; CAIRES, S. K. DE; HELM, C. V. In: IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil SICOG, 2008, Caxias do Sul. **Anais - Proceedings**. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 143.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RUNHO, R. C. **Farelo de Soja: processamento e qualidade**. 2001. Disponível em: <http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_janeiro.htm>. Acesso em: 19/06/2007.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R.. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 415p, il.

SAIKA, R. A. **Determinação do perfil químico e bioquímico de *Macrocybe titans***. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR, 2008.

SANTOS, V. M. C. S. **Contribuição ao Estudo da Produção de *pleurotus spp.* em Resíduos Lignocelulósicos**. 2000, 141p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2000.

SANTOS, M. S. dos. **Cervejas e refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. 58p. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acesso em: 15/07/2007

SANTOS, F.; TAVARES, L. B. B. Caracterização biológica de fungos do gênero *Polyporus* cultivado em resíduo de palmeira. In: Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul, 2005, Joinville. **Anais do Farmapolis**, 2005. v. 1. p. 17.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Abropecuária, 2001, 463p.

SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS, 2005. Disponível em: <<http://sbirt.ibict.br/upload/sbirt1622.pdf>>. Acesso em: 15/07/2007.

SILVA, W. B. DA.; PERALTA, R. M. Caracterização bioquímica de uma enzima extracelular de um fungo termo tolerante, 2000. Disponível em: <<http://www.uepg.br/proresp/publicatio/bio/2000/01.pdf>>. Acesso em: 03/06/2008.

SILVA, E. M. DA. **Análise do crescimento micelial e das atividades lignocelulolíticas produzidas durante o cultivo de *Lentinula edodes* em resíduo de *Eucalyptus saligna***. 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena-SP. 2003.

SILVA, E. M.; MILAGRES, A. D. Estudo das atividades de Mn peroxidase produzida durante degradação de resíduos agroindústrias por *Lentinula edodes*. **Anais do VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2002**. Universidade Estadual de Maringá.

SILVA E M.; MACHUCA A; MILAGRES A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in applied microbiology**, 2005; 40(4):283-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752219>>. Acesso em: 02/01/2009.

SILVA, R. DA.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2005, v. 36, n. 3, p. 235-241. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 02/10/2008.

SILVA, G. DA. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glucoamilase**. 2006. 95p, il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 2006. Disponível em: <http://www.bc.furb.br/docs/TE/2006/304568_1_1.pdf>. Acesso em: 12/07/2007.

SOUZA, A. A. de. **Resíduos de cervejaria na nutrição de bovinos de corte**, 2004. Disponível em: <<http://www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=36091>>. Acesso em: 15/07/2007.

SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -amilase e Amiloglicosidase por Fermentação em Estado Sólido**. 2005, 157p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

STIJVE, T. et al. **The tropical giant mushroom *Macrocybe titans* is edible and can be cultivated**. 2004. Disponível em: <<http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20053061090>>. Acesso em: 19/06/2007.

TAVARES, L. B. B. Cultivo de shiitake em resíduos do processamento de palmito. In: IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, SICOG, 2008, Caxias do Sul. **Anais - Proceedings**. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. v. 1. p. 63-64.

THAME, A. C. de M.; PAMPOLINI, J. B.; OLIVEIRA, A. R. de; SPOTO, M. H. L., 2001 - **Processamento dos resíduos extraídos da produção de cerveja para alimentação humana, produto resultante e aplicação industrial alimentícia**. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/processamento-dos-residuos-extraidos-da-producao-de-cerveja-para-alimentacao-humana-42584.html>>. Acesso em: 15/07/2007.

TONINI, R. C. G. **Utilização da bainhas medianas de palmito (*Euterpe edulis* Mart. – *Arecaceae*) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC 2004..

TUNGA, R.; TUNGA, B. S. Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation. **International Center for Biotechnology**. Japan: Osaka University, 2003. 12p.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

VALLILO, M. I.; CRESTANA, C de S. M.; AUED-PIMENTEL, S.; TAVARES, M.; KUMAGAI, E. E.; GARBELOTTI, M. de L. et al. Composição química das sementes de *Archontophoenix alexandrae* H.Wendl. & Drude (Arecaceae). **R. Árvore**, 2004. v. 28, n.5, p.676-679. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 02/10/2008.

VAZ, A. C. S.; MUSSATTO, S. I. ; ROBERTO, I. C. Avaliação da composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte visando sua utilização em processos fermentativos. In: **VI COBEQ IC - Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005, Campinas - SP. Caderno de Programação e de Resumos do VI COBEQ IC, 2005. p. 39. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/rBT39.pdf>>. Acesso em: 23/05/2008.

VIEIRA, M. A. **Caracterização de farinhas obtidas dos resíduos da produção de palmito da palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae*) e desenvolvimento de biscoito fibroso**. 2006, 164p.. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2006.

VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M.; TAVARES, L. B. B. ; PAULERT, R ; SMÂNIA JR, A . Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 561-568, 2008.

VITOLO, M. IN: BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. 4v, il.

WALLIS, G.L.F. et al. The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**: 1527, 112-122, 2001.

ZENT, E. L.; ZENT, S.; ITURRIAGA, T. Knowledge and use of fungi by a micophylic society of the Venezuelan amazon. **Economic Botany**, 2004. v. 58, n. 2, p. 214-226.

APÊNDICE

Tabela A1 Crescimento diário (cm) do fungo *Macrocybe titans* em FES contendo como substrato base o resíduo de bainhas medianas (Experimento A).

Média do crescimento micelial axial (cm/dia)										
Tratamentos	Tempo (dias)									
	13	18	20	24	26	28	30	32	34	36
01	1,1	1,5	1,85	2,25	2,7	3,3	3,55	3,7	4	4,4
02	0	0	0	0,3	1,05	1,5	1,85	2,05	2,4	2,65
03	0,7	1,3	1,6	2	2,25	2,45	2,7	2,8	3,1	3,45
04	2,65	3,55	4,05	5,15	5,95	6,7	7,15	7,35	7,85	8,5
05	0,5	0,8	1,25	1,8	2,1	2,55	2,9	3	3,4	3,75
06	0,5	1,1	1,25	1,8	2,05	2,5	2,65	2,75	3,15	3,35
07	1,75	2,95	3,45	4,55	4,95	5,95	6,5	6,75	7,4	8,5
08	1,2	2,15	2,6	3,05	3,35	3,75	4	4,2	4,55	4,85
09	1,4	2,2	2,65	3,1	3,35	3,7	3,9	3,9	4,25	4,45

Tabela A2 Crescimento diário (cm) do fungo *Macrocybe titans* em FES contendo como substrato base o resíduo de bagaço de malte (Experimento B).

Média do crescimento micelial axial (cm/dia)						
Tratamentos	Tempo (dias)					
	10	12	13	14	15	16
01	1,65	2,05	2,45	2,85	3,2	3,45
02	1,4	1,95	2,25	2,5	2,8	3,1
03	1,45	1,95	2,15	2,55	2,95	3,15
04	2,55	3,35	3,7	4	4,5	5,2
05	1,3	1,8	2,2	2,5	2,75	3
06	1,25	1,8	2,15	2,4	2,75	3
07	3	4,75	5,4	6,05	6,5	7
08	1,05	1,6	1,9	2,25	2,5	2,7
09	1,05	1,5	1,75	2,1	2,3	2,6

Tabela A3 Velocidade média (cm/dia) do fungo *Macrocybe titans* em FES no Ensaio I

Velocidade média (cm/dia)		
Tratamentos	EXPERIMENTO A (Bainhas medianas)	EXPERIMENTO B (Bagaço de malte)
01	0,10	0,20
02	0,07	0,18
03	0,13	0,18
04	0,20	0,28
05	0,10	0,20
06	0,08	0,16
07	0,18	0,36
08	0,11	0,21
09	0,08	0,15

Tabela A4 Valores do pH no cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos do Ensaio I

Tratamentos	EXPERIMENTO A (Bainhas medianas)		EXPERIMENTO B (Bagaço de malte)	
	pH		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final
01	4,16	5,11	6,02	4,81
02	4,11	4,52	5,99	4,93
03	4,00	4,61	5,92	5,10
04	4,17	5,46	6,05	5,40
05	4,16	4,53	6,05	5,14
06	4,25	5,05	5,88	5,11
07	4,52	5,36	6,00	5,65
08	4,52	5,03	6,04	5,37
09	4,32	4,73	5,89	5,08
Somente resíduo	4,46		5,29	

Tabela A5 Atividade de água cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos do Ensaio I

Tratamentos	EXPERIMENTO A (Bainhas medianas)		EXPERIMENTO B (Bagaço de malte)	
	A.a.		A.a.	
	Inicial	Final	Inicial	Final
01	1,000	0,994	1,000	0,991
02	0,998	0,993	1,000	0,995
03	1,000	0,995	1,000	0,997
04	0,997	1,000	1,000	0,999
05	0,997	0,996	1,000	0,996
06	0,998	0,997	1,000	0,994
07	0,997	0,996	1,000	0,995
08	0,996	0,996	1,000	0,993
09	0,996	0,994	1,000	0,994
Somente resíduo	0,743		0,44	

Tabela A6 Percentual de cinzas do cultivo de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos do Ensaio I

Tratamentos	EXPERIMENTO A (Bainhas medianas)		EXPERIMENTO B (Bagaço de malte)	
	%		%	
	Inicial	Final	Inicial	Final
01	2,96	2,86	2,80	2,75
02	3,38	2,86	2,78	2,78
03	3,13	1,91	2,42	2,54
04	3,64	3,09	2,58	2,78
05	3,71	2,82	3,14	3,26
06	3,50	3,52	2,84	3,03
07	1,45	3,42	3,18	3,54
08	4,46	3,20	3,63	3,98
09	2,39	2,37	2,54	1,67
Somente resíduo	0,82		1,97	

Tabela A7 Valores da Atividade Enzimática de Glucoamilase expressa em U/g de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos com substrato bainhas medianas e bagaço de malte.

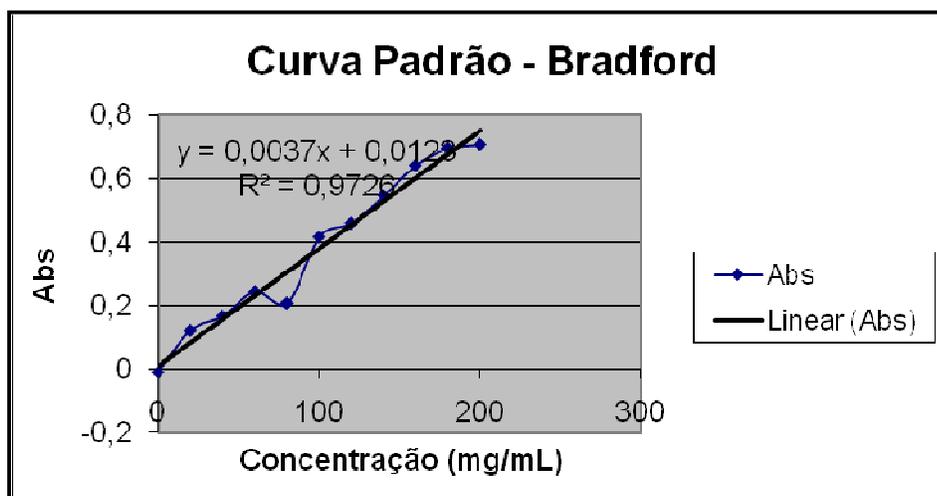
Atividade Enzimática de Glucoamilase		
U/g meio sólido		
Tratamentos	EXPERIMENTO A (Bainhas medianas)	EXPERIMENTO B (Bagaço de malte)
01	22,87	27,87
02	25,12	28,01
03	23,24	30,75
04	26,84	31,89
05	25,46	31,84
06	25,10	35,08
07	25,35	98,38
08	28,45	31,98
09	26,81	32,51

Tabela A8 Produção de α -amilase pelo fungo *Macrocybe titans* referente ao Ensaio II

Dias de cultivo	Tratamento 4 (4,0 g de farelo de soja + bagaço de malte)		Tratamento 7 (7,0 g de farelo de soja + bagaço de malte)	
	Atividade Enzimática U/g	Atividade Específica U/mg	Atividade Enzimática U/g	Atividade Específica U/mg
22	9,869	0,05029	2,1545	0,007382
24	12,7185	0,064811	0,4865	0,001667
26	6,672	0,033999	3,058	0,010478
28	4,3785	0,022312	6,1855	0,021194
30	7,2975	0,037187	6,1855	0,021194
32	7,9925	0,040728	3,1275	0,010716
34	3,475	0,017708	1,856	0,009
36	1,946	0,009916	1,668	0,005715
38	6,672	0,033999	1,5985	0,005477
40	3,1275	0,015937	2,502	0,008573

Tabela A9 Produção de Glucoamilase pelo fungo *Macrocybe titans* referente ao Ensaio II

Dias de cultivo	Tratamento 4 (4,0 g de farelo de soja + bagaço de malte)		Tratamento 7 (7,0 g de farelo de soja + bagaço de malte)	
	Atividade Enzimática U/g	Atividade Específica U/mg	Atividade Enzimática U/g	Atividade Específica U/mg
22	19,07	0,006991	6,81	0,02
24	13,44	0,004928	4,41	0,01
26	11,68	0,00428	5,00	0,01
28	11,34	0,004158	8,63	0,03
30	0,60	0,000219	8,63	0,03
32	0,29	0,000107	6,50	0,02
34	0,74	0,00027	8,07	0,03
36	1,97	0,000724	7,69	0,03
38	6,57	0,00241	13,33	0,04
40	6,89	0,002528	12,38	0,04

**Figura A1:** Curva Padrão para os testes de proteínas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)