

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE POR
ASPERGILLUS AWAMORI

Bolsista: Aleandro Dantas Chaves, FAPEAM

MANAUS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB – B/0005/2008

PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE POR
ASPERGILLUS AWAMORI

Bolsista: Aleandro Dantas Chaves, FAPEAM

Orientadora: Prof^a Dr^a Leonor Alves de Oliveira da Silva

Co-orientador: MSc. Fabiano Rodrigues de Souza

MANAUS

2009

RESUMO

O amido é um produto globalizado e com diversas aplicações industriais. A produção mundial de amido está ao redor de 40 milhões de toneladas, extraídas principalmente de milho, trigo, mandioca e batata. Hoje, através de estudos em condições laboratoriais foram obtidos clones de batata-doce na Universidade Federal do Tocantins para fins industriais, resistentes a pragas e doenças, e com capacidade média de produtividade de até 60 ton/raiz/ha. Estes resultados já auxiliaram a volta da produção de etanol utilizando a batata-doce como fonte de matéria-prima e agora se preconiza a utilização deste amido, como substrato indutor de amiloglicosidase. Atualmente a demanda de amido de mandioca (fécula) tem crescido de forma substancial, principalmente pelo setor industrial a exemplo da utilização de fécula na mistura de farinha de trigo para fabricação de pães, e mais recentemente utilizada para a produção de enzimas e biocombustíveis. A espécie *Dioscorea sp*, conhecida popularmente como cará-doce, possui seu centro de origem no Norte da América do Sul, sendo cultivada em varias regiões do nordeste brasileiro, e pouco disseminada na região Amazônica, talvez pela falta de conhecimento, os agricultores que cultivam o cará enfrentam uma série de dificuldades geradas pela falta de informações técnicas sobre o manejo da cultura, e também face á escassez de pesquisa nesta área na Amazônia Legal. No Brasil não se utiliza tanto esta forma de amido, uma vez que é incipiente a procura de outras formas de trabalho pelo não conhecimento e divulgação de resultados, o que reforça ensaios científicos pela produção, extração, e deterioração por microrganismos produtores de enzimas amilolíticas. Considerando-se a importância industrial da amiloglicosidase na produção de xaropes de glicose, biocombustíveis amiláceos, o crescente interesse pela fermentação em estado líquido, particularmente através de

um aproveitamento nobre da farinha de mandioca, batata-doce e cará, a necessidade de um estudo mais detalhado da etapa de produção e caracterização enzimática, reforçam o presente trabalho, com objetivo de produzir amiloglicosidase por fungos filamentosos *Aspergillus awamori* através do crescimento em estado líquido utilizando batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e cará (*Dioscorea sp*) como substrato indutor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3.1. Amido.....	8
3.2. Cultura da batata-doce.....	8
3.3. Cultura da mandioca.....	10
3.4. Cultura do cará.....	10
3.5. Amiloglicosidase.....	12
4. METODOLOGIA.....	13
4.1. Tratamento da matéria-prima.....	13
4.2. Linhagem, cultivo e manutenção.....	13
4.3. Cinética de produção enzimática.....	13
4.4. Medida da atividade da amiloglicosidase.....	14
4.5. Determinação do pH e temperatura ótima do complexo enzimático excretado pelo fungo <i>A. awamori</i>	14
4.6. Dosagem de proteína.....	15
5. RESULTADOS E DISCURSÃO.....	15
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	19

1. INTRODUÇÃO

Os produtos agrícolas e até mesmo os resíduos agroindustriais são excelentes substratos para fermentações em estado líquido na produção de enzimas (Reguly, 2000). Neste aspecto, as farinhas geradas durante o beneficiamento da mandioca, batata-doce e cará, constituem como alguns substratos adequados para utilizações em processos fermentativos sendo estes componentes nutritivos apropriados para microrganismos crescerem e excretarem enzimas. No Brasil, praticamente não existe a produção em escala industrial de enzimas com base na atuação do uso de biomassa, de fontes amiláceas, ficando assim, o país a mercê da importação de enzimas, para a produção de seus subprodutos nas principais indústrias alimentícias, têxteis entre outras.

A amiloglicosidase (α -1,4 D-glucan-glicosidase) (E.C. 3.2.1.3) é uma enzima extracelular, que cliva as ligações do amido até glicose, sendo importante para indústrias de alimentos e bebidas. Esta enzima representa aproximadamente 30% da produção mundial de enzimas. Apesar de outras culturas de microrganismos também produzirem esta enzima, a amiloglicosidase produzida por *Aspergillus* é preferida por sua maior termoestabilidade, além de se encontrar no produto final baixa atividade de transglicosidase (Reguly, 1996).

As etapas de produção, recuperação, concentração e purificação constituem partes importantes do processo biotecnológico para obtenção de produtos de alta pureza. Na produção comercial de enzimas microbianas, os custos das operações de recuperação podem alcançar até 80 % do custo final do produto. Para minimizar estes custos é importante a escolha de métodos de produção, separação e purificação adequados, e o estudo de sua otimização, de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável.

2. OBJETIVOS

- Geral

Avaliar a produção de amiloglicosidase por fungos filamentosos *Aspergillus awamori* através do crescimento em meio líquido utilizando batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e cará (*Dioscorea sp*) como substratos.

- Específicos

- ✓ Determinar o melhor tempo para cultivo;
- ✓ Determinar o melhor substrato indutor para a produção de amiloglicosidase pelo referido fungo;
- ✓ Determinar pH e temperatura ótima do complexo enzimático.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Amido

O amido é o polissacarídeo de reserva nutricional das plantas, existindo duas formas: a amilose, o tipo não ramificado do amido, que é constituído de glicoses com ligação α -1,4; e a amilopectina, a forma ramificada, tendo cerca de 1 ligação α -1,6 por 30 ligações α -1,4, é semelhante ao glicogênio, exceto quanto ao menor grau de ramificações (Aguero, 1998).

O amido é uma mistura em proporções variáveis de amilose e amilopectinas, a sua fração amilose é, em geral, a menor. A amilose se dispersa em forma coloidal na água, produzindo pseudo-soluções altamente viscosas. Já a amilopectina é menos viscosa, mais estável, tornando-se avermelhadas em ensaios com o iodo (Aguero, 1998).

O amido é um produto globalizado e com diversas aplicações industriais. A produção mundial de amido está ao redor de 40 milhões de toneladas, extraídas principalmente de milho, trigo, mandioca e batata. Cerca de 70% do amido usado mundialmente é destinado às indústrias de alimentos (CEREDA, 2001). O processamento de alimento exige do amido que resista a certas condições de temperatura, pressão, acidez e corte (agitação mecânica). Dufour et al. (2000) citam que para contornar esse problema e contar com amidos adequados em técnica e funcionalidade, o setor mundial de amido têm desenvolvido plantas geneticamente modificadas, associadas com modificações físicas e químicas dos amidos. No entanto, o consumidor valoriza cada vez mais os produtos naturais, o que tem criado grande expectativa em relação aos chamados amidos nativos que poderiam apresentar propriedades de aplicação semelhantes aos modificados.

3.2. Cultura da batata-doce

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) tem cerca de dois mil anos de cultivo. Segundo Urbaneck et al. (2005) a batata-doce é considerada uma das doze culturas mais

importantes do mundo, sendo a terceira raiz mais cultivada no planeta. De acordo com dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2001, a batata-doce foi cultivada em aproximadamente 111 países, sendo que cerca de 90% da produção é obtida na Ásia, 5% na África e 5% no restante do mundo. A China é o país que mais produz, com 100 milhões de toneladas. Somente no Brasil em 2005, a área cultivada foi de aproximadamente 50 mil hectares.

Segundo Borba (2005), Devido a sua composição e potencialidade agrícola, a batata-doce poderia ser utilizada como matéria-prima para diversos produtos. No entanto, no Brasil, esta cultura fica restrita ao consumo direto. Sua industrialização é incipiente, sendo o produto mais conhecido o doce em pasta “marrom-glacê” (Filgueira, 2000). A produção de álcool, principalmente para fins alimentícios (bebidas), farmacológicos e laboratoriais, também se apresenta como uma alternativa de mercado para a batata-doce (Goldemberg, 2001). No Brasil, pesquisadores como Menezes (1980) descrevem que a fabricação do etanol, a partir da batata-doce poderia ser viável economicamente tanto quanto ao de outras fontes amiláceas, como é o caso da cidade de Divinópolis-MG, que garantiu a produção de 130 litros de etanol por tonelada de raiz de batata-doce com produtividade de 11 ton/raiz/ha.

Hoje, através de estudos em condições laboratoriais foram obtidos clones de batata-doce na Universidade Federal do Tocantins para fins industriais, resistentes a pragas e doenças, e com capacidade média de produtividade de até 60 ton/raiz/ha. Estes resultados já auxiliaram a volta da produção de etanol utilizando a batata-doce como fonte de matéria-prima e agora se preconiza a utilização deste amido, como substrato indutor de amiloglicosidase.

3.3. Cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), também conhecida como macaxeira e aipim, é uma das principais fontes alimentares energéticas para milhões de pessoas, principalmente para aquelas que vivem nas regiões tropicais do globo terrestre, para as quais chega a representar em alguns casos, mais de 50% da dieta alimentar. Nestas regiões ocupa o quarto lugar em área plantada, sendo a sétima cultura no mundo e é cultivada em mais de 90 países, sendo, porém que mais de 80% da produção mundial provém de apenas 10 países, entre os quais o Brasil é o maior produtor, com 31%, sendo seguido pela Indonésia, Zaire, Nigéria, Tailândia, Índia, Burundi, Tanzânia, Ghana, Moçambique e outros (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, 2002).

A mandioca é considerada, do ponto de vista nutritivo, como um alimento puramente energético, gerando cerca de 1.500 cal/Kg, a partir dos carboidratos (350g/Kg). Os demais componentes somados, não ultrapassam 50 g/Kg. Levando em consideração a necessidade de opções energéticas para o calor no processo de usina de álcool, surgiu a necessidade de desenvolver trabalhos visando o aproveitamento da rama de mandioca como substituto total ou parcial da lenha e óleo combustível nos vários processos industriais (Almeida, 1992).

Atualmente a demanda de amido de mandioca (fécula) tem crescido de forma substancial, principalmente pelo setor industrial a exemplo da utilização de fécula na mistura de farinha de trigo para fabricação de pães, e mais recentemente utilizada para a produção de biocombustíveis.

3.4. Cultura do cará

O Cará (*Dioscorea sp.*) é também um vegetal amiláceo bastante cultivado para o consumo direto, sendo produzido a mais de 2000 anos em regiões de clima tropical e subtropical. No mundo a área cultivada é de 1.080 unidades (1000 ha), entretanto, no Brasil o

cará é uma cultura de pequenos produtores, utilizada no consumo direto. Algumas indústrias utilizam os rizóforos no preparo de papinhas para bebê. Contudo não existe processamento do cará para a obtenção de amido. Estima-se que no mundo, em 1998, foram cultivados 3320 unidades (1000ha) com cará (Acosta, 1975).

O cará é um alimento rico em carboidratos (feculento) muito consumido por habitantes de países tropicais; na culinária pode ser utilizado como substituto da batata inglesa, da batata doce e da macaxeira. É um alimento de fácil digestibilidade, indicado para dietas. Algumas espécies tem valor farmacológico. Embora seja elevado o número de espécies de *Dioscorea*, apenas cinco são consideradas importantes na alimentação humana: *D. cayenensis*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* e *D. trifida*. Destas, apenas *D. trifida*, é brasileira, sendo as outras de origem africana e asiática (Montaldo, 1991).

A fécula do cará (*Dioscorea trifida*) foi analisada por vários pesquisadores e apresenta características tecnológicas desejáveis como estabilidade às altas temperaturas e sob valores baixos de pH (Rosenthal et al. 1972). Em avaliação feita sobre a potencialidade de plantas tropicais (Leonel e Cereda, 2000), o cará apresentou o maior valor potencial de produção de amido por área, com 6,1 t/ha. A relevância do uso do cará como matéria-prima para produção de amido já havia sido apontado por Cereda (2001) como uma das formas de valorização da cultura, com utilização possível do descarte que não consegue classificação como hortaliça.

No gênero *Dioscorea* o processo de extração do amido é dificultado pela presença de mucilagem existente nos tubérculos, que aumentam a viscosidade e dificulta a passagem pelas diversas peneiras. Ocasiona também aumento do tempo de decantação, podendo reduzir o rendimento de extração e até afetar a qualidade do amido, com deterioração por microrganismos se o processo não for realizado em condições de baixas temperaturas (Camargo, 1994).

3.6. Amiloglicoidase

A glicoamilase ou amiloglicosidase (α -D-(1,4)-glican-glicohidrolase, E.C 3.2.1.3) é uma enzima extracelular utilizada na hidrólise do amido para produção de xaropes ou frutoses. Esta enzima atua no rompimento das ligações α -1,4 e α -1,6 da molécula de amido, transformando-o em glicose e, por esta razão, é muito empregada na indústria alimentícia, sendo uma das enzimas mais produzidas do mundo. A produção industrial de xaropes de frutose a partir de amido requer a utilização de quatro enzimas: α -amilase, glicoamilase, pupulanase e glicose-isomerase (HEADON; WALSH, 1994).

A produção de glicoamilase é obtida através do cultivo de fungos filamentosos, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Endomyces*. Nos cultivos de *Aspergillus*, também ocorre a produção de transglicosidase, indesejável no processo de produção de glicoamilase (SHAH et al., 1987 e SHAH et al., 1989). Algumas linhagens são mais adequadas para a produção de glicoamilase pois produzem pouca quantidade de transglicosidase, como é o caso do *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (AUNSTRUP, 1979).

Sendo uma enzima indutiva, a síntese de glicoamilase é bastante incrementada quando quando seu substrato (indutor) está presente no meio de cultura. A produção desta enzima, assim como várias outras hidrólises, é regulada por mecanismos de indução e de pressão catabólica.

4. METODOLOGIA

4.1. Tratamento da matéria-prima

A batata-doce foi obtida através do banco de germoplasma da Universidade Federal do Tocantins, a fonte amilácea foi lavada e processada para transformação em farinha de acordo com a metodologia de SAVELLI *et al.* (1995). A referida metodologia consiste em lavar as raízes, descascar e fatiá-las. O material resultante foi disposto para secagem em estufa com circulação e renovação de ar a 55°C, durante 24 horas. A farinha foi obtida mediante a moagem do material desidratado em multiprocessador. A mandioca e o cará foram coletados por produtores regionais da cidade de Manaus-AM em seguida, foram lavados, descascados, fatiados e imerso em soluções de proporção 1:1:1 de hipoclorito / álcool 70% / H₂O, para assepsia e depois ralado num ralador esterilizado.

4.2. Linhagem, cultivo e manutenção.

Para a realização deste trabalho o fungo filamentoso *Aspergillus awamori* foi repicado em meio Sabouraud composto de: água destilada, 0,15 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de glicose e 1 g/L de peptona, mantidos no referido meio por 4 dias à temperatura de 30°C, para servir de fonte de esporos.

4.3. Cinética de produção enzimática

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicatas para os fungos *Aspergillus awamori* sendo inoculados na concentração 10⁴esporos/mL, em 100 mL de meio líquido Manachini constituído de Extrato de Levedura (0,1g), Fosf.dib.Potássio (0,2g), Sulf. de Amônio (0,15g), Fosfato de Sódio (0,09g). Todos acrescidos à concentração de 1,5g de substrato indutor amiláceo como fonte de carbono (mandioca, cará e batata-doce). Foram

incubados por 120 horas sob agitação de 150rpm à 30°C, no qual foram retiradas aliquotas de 1,0mL a cada 12 horas.

4.4. Medida da atividade da amiloglicosidase.

Foram utilizadas as técnicas descritas por CARVALHO (2006), utilizou-se como substrato uma solução de amido p.a. a 1%, dissolvido em solução tampão acetato (pH 4,5, 50mm). O ensaio foi realizado com controle de enzima (CE), controle de substrato (CS), amostra (A), branco (B) e padrão (P). O branco foi constituído de água destilada substituindo a enzima. A mistura foi mantida em banho a 60°C por 5 min, após decorrido o tempo, paralisou-se a reação utilizando banho fervente por 10 min, posteriormente imerso num banho de gelo. Utilizou-se para quantificar os açúcares redutores liberados pela reação, usou-se glicose como padrão, depois de acrescentado o volume de GOD a mistura foi submetido ao banho maria à 37°C, por 5 min, completando com água destilada o restante do volume do tubo sendo de 2mL o volume final. Em seguida foram realizadas leituras espectrofotométricas à 500nm. Uma unidade de amiloglicosidase, IU (International Unit), corresponde a 1 micromols de açúcares redutores, expressos como glicose, liberados por minuto (PANDEY e RADHAKRISHNAN, 1993).

4.5. Determinação do pH e temperatura ótima do complexo enzimático excretado pelo fungo *A. awamori*.

Os filtrados das culturas obtidos nos melhores tempos de cultivos foram submetidos a determinações de pH e temperaturas ótimas. Para se determinar o pH ótimo da atividade amiloglicosidase, os filtrados foram incubados a 60°C, com o substrato, em diferentes pHs de 3,0 a 8,0, utilizando o tampão McIlvaine. Para determinação da temperatura (univariada)

ótima, os complexos enzimáticos foram incubados por 5 min (tempo de reação) no pH ótimo previamente determinado em temperaturas de 30 a 80°C.

4.6. Dosagem de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. A leitura no espectrofotômetro foi monitorada no comprimento de onda de 595 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho, foram analisados os complexos enzimático de amiloglicosidase excretado por *Aspergillus awamori* em fermentação líquida sob agitação de 150rpm à 30°C, utilizando diferentes substratos indutores tais como: fécula de mandioca, cará roxo, cará branco e a batata-doce. A Figura 1 demonstra os resultados obtidos referentes as medidas de atividades enzimáticas (U/mL) em função do tempo de fermentação líquida(horas). Os níveis mais elevados de atividade amiloglicosidase em U/mL foram detectados em 108 horas de cultivo em meio suplementado com batata doce e fécula de mandioca, com valores respectivos de 8,43 e 3,50 U/mL e o pico de produção em meios suplementados com cara roxo e cará branco foram de 60 e 84 horas respectivas com 3,03 e 5,76 U/mL de atividade amiloglicosidase. Gonçalves et al. 2008, utilizando *Thermomyces lanuginous* T03 obteve 6 U/mL de amiloglicosidase com 168h de cultivo utilizando maltose como substrato. A partir destes resultados detectamos que utilizando substrato complexo como batata doce obtivemos atividades 40,5% superiores aos detectados por Gonçalves et al. 2008.

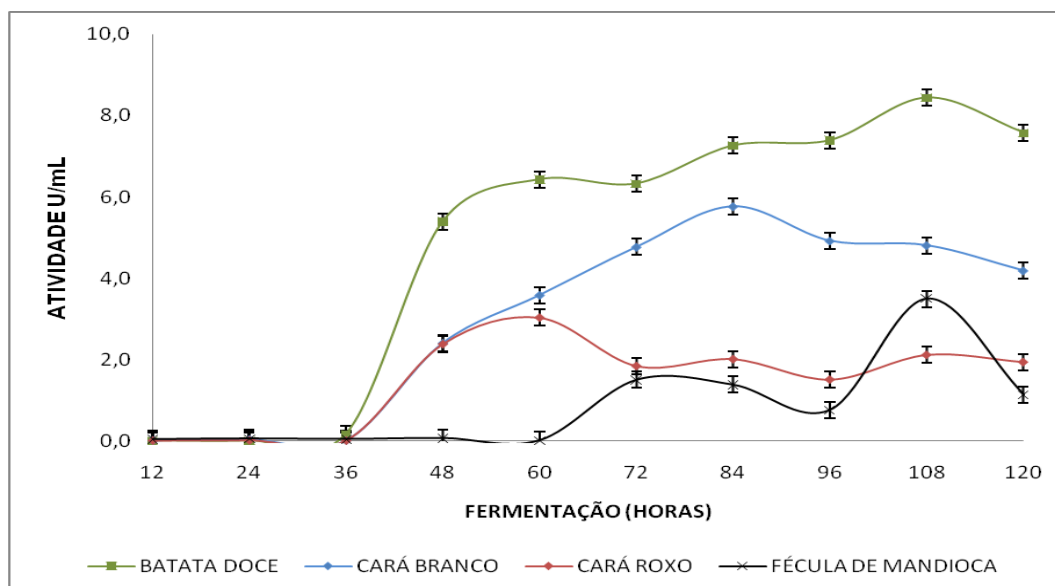


Figura 1: Medida da atividade enzimática em U/mL com diferentes substratos amiláceos.

Analisando a Figura 1, que relaciona a medida de atividade enzimática com o tempo de fermentação durante as 120 horas de fermentação, os resultados demonstram que nesse período a batata-doce apresentou maior atividade enzimática, quando comparada com as demais fontes amiláceas.

Em meios fermentados utilizando batata doce, cará branco e cará roxo o complexo amiloglicosidase apresentou pH ótimo igual à 4 e em meio com fécula de mandioca como fonte de carbono foi possível detectar um pH ótimo igual à 3,0 (Figura 2)

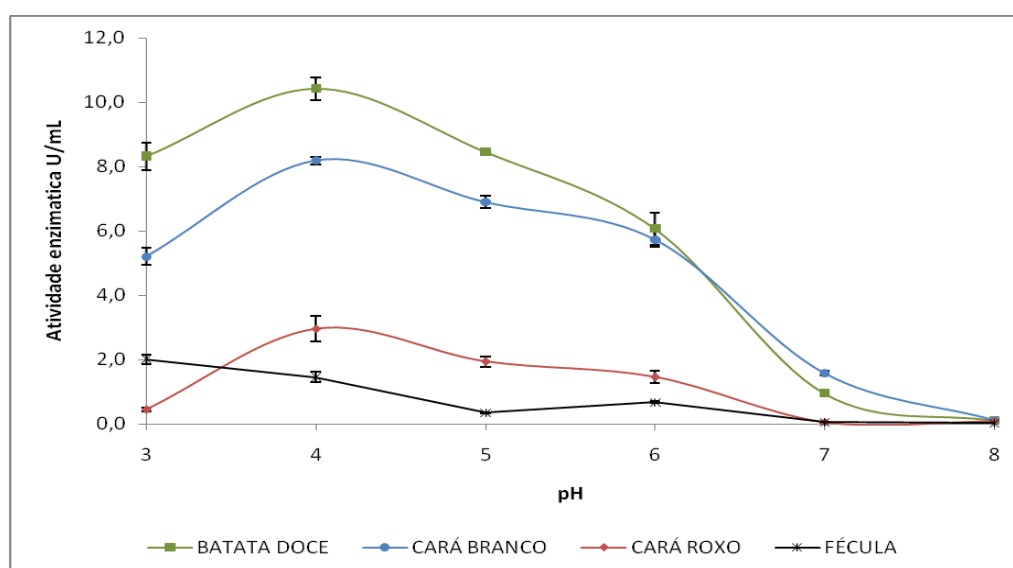


Figura 2: Atividade catalítica de glicoamilase em diferentes pHs.

Um fator fundamental para o processo de caracterização do complexo enzimático é a determinação da temperatura ótima. Para determinarmos este parâmetro todos os complexos enzimáticos foram incubados em temperaturas de 30 à 80°C, no seus respectivos pH ótimos, anteriormente detectados. A figura 3, ilustra estes resultados, para os quais obtivemos temperaturas ótimas de 40°C em complexos glucoamiláceos obtidos de fontes suplementadas com fécula de mandioca, cará roxo e cará branco, entretanto para batata doce foi detectado uma temperatura ótima de 60°C.

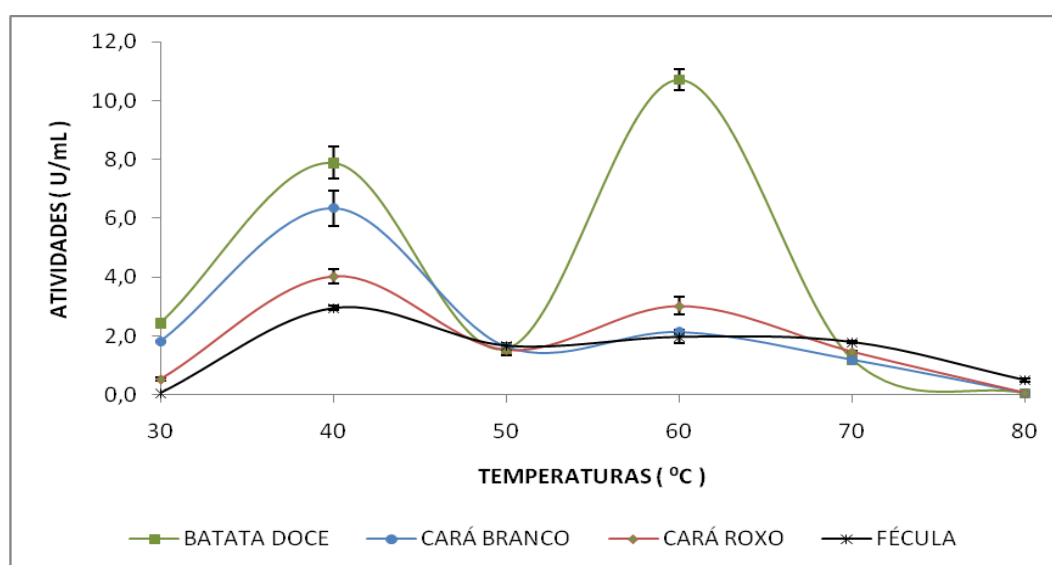


Figura 3: Diferentes estabilidades térmicas de incubação para amiloglicosidase por *Aspergillus awamori*.

Estudos realizados por REED, (1975) citado em COSTA, (1996), defendem através de seus ensaios laboratoriais com microrganismos produtores de glicoamilase, que a temperatura ótima dessas enzimas se encontra na maioria das vezes entre 50 e 60 °C. O mesmo é citado por BAHAR E ÇELEBI (1998).

A Figura 3, responde a várias hipóteses aqui levantadas pelo fator temperatura em nosso grupo de pesquisa para este fungo filamentoso em questão. Já que a temperatura é uma propriedade física que interfere muito na estabilidade da matéria. Pois muitos cientistas como LEHNINGER; NELSON; COX, (1993), citam que dependendo da temperatura do sistema, as

moléculas podem ganhar ou perder energia, alterando seu grau de agitação e muitas vezes perdendo a estabilidade. Altas temperaturas rompem ou modificam interações fracas que estabilizavam a conformação nativa da proteína (enzima), com isso, ela muda sua estrutura tridimensional, perdendo a função desejada.

Os resultados experimentais exemplificam que a temperatura ótima de amiloglicosidase produzida por *Aspergillus awamori* no substrato amiláceo de batata doce, apresentou uma catálise eficiente à reação de sacarificação deste amido dentro de uma faixa de temperatura à 60°C. Silva, Asquieri e Fernandes (2005) confirmam dados da literatura em seus trabalhos com a estabilidade de 60°C para *Aspergillus niger*. Moreira et al (1999), descreve em seu trabalho que a enzima glicoamilase apresenta estabilidade por mais de 10 horas entre temperaturas de 50°C e 60°C.

Fonte de Carbon	Tempo de fermentação (Horas)	Atividade enzimática (U/mL)	Concentração de proteína (U/mL)	Atividade Especifica (U/mg proteína)
Batata doce	108	8.44	47.00	179.5
Cará branco	84	5.76	36.00	160.1
Cará roxo	60	3.01	26.10	115.6
Fécula de mandioca	108	3.50	10.50	332.9

Tabela 1. Medida da concentração de proteína e atividade especifica de diferentes fontes de carbono.

A tabela 1, ilustra o resultados da concentração protéica extracelular e a da atividade específica obtidas nos diferentes complexos amiloglicosidásicos excretados por *Aspergillus awamori* nas condições do presente estudo. Devido às variações das concentrações protéica extracelular, obtivemos em ordem crescente de atividades específicas, os complexos enzimáticos fermentados por *A. awamori* utilizando as seguintes fontes de carbono cará roxo (115.6 U/mg proteína), cará branco (160.1 U/mg proteína), batata doce (179.5 U/mg proteína), e fécula de mandioca (332.9 U/mg proteína).

6. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento desta pesquisa e base nos resultados experimentais, obtidos podemos concluir que o fungo *Aspergillus awamori* fermentado em meio líquido agitado 150 rpm a 30°C, utilizando Batata doce, Cará branco, Cará roxo e Fécula de mandioca como fonte de carbono para produção de amiloglicosidase apresentou:

- Picos de produção correspondentes á 108 horas para batata doce e fécula de mandioca, 84 horas para cará branco e 60 horas para cará roxo;
- Dentre os quatro substratos amilolíticos testados a batata doce apresentou maiores valores de atividades enzimáticas em U/mL com 2,5 vezes superiores aos valores da fécula de mandioca e apresentando atividade especifica inferior á 1,85 vezes;
- Batata doce obteve pH ótimo 4,0 e temperatura ótima 60°C;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, N.; AYALA, A. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae*, *Scutellonema bradys*, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* on *Dioscorea rotundata*. **Journal of Nematology**, Jay, v.7, n.1, p. 1-5, 1975.

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.

ALMEIDA, P.F. DE, **Processamento e caracterização da puba**. Campinas, 1992. 115p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

AUNSTRUP, K. Production, isolation, and economics of extracellular enzymes. In: WINGARD, L.B.Jr; KATCHALSKY-KATZIR, E.; GOLDSTEIN, L. Applied Biochemistry and Bioengineering, Enzyme Technology. Academic Press, N.Y., v.2, 1979, p.27-69.

BAHAR. T.; CEBELI, S.S. Characterization of glucoamilase immobilized on magnetic poly(styrene) particles. Enzyme and Microbial Technology, v.23. p.301-304, 1998.

BORBA, M. A. **Efeitos de Alguns Parâmetros Operacionais nas Características Físicas, Físico-Químicas e Funcionais de Extrusados da Farinha de Batata-Doce (Ipomoea Batatas).** 2005. São Paulo, 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura – Luís Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

CAMARGO, A. P.; BOOCK, O. J. Influência do tamanho do tubérculo-semente na produção do cará. **Bragantia**, Campinas, v. 4, p.627-640, 1994.

CARVALHO, S.M.S.: **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Etanol em Meio Melaço-Vinhoto Empregando Leveduras Imobilizadas.** Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor pela Universidade Federal do Amazonas, UFAM em 2006.

CEREDA, M. P. **Importância das tuberosas tropicais. In: Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Gargil, 2001. v.2, p.13-25.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mandioca e Fruticultura.** <http://www.cnpmf.embrapa.br> (12 set. 2002).

FILGUEIRA, Fernando A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 2000. p. 355-361.

GOLDEMBERG, J. **A modernização do uso da biomassa.** CENBIO Notícias, São Paulo, n. 13. p. 2-3, 2001.

GONÇALVES, A.Z.L., Carvalho, A.F.A., Silva, R., Gomes, E. Localization and Partial Characterization of Thermostable Glucoamylase Produced by Newly Isolated *Thermomyces lanuginosus* T03 in Submerged Fermentation, 2008.

HEADON, D.R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. *Bitechnology Advances*, v.12, n.4, p.635-646, 1994

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em <<http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam2001.shtm>>. Acessado em: 15 de fevereiro de 2005.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of Biochemistry**, 1993. 2nd ed., Worth Publishers, New York, 1013p.

LEONEL, M. CEREDA, M.P. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. **Cienc. Tecnol. Alimentos.**, v. 36, p. 3-35, 2000.

MENEZES, Tobias J. B. **Etanol, O combustível do Brasil**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. 95p.

MONTALDO, A. **Cultivo de Raíces Y Tubérculos Tropicales**. IICA; San José, 1991. 408p.

MOREIRA, F.G.; LIMA, F.A.; PEDRINHO, S.R.F. Production of amylases by *Aspergillus tawarii*. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, v.30, n.2 abr./jun. 1999

PANDEY, A. E RADHAKRISHNAM, S. (1993), The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 305-309.

REED, G. **Enzyme in food processing**. 2. Ed. New York: Academic Press Inc., 1975. P. 62-87.

REGULY, J. C. (1996), *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*, v. 1 Editora da UFPel, Brasil.

REGULY, J. C. (2000), *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*, v. 3, Editora da UFPel, Brasil.

ROSENTHAL, F.R.T.; PELEGRINO, S.L.; CORRÊA, A.M.N. Studies on the starches of Dioscorea. *Starch/Starke*, Wein, v.24, p.55-58, 1972.

SAVELLI, R. A.; PADUA, T.S.; DOBRZYCKI, J. H.; CAL-VIDAL, J. **Análise texturométrica e microestruturais de pães franceses, contendo farinha de batata-doce.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 30, n. 3 , mar. 1995. p: 395-400.

SHAH, D.N; SHAH, N.K.; KOTHARI, R.M. Isolation of a transglucosidase-nonproducing mutant of *Aspergillus awamori* yielding improved quality and production of amyloglucosidase preparations. *Journal of Industrial Microbiology*, v.2, n.3, p. 175-180, 1987.

SHAH, N.K.; SHAH, D.N.; UPADHYAY, C.M.; NEHETE, P.N.; KOTHARI, R.M.; HEDGE, M.V. An economical, upgraded, stabilized and efficient preparation of amyloglucoamylase. *Journal of Biotechnology*, v.10, p.267-275, 1989.

SILVA, R.N.; ASQUIERI, E.R.; FERNANDES, K.F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1155-1159, 2005.

URBANECK. C.T SILVEIRA M. A. Quantificar a produtividade de álcool combustível a partir de clones de Batata-doce selecionados no Estado do Tocantins. **Anais I Congresso Científico Universidade Federal do Tocantins**, Palmas, 2005.

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	2008					2009						
		Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Revisão de Literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Coleta de materiais amiláceos	R		R		R		R		R			
	Tratamento da matéria-prima	R		R		R		R		R			
	Delineamento dos ensaios e montagem do experimento	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
	Linhagem, cultivo e manutenção			R	R	R	R	R	R	R	R		
	Ensaio de laboratório	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	Medidas de atividade enzimática			R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	Dosagem de proteína		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	pH e temperatura							R	R	R	R	R	
	Análise de dados	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	Preparação do relatório e apresentação final												R

R= realizado