

## UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE POR *Aspergillus awamori*

### AGROINDUSTRIAL WASTES UTILIZATION TO GLUCOAMYLASE PRODUCTION BY *Aspergillus awamori*

Lais dos Santos<sup>1</sup>; Valesca Kotovicz<sup>2</sup>; Ana Cláudia Barana<sup>3</sup>; Mareci Mendes de Almeida<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – Campus Paraíso - E-mail:

[dosantos.lais@yahoo.com.br](mailto:dosantos.lais@yahoo.com.br)

<sup>2,3,4</sup> Universidade Estadual de Ponta Grossa

#### Resumo

*O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de amiloglucosidase por Aspergillus awamori NRRL 3112 em meio sólido, utilizando-se como substrato resíduo do processamento de batata e de cenoura. Para avaliação da produção da enzima, foram utilizados diferentes teores de umidade, nitrogênio e fósforo no meio de cultivo. Em todos os ensaios realizados os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos com o meio composto por resíduo do processamento de batata. Nos ensaios que consideraram a variação dos teores de umidade e composição do meio, o melhor resultado obtido foi no meio com resíduo de batata com 30 % de umidade, com atividade de 141,38 U mL<sup>-1</sup>. Nos ensaios com adição de fontes de nitrogênio e/ou fósforo, também se avaliou a necessidade de correção do pH do meio e os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos com meio composto por resíduo do processamento de batata sem correção de pH, com 801,66 e 875,00 U mL<sup>-1</sup>, para o ensaio sem adição de fonte de nitrogênio e fósforo e para o ensaio com adição de 0,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por 50 g de meio, respectivamente.*

**Palavras - chave:** amiloglucosidase, resíduo de batata (*Solanum tuberosum*, L.), resíduo de cenoura (*Daucus carota*, L.), fermentação em estado sólido, *Aspergillus awamori*.

#### 1 Introdução

Devido à elevada demanda pela industrialização e conseqüente exploração dos recursos naturais, uma quantidade muito grande de resíduos tem se acumulado no meio ambiente. Estes resíduos têm composições diversas podendo ser compostos orgânicos ou inorgânicos, cadeias com alto ou baixo peso molecular, ser de fase sólida, líquida e/ou gasosa. Na maioria das vezes os resíduos são complexos, apresentando composição combinada de diferentes compostos.

Alguns resíduos podem ser reciclados, como certos materiais plásticos, metálicos, cerâmicos e celulósicos, evitando seu descarte no meio ambiente. Resíduos orgânicos que não são reciclados podem ser aproveitados, em muitos casos, como ingredientes em formulações de novos produtos e, por processos biotecnológicos, podem ser valorizados quando utilizados como substratos para a geração de produtos com elevado valor agregado, como enzimas e antibióticos. A aplicação de resíduos agroindustriais em processos de Fermentação em Estado Sólido (FES), não apenas representa um substrato alternativo, mas também ajuda a reduzir os custos de fabricação de produtos com elevado valor agregado e a resolver problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos (BOTELLA et al, 2007; KAMMOUN et al, 2008).

Enzimas amilolíticas têm grande importância em biotecnologia, apresentando largo campo de aplicação. São utilizadas na indústria de panificação para dar a estes produtos um volume maior, melhorar a cor e a maciez. Na produção de glucose as amilases são usadas para hidrolisar as macromoléculas constituintes do amido. Nas indústrias de papel utilizam-se amilases para a proteção do mesmo contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final. Amilases também têm sido utilizadas em alimentos para bebês e adicionadas aos cereais para baixar sua viscosidade e em fábricas de cerveja para produzir cerveja clara (NOROUZIAN et al., 2006). A amiloglicosidase ( $\alpha$ -D-1,4 glicanglicohidrolase), também conhecida como glucoamilase (EC 3.2.1.3), é uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 das extremidades não redutoras do amido, transformando-o em glucose. A síntese de amiloglicosidase é regulada pelos mecanismos de indução e repressão catabólica. A indução é ocasionada pela presença de amido ou polissacarídeos derivados do amido, enquanto a repressão é resultante da presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como é o caso da glucose (NATARAJAN; SIERKS, 1996; PAMBOUKIAN et al., 1998; MINAMI et al., 1999; ANTO et al., 2006).

O *Aspergillus awamori* é um microrganismo muito utilizado industrialmente para a produção de enzimas como amiloglicosidase, alfa-amilase e protease, podendo excretar mais de 20 g L<sup>-1</sup> de amiloglicosidase. Outra vantagem importante é que esse microrganismo é considerado seguro, não tóxico e não patogênico para a fabricação de produtos alimentícios destinados ao consumo humano (CUI et al., 1998).

A FES é definida como sendo uma fermentação envolvendo substratos sólidos com teor de umidade suficiente para o crescimento e metabolismo dos microrganismos (PANDEY, 2006). No estudo de processos fermentativos, a otimização das variáveis, principalmente parâmetros físicos e químicos, são de extrema importância devido ao seu impacto na economia e viabilidade técnica do processo (KAMMOUN et al, 2008).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção da enzima amiloglucosidase de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 por (FES) em substrato composto por resíduos do processamento de batata e de cenoura.

## 2 Material e Métodos

Foi utilizada cultura pura do microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112, sendo a cepa mantida em meio BDA (Batata Dextrose Agar), sob temperatura de 4 °C. Como substrato utilizou-se resíduos do processamento de batata e cenoura gerados numa empresa da região. Foram coletados quatro lotes de resíduo.

### *Produção de glucoamilase*

Os substratos (resíduos de batata e cenoura) foram preparados separadamente ou combinados em partes iguais. Foram previamente esterilizados em autoclave por 15 min à 121 °C. Uma suspensão de esporos na ordem de  $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup> foi inoculada em 50 g de meio contido em erlenmeyer de 250 mL e o sistema incubado a 30 °C por 72 h, sem agitação.

Após o crescimento celular e produção da enzima o meio fermentado foi centrifugado e do sobrenadante foram retirados 10 mL que consistiram no extrato enzimático. Nos ensaios para analisar diferentes teores de umidade, aos meios fermentados foram acrescentados 100 mL de água destilada, homogeneizados com posterior agitação a 180 bpm (batidas por minuto) em mesa agitadora pelo período de meia hora para maceração, sendo o meio macerado e filtrado em papel para se obter o extrato enzimático. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### *Ensaio com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90 %*

Para se obter os teores de umidade desejados, os resíduos foram secos em estufa a 48 °C durante 24 horas, triturados e a granulometria foi homogeneizada por passagem do material em peneira de 60 mesh. A umidade foi ajustada com adição de água deionizada e posteriormente foram pesados 50 g de resíduo em frascos erlenmeyer, que serviram como fermentadores.

Foram preparados meios com teores de umidade de 30, 50, 70 e 90 %.

## *Ensaio com meios suplementados com fontes de nitrogênio e fósforo*

Nos ensaios realizados com suplementação de fósforo e nitrogênio, utilizou-se fosfato de sódio dibásico como fonte de fósforo, na concentração de 7,6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ kg}^{-1}$  de meio (ZALDIVAR-AGUERO et al., 1997) e sulfato de amônia, como fonte de nitrogênio, na concentração de 1,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ kg}^{-1}$  de meio (CHIQUETTO, 1991). Com o objetivo de verificar a necessidade de correção do pH após adição dos suplementos, estes ensaios foram realizados com e sem correção de pH do meio antes da fermentação. Para que se obtivesse pH igual a 5,0 utilizou-se  $\text{NaOH } 1,5 \text{ mol L}^{-1}$  ou  $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$  de acordo com a necessidade. O meio de batata apresentou umidade de 89,4 % e o de cenoura de 92,78 %.

Para avaliar a significância dos fatores variados nesse experimento, fez-se o cálculo da média e dos efeitos para comparação dos dados.

### *Métodos analíticos*

#### *Caracterização do substrato*

As análises de caracterização do substrato foram realizadas segundo as seguintes metodologias: açúcares redutores (SOMOGYI, 1952), glucose (PAMBOUKIAN et al., 1998), fósforo (SILVA, 1981), fibras (ASCAR, 1985), umidade, cinzas lipídeos e nitrogênio (IAL, 1985), teor de carbono (ADAMS, 1951) e teor de amido, calculado por diferença.

#### *Determinação da atividade enzimática*

A reação enzimática foi realizada a 60 °C por 1 hora, com quantidade equivalente de extrato enzimático e tampão acetato  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,2 com 4 % (p/v) de amido, utilizado como substrato. Um controle foi preparado separando-se 3 mL do extrato enzimático, que foram levados à fervura em tubos de ensaio pelo tempo de 15 minutos para inativação da enzima. Ao extrato inativado foram adicionados 3 mL de solução tampão acetato, pH 4,2, com 4 % (p/v) de amido.

A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de glucose em 1 mL de extrato enzimático por minuto nas condições padronizadas. A quantidade de glucose formada foi determinada pelo método GOD (*Gold Analisa Glucose* PP – Gold Analisa Diagnóstica Ltda/Brasil) e o resultado da atividade enzimática definido segundo a Equação I.

$$\text{Atividade enzimática (U mL}^{-1}\text{)} = \text{GDAE} - \text{GAAE}$$

Equação I

Onde:

GAAE – Teor de glucose sem a ação enzimática (µg)

GDAE – Teor de glucose depois da ação enzimática (µg)

### 3 Resultados e Discussão

Para avaliação da produção de amiloglucosidase nos resíduos do processamento de batata e cenoura foram realizados dois ensaios independentes que não permitem comparação entre os resultados dos mesmos, uma vez que o preparo dos substratos e a obtenção do extrato enzimático foram realizados de maneiras diferentes. Em um ensaio variou-se o teor de umidade dos substratos e no outro foi analisada a suplementação dos meios com fontes de nitrogênio e fósforo.

#### *Caracterização do substrato*

A empresa que doou os resíduos produz vegetais que, depois de embalados a vácuo, são esterilizados e não precisam de refrigeração. Esses resíduos provêm do descarte gerado na etapa de descascamento mecânico dos vegetais e vêm sendo depositados em silos e destinados à alimentação animal. As médias dos resultados de caracterização dos lotes, expressos em base úmida, estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias dos resultados de caracterização dos resíduos utilizados.

Parâmetros	Resíduo de batata	Resíduo de cenoura
Umidade (%)	88,22	92,77
Cinzas (%)	0,69	1,00
Lipídeos (%)	0,29	0,19
Fibras (%)	0,60	1,31
Glucose (%)	0,01	0,20
Açúcares redutores (%)	0,47	0,18
Amido (%)	8,44	3,79
Fósforo (%)	0,02	0,03
Nitrogênio (%)	0,20	0,10
Razão C/P	3677,57	2291,66
Razão C/N	293,89	596,50

#### *Ensaio com meios com teor de umidade de 30, 50, 70 e 90%*

Analisando-se os resultados de atividade enzimática em meios de batata e de cenoura com diferentes teores de umidade, observa-se que o tipo de substrato foi o parâmetro que mais influenciou na atividade da amiloglucosidase (Tabela 2). Nos ensaios realizados com o resíduo do processamento de batata, a atividade enzimática apresentou valores maiores que nos demais ensaios. Obteve-se atividade enzimática de 141,38 U mL<sup>-1</sup>, no ensaio 1, com 30% de umidade.

Tabela 2 - Resultados dos ensaios com resíduo do processamento de batata e do processamento de cenoura em diferentes níveis de umidade

Ensaio	Umidade (%)	Resíduo utilizado	Atividade enzimática (U/mL)
1	30	Batata	141,38
2	50	Batata	134,53
3	70	Batata	138,78
4	90	Batata	99,68
5	30	Cenoura	4,57
6	50	Cenoura	65,98
7	70	Cenoura	21,48
8	90	Cenoura	52,57
9	30	Batata e cenoura	0,50
10	50	Batata e cenoura	1,15
11	70	Batata e cenoura	55,77
12	90	Batata e cenoura	40,22

Nos ensaios com resíduo do processamento de cenoura o melhor resultado de atividade enzimática obtido foi de 65,98 U mL<sup>-1</sup>, ensaio 6, com umidade de 50%. Nos ensaios com meios contendo 50% do resíduo de cenoura e 50% de resíduo de batata, o melhor resultado obtido, 55,77 U mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática, ensaio 11, foi com umidade de 70%.

A susceptibilidade do amido ao ataque enzimático é influenciada por vários fatores como concentração de amilose e amilopectina, tamanho de partícula, presença de inibidores da enzima e estrutura do grão (SHARIFFA et al., 2008). Como a síntese de amiloglucosidase é regulada pelos mecanismos de indução e repressão catabólica e a repressão pode ser resultante da presença de glucose, pode-se considerar que um dos fatores que contribuiu para inibir produção de enzima nos meios contendo resíduo do processamento de cenoura foi a presença de glucose em maior quantidade se comparado ao resíduo de batata (Tabela 1). Além disso, o resíduo de batata também continha maior teor de amido que o de cenoura, 8,44% e 3,29%, respectivamente, o que pode induzir a uma maior produção de amiloglucosidase.

#### *Ensaio com meios suplementados com fósforo e nitrogênio*

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos ensaios de suplementação com fósforo e nitrogênio aplicados aos meios com resíduo de processamento de batata e cenoura, com e sem correção de pH. O melhor resultado obtido foi no ensaio 6, onde a atividade enzimática foi de 875,00 U mL<sup>-1</sup>, com adição de 0,38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/50 g de meio, sem correção de pH, utilizando-se resíduo do processamento de batata e sem adição de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio.

Quando o resíduo do processamento de cenoura foi utilizado, a maior atividade enzimática obtida foi de 141,66 U mL<sup>-1</sup>, ensaio 2, onde foi adicionado 0,38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/50 g de meio, sem correção de pH e sem adição de sulfato de amônia.

Os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos em meios contendo resíduo do processamento de batata, fortalecendo a afirmação de que pode estar associado com a presença de maior teor de glucose no resíduo do processamento de cenoura.

A correção do pH para 5,0 mostrou ter efeito negativo na atividade enzimática.

Tabela 3 – Resultados dos ensaios realizados para avaliação da influência da suplementação com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com e sem correção do pH utilizando-se como meio resíduo do processamento de batata e resíduo do processamento de cenoura

Ensaio	Fósforo (gNa <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /50g de meio)	Nitrogênio (g(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /50g de meio)	Correção de pH para 5,0	Substrato	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )
1	0	0	Não	Cenoura	125,00
2	0,38	0	Não	Cenoura	141,66
3	0	0,11	Não	Cenoura	120,00
4	0,38	0,11	Não	Cenoura	23,33
5	0	0	Não	Batata	801,66
6	0,38	0	Não	Batata	875,00
7	0	0,11	Não	Batata	708,33
8	0,38	0,11	Não	Batata	561,66
9	0	0	Sim	Cenoura	30,00
10	0,38	0	Sim	Cenoura	30,00
11	0	0,11	Sim	Cenoura	33,33
12	0,38	0,11	Sim	Cenoura	40,00
13	0	0	Sim	Batata	105,00
14	0,38	0	Sim	Batata	53,33
15	0	0,11	Sim	Batata	193,33
16	0,38	0,11	Sim	Batata	145,00

Na Tabela 4 estão expostos os resultados dos cálculos dos efeitos dos fatores considerados nos ensaios.

Tabela 4 – Efeitos dos fatores dos ensaios da Tabela

	Batata	Cenoura
Fator	Efeito	Efeito
Suplementação com Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-43,33	-37,5
Suplementação com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-92,92	-69,17
Correção de pH	-612,50	-26,665
Suplementação com Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-54,17	21,67
Suplementação com Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + Correção de pH	-6,67	34,165
Suplementação com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Correção de pH	146,67	30
Suplementação com Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Correção de pH	55,84	67,92
Média	430,41	-18,34

Analisando-se esses resultados nota-se que o fator correção de pH apresentou efeito negativo e foi significativo tanto para o resíduo do processamento de batata quanto para o resíduo do processamento de cenoura.

Pessoa et al. (2003) pesquisaram a influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio e fósforo para produção de riboflavina, utilizando como meio de cultura subproduto do refino de óleos vegetais e o microrganismo *Candida guilliermondii* DM 644. Como fonte de nitrogênio, foi utilizada a uréia ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na proporção C/N igual a 4. Utilizou-se também  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fonte de fósforo na concentração de 0,2g/L e extrato de levedura na quantidade de 0,01g/L de meio. Constatou-se que a melhor produtividade média de riboflavina foi de 18,22  $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{dia}^{-1}$ , obtida quando o teor de nitrogênio e carbono estão em seus níveis superiores. Eles observaram também que houve uma importante interação entre a matéria graxa e fonte de nitrogênio. Quando se utilizou sal de amônio como fonte de nitrogênio, a produtividade média de riboflavina aumentou de 0,4 para 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{dia}^{-1}$  e, na presença de uréia, aumentou de 5,9 para 17 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{dia}^{-1}$ . Observou-se também que a fonte de nitrogênio orgânica, extrato de levedura, estimula a produção de riboflavina dez vezes mais que o sal de amônio quando a concentração de "borra" é 5 g L<sup>-1</sup> de meio. Com relação ao fósforo, ficou evidenciado que ele não estimulou a produção de riboflavina.

Maldonado et al. (1986) utilizaram cascas de limão previamente tratadas como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus* sp. Os resultados demonstraram haver um decréscimo acentuado no pH após 12 horas de processo, seguido por uma queda mais lenta do pH até 60 horas de fermentação. Este fato sugere que o uso de uma fonte inorgânica de nitrogênio, como sulfato de amônio, não seria indicada, sugerindo-se o emprego de fontes orgânicas de nitrogênio, como a uréia, com vistas a melhorias no rendimento e na produtividade do processo em questão.

Wang et al. (2008), avaliando a produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* por fermentação submersa, utilizando-se como substrato restos de alimentos coletados em um restaurante, concluíram que o meio enriquecido com extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaCl}_2$ , não apresentou aumento significativo na produção de amiloglucosidase.

#### 4 Conclusões

Analisando-se os resultados obtidos, observou-se que o microrganismo *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se desenvolveu em todos os meios utilizados e seu micélio apresentou aparência filamentosa.

Nas condições consideradas neste estudo, os resíduos do processamento de batata e de cenoura podem ser considerados boas fontes para a produção de amiloglicosidase, sendo que o resíduo do processamento de batata apresentou as maiores atividades da enzima. A utilização desses resíduos como fonte para produção de amiloglicosidase é possível, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a subprodutos da agroindústria.

## Abstract

*In this work, was evaluated the production of glucoamylase by Aspergillus awamori NRRL 3112, in solid state, using carrot and potato processing wastes. In the experiments with variation of humidity and composition, the best result was in the substrate with potato waste with 30% of humidity ( $141,38 \text{ U mL}^{-1}$ ), in the experiments with nitrogen and/or phosphorous addition, the best results had been gotten with potato processing waste, without pH correction ( $801,66$  and  $875,00 \text{ U mL}^{-1}$ ), for the experiment without addition of nitrogen and phosphorous source and for the experiment with addition of  $0,38 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ , respectively.*

**Key-words:** glucoamylase, potato waste (*Solanum tuberosum*, L.), carrot waste (*Daucus carota*, L.), solid state fermentation, Aspergillus awamori.

## Referências

ADAMS, R. C.; MACLEAN, F. S.; DIXON, J. K.; BENNETT, F. M.; MARTIN, G. I.; LOUGH, R. C. The utilization of organic wastes in N.Z.: second interim report of the inter-departmental committee". **New Zealand Engineering**, v. 15, p. 396-424, 1951.

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1161-1166, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.007>

ASCAR, J. M. **Alimentos: Aspectos bromatológicos e legais – Análise percentual**. São Leopoldo:[s.n.], v.1, p.327, 1985.

BOTELLA, C., DIAZ, A., ORY, I. WEBB, C., BLANDINO, A. Xilanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p.98-101, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025>

CHIQUETTO, M. L. **Estudo comparativo entre diferentes fontes de carbono e de nitrogenio na sintese de amiloglicosidade por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa**. 203 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, n.23, p.157-167, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

KAMMOUN, R., NAILI, B., BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5602-5609, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.045>

- MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A. E; CALLÍERI, D. A. S. Production of pectinases by *Aspergillus sp.* using differently pretreated lemon peel as the carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 7, p. 501-504, 1986. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01025209>
- MINAMI, N. M.; LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Characterization of clarified medium from submerge and semisolid cultivation of *Aspergillus awamori* NRRL3112 by size-exclusion chromatography. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66321999000200012>
- NATARAJAN, S. K.; SIERKS, M. R. Identification of enzyme-substrate and enzyme-product complexes in the catalytic mechanism of glucoamylase from *Aspergillus awamori*. **Biochemistry**, v. 35, p. 15269-15279, 1996. <http://dx.doi.org/10.1021/bi961355r>
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 80– 85, 2006.
- PAMBOUKIAN, C. R. D., FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 3, p. 265-272, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66321998000300004>
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- PESSOA, M. L. A.; ANDRADE, S. A. C.; SALGUEIRO, A. A.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* DM 644. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, 2003.
- SHARIFFA, Y. N., KARIM, A. A., FAZILAH, A., ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature **Food Hydrocolloids**. v. 23, n. 2, p. 434–440, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.009>
- SILVA, D. J. **Análise de alimentos – Métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária. 1981.
- SOMOGYI, N. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, n. 1, p. 19 – 23, 1952.
- WANG, Q., WANG, X., WANG, X., MA, H. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 280 -286. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.010>
- ZALDIVAR-AGUERO, J. M.; BALDINO JR, A. C., VILAÇA, P. R; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. influence of phosphate concentrations on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged culture **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66321997000400014>

---

Submetido em 22 mar 2011, Aceito para publicação em 13 dez. 2011.