

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASE POR *Aspergillus niger* EM  
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE DE  
CEVADA**

**RENAN CARLOS FREITAS DE LIMA**

ALEGRE, ES

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASE POR *Aspergillus niger* EM  
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE DE  
CEVADA**

**RENAN CARLOS FREITAS DE LIMA**

ALEGRE, ES

2019

**Renan Carlos Freitas de Lima**

**PRODUÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASE POR *Aspergillus niger* EM  
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE DE  
CEVADA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Linha de Pesquisa: Materiais, Bioprocessos e Meio Ambiente

Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Iara Rebouças Pinheiro

ALEGRE, ES

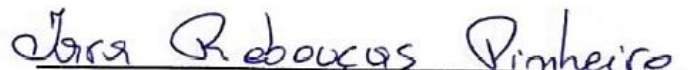
Fevereiro, 2019

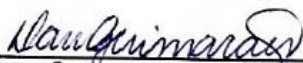
**PRODUÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASE POR *Aspergillus niger*  
EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO  
DE MALTE DE CEVADA**

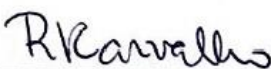
**Renan Carlos Freitas de Lima**


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Examinado em 11 de fevereiro de 2019.

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iara Rebouças Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Damaris Guimarães  
Universidade Federal do Espírito Santo

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Vieira de Carvalho  
Universidade Federal do Espírito Santo

P/   
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

L732p Lima, Renan Carlos FREITAS de, 1992-  
Produção da enzima  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada. / Renan Carlos FREITAS de Lima. - 2019.  
98 f. : il.

Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas. 3. Biotecnologia. 4. Fermentação. I. Pinheiro, Iara Rebouças. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 66.0

---

*“A quem chora por mim, lembre-se de minha  
alegria e conforto seu coração.*

*Aos que sofrem por minha ausência estarei em  
seus sorrisos”.*

***Vó Alice***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me guiar nessa difícil e árdua caminhada e por sempre me abençoar em todas as minhas escolhas da vida.

Aos meus amados pais, Vitalina Mara Freitas de Lima e Silvio Carlos de Lima, por todo amor, apoio, disponibilidade e ensinamentos durante toda minha caminhada acadêmica.

Ao meu irmão Arthur Freitas de Lima por estar sempre ao lado em todas as decisões e todo companheirismo.

À minha namorada Emanuely Zanotti Hoffman Peixoto por estar presente em todo meu mestrado me ajudando em todas as etapas, me motivando e fazendo o impossível para eu não deixar de sonhar.

À minha orientadora professora Dra. Iara Rebouças Pinheiro por cair de cabeça nesse desafio junto a mim e por toda motivação e disponibilidade em orientação. Você abriu muitos caminhos para mim durante toda a faculdade e mestrado. Sou eternamente grato.

Aos meus demais amigos que sempre me mantiveram com o sorriso no rosto e nunca deixaram o desânimo falar mais alto.

A Universidade Federal do Espírito Santo por toda oportunidade de crescimento e desenvolvimento do presente trabalho.

A toda banca examinadora, composta pela Profa. Dra. Damaris Guimarães, Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Vieira de Carvalho e Prof<sup>a</sup>. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra. Obrigado por todas sugestões e considerações sobre o trabalho.

A cervejaria Prata e Usina Paineiras por ceder toda matéria prima necessária para a realização do trabalho.

Ao NUDEMAFI por ceder o microrganismo responsável por toda fermentação do trabalho e todas informações pertinentes.

Ao laboratório de Solos, laboratório de Operações Unitárias, laboratório de Química de Alimentos e laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFES/CCAIE, por toda infraestrutura cedida para a realização das análises.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

LIMA, Renan Carlos Freitas de. **Produção da enzima  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Iara Rebouças Pinheiro.

O objetivo do presente trabalho foi apresentar uma alternativa para a produção da enzima  $\alpha$ -amilase pelo fungo *Aspergillus niger* por meio da fermentação no estado sólido. O resíduo sólido da indústria cervejeira, o bagaço de malte de cevada, foi empregado como substrato da fermentação combinado com um suporte inerte de bagaço de cana-de-açúcar. Para a caracterização do substrato da fermentação, foram realizadas as análises de teor de água, proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e minerais de fósforo, cálcio, magnésio e potássio. Para a fermentação no estado sólido, realizou-se um estudo usando um planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR), para determinar as melhores condições da atividade enzimática variando a umidade da matriz sólida (60 a 85 %), o tempo de fermentação (48 a 168 horas) e a porcentagem de substrato na matriz sólida (50 a 90 %). Realizou-se a cinética de fermentação para validação dos valores obtidos pelo planejamento experimental. Avaliou-se o efeito do pH na atividade enzimática através da extração do complexo enzimático na faixa de pH entre 4,0 e 9,0, além de avaliar a estabilidade da enzima com o tempo de armazenamento de 24 e 48 horas após a etapa da extração. Otimizou-se o processo de hidrólise do amido solúvel pela ação das enzimas extraídas pelo método de DCCR, variando os fatores temperatura (50 a 80 °C) e o tempo de hidrólise (5 a 30 min). A caracterização da composição do resíduo sólido da indústria cervejeira, apresentou teor de proteínas de  $16,13 \pm 0,15$  % e teores de carboidratos de  $70,58 \pm 0,97$  % qualificando-o como um promissor resíduo com excelentes fontes de substratos para fermentação no estado sólido. A cinética da hidrólise do amido pela  $\alpha$ -amilase foi realizada em diferentes concentrações de substrato (0; 5; 7,5; 10; 20; 30; 40 e 50 g/L) para determinar os valores da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). As condições ótimas para a fermentação no estado sólido foram de 80 % de umidade, 102,1 horas de fermentação e 85,9 % de substrato, obtendo 618,20 U/gMS. Os dados ótimos para a produção de  $\alpha$ -amilase foram validados, obtendo-se o valor de  $622,25 \pm 33,76$  U/gMS. Os pHs de 4,0 e 4,5

apresentaram maior atividade com valores de 1454,9-1421,2 U/gMS, respectivamente. Após o armazenamento por 24 horas e 48 horas as atividades de  $\alpha$ -amilase reduziram em média 4,57 % e 10,43 %, respectivamente. No processo de hidrólise do amido pela enzima  $\alpha$ -amilase, as variáveis temperatura e tempo tiveram condições ótimas de 68 °C e 5 min, respectivamente, apresentando valor máximo de atividade enzimática de 2699,22 U/gMS. Os valores de  $K_m = 5,60$  g/L e  $V_{m\acute{a}x} = 1,216$   $\mu$ mol/mL/min foram determinados pelos estudos de cinética enzimática.

Palavras-chave:  $\alpha$ -amilase; fermentação em estado sólido; bagaço de malte de cevada; cinética enzimática.

## ABSTRACT

LIMA, Renan Carlos Freitas de. **Production of the  $\alpha$ -amylase enzyme by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using brewer's spent grain.** 2019. Dissertation (Master degree in Chemical Engineering) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Iara Rebouças Pinheiro.

The objective of the present work was to present an alternative for the production of  $\alpha$ -amylase enzymes by *Aspergillus niger* fungus through solid-state fermentation. The solid residue of the brewing industry, the brewer's spent grain, was used as the fermentation substrate combined with an inert support of sugarcane bagasse. In order to characterize the fermentation substrate, analyzes of water, protein, lipids, carbohydrates, ashes and phosphorus, calcium, magnesium and potassium were realized. For the solid-state fermentation, a study was performed using an experimental of Central Composite Rotational Design (CCRD) in order to determine the best conditions of the enzymatic activity varying the solid matrix moisture (60 to 85%), the time (48 to 168 hours) and the percentage of substrate in the solid matrix (50 to 90%). Fermentation kinetics were performed to validate the values obtained by the experimental design. The effect of pH on the enzymatic activity was evaluated by extracting the enzyme complex in the pH range between 4.0 and 9.0, besides evaluating the stability of the enzyme with storage time of 24 and 48 hours after the extraction. The hydrolysis of the soluble starch was optimized by the action of the enzymes extracted by the DCCR method, varying the temperature factors (50 to 80 °C) and the hydrolysis time (5 to 30 min). The characterization of the solid residue composition of the brewing industry presented a protein content of  $16.13 \pm 0.15$  % and carbohydrate contents of  $70.58 \pm 0.97$  %, qualifying as a promising residue with excellent sources of substrates for fermentation in solid state. The kinetics of amide hydrolysis by  $\alpha$ -amylase were performed at different concentrations of substrate (0, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 and 50 g/L) to determine the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and the maximum speed ( $V_{max}$ ). The optimal conditions for solid state fermentation were 80% moisture, 102.1 hours fermentation and 85.9% substrate, obtaining 618.20 U/gMS. The optimum data for  $\alpha$ -amylase production were validated, obtaining a value of  $622.25 \pm 33.76$  U/gMS. The pHs of 4.0 and 4.5 presented higher activity with values of 1454.9-1421.2 U/gMS, respectively. After storage for 24 hours and 48 hours  $\alpha$ -amylase activities reduced on average 4.57% and 10.43%,

respectively. In the  $\alpha$ -amylase hydrolysis process, the temperature and time variables had optimal conditions of 68 °C and 5 min, respectively, with a maximum enzymatic activity of 2699.22 U/gMS. The values of  $K_m = 5.60$  g/L and  $V_{max} = 1.216$   $\mu\text{mol/mL/min}$  were determined by enzymatic kinetics.

Keywords:  $\alpha$ -amylase; solid state fermentation; brewer's spent grain; enzymatic kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da cadeia da amilose (A) e amilopectina (B). .....	21
Figura 2 – Classificação das enzimas amilolíticas. ....	21
Figura 3 – Esquema de ação da $\alpha$ -amilase nas estruturas da amilose e amilopectina. ....	22
Figura 4 – Comportamento da velocidade inicial em função da concentração de substrato. ....	27
Figura 5 – Colônia de <i>Aspergillus niger</i> após 4 dias de incubação.....	31
Figura 6 – Morfologia da espécie <i>Aspergillus niger</i> . ....	31
Figura 7 – Esquema do biorreator do tipo bandeja. ....	36
Figura 8 – Esquema coluna de Raimbault. ....	37
Figura 9 – Biorreatores com aeração superficial e agitação. (a) biorreator de tambor rotativo. (b) biorreator de tambor agitado. ....	38
Figura 10– Produção nacional de cerveja em milhões de hectolitros por ano. ....	41
Figura 11 – Malte de cevada produzido sob diferentes condições de malteação. ....	43
Figura 12 – Fluxograma do processo de obtenção do bagaço de malte a partir do malte de cevada. ....	44
Figura 13 – Fluxograma das etapas envolvidas até se chegar ao objetivo desejado. ....	46
Figura 14 – Experimento de composição central com $\alpha$ igual a 2. ....	47
Figura 15 – Câmara de Neubauer.....	49
Figura 16 – Fotografia da suspensão de esporos em câmara de Neubauer de <i>Aspergillus niger</i> em microscópio ótico com lente de aumento 400X. ....	49
Figura 17 – Fluxograma para análise da atividade enzimática. ....	59
Figura 18 - Valores preditos versus valores observados, resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de $\alpha$ -amilase. ....	68
Figura 19 - Homogeneidade da variância, resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de $\alpha$ -amilase. ....	68
Figura 20 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e tempo de fermentação.....	70
Figura 21 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e tempo de fermentação.....	70
Figura 22 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e BM.....	71
Figura 23 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e BM.....	71
Figura 24 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis tempo de fermentação e BM.....	72
Figura 25 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis tempo de fermentação e BM.....	72

Figura 26 – Cinética da FES para produção de $\alpha$ -amilase. ....	73
Figura 27 – Perfil das curvas da atividade de $\alpha$ -amilase (●) produzida pelo <i>A. niger</i> nas condições otimizadas (70% BM, 80% umidade e 102,1 horas de fermentação) em intervalos de tempo de 24 horas e variação da umidade do meio (▲) a 30 °C. ....	75
Figura 28 – Atividade enzimática relativa em diferentes pHs durante 0, 24 e 48 horas de armazenamento. ....	77
Figura 29 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a caracterização da $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido. ....	80
Figura 30 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a caracterização da $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido. ....	80
Figura 31 – Superfície de resposta para o planejamento experimental da cinética de hidrólise de $\alpha$ -amilase. ....	81
Figura 32 – Curva de contorno para o planejamento experimental da cinética de hidrólise de $\alpha$ -amilase. ....	81
Figura 33 – Efeito da concentração de amido sobre a velocidade da reação catalisada pela $\alpha$ -amilase. ....	83
Figura 34 – Determinação de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ pelo método de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais. ....	84
Figura 35 – Estudo do perfil da velocidade de reação da atividade enzimática em relação a concentração de substrato de amido solúvel. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas que podem ser obtidos por FES a partir de diferentes substratos e microrganismo. ....	32
Tabela 2 – Composição química do bagaço de malte. ....	45
Tabela 3 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes para a fermentação. ....	57
Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental DCCR para a fermentação com os valores codificados e decodificados para os fatores $x_1$ , $x_2$ e $x_3$ . ....	58
Tabela 5 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes, para a hidrólise enzimática. ....	62
Tabela 6 – Planejamento experimental para hidrólise enzimática. ....	62
Tabela 7 – Tabela de composição centesimal do bagaço de malte. ....	64
Tabela 8 – Resultados do planejamento experimental para a FES para os fatores codificados. ....	66
Tabela 9 – Coeficientes de regressão do DCCR da FES para a produção de $\alpha$ -amilase. ...	66
Tabela 10 – ANOVA resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de $\alpha$ -amilase. ....	67
Tabela 11 – Valores otimizados codificados e decodificados. ....	69
Tabela 12 – Dados experimentais da cinética de fermentação nas condições ótimas. ....	73
Tabela 13 – Coeficientes de regressão para a cinética de produção de $\alpha$ -amilase. ....	74
Tabela 14 – ANOVA da regressão para a cinética de produção de $\alpha$ -amilase à 5% de significância. ....	74
Tabela 15 – Tabela de agrupamentos para o teste estatístico de Tukey. ....	76
Tabela 16 – Resultados do planejamento experimental da atividade da $\alpha$ -amilase para os fatores codificados. ....	78
Tabela 17 – Coeficientes de regressão do DCCR da caracterização da $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido. ....	79
Tabela 18 – ANOVA resultante do planejamento experimental da hidrólise enzimática para otimização da atividade de $\alpha$ -amilase. ....	79
Tabela 19 – Valores otimizados codificados e decodificados para a hidrólise de $\alpha$ -amilase. ....	82
Tabela 20 – Velocidade da $\alpha$ -amilase em reação com diferentes concentrações de substrato. ....	83

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1. Enzimas .....	19
3.1.1. Enzimas amilolíticas .....	20
3.1.2. Aplicação das enzimas amilolíticas na indústria .....	23
3.1.3. Cinética enzimática.....	25
3.2. Fermentação no Estado Sólido na produção de amilases .....	27
3.2.1. Microrganismos para FES .....	28
3.2.1.1. Gênero <i>Aspergillus</i> .....	30
3.2.2. Fatores que influenciam a FES.....	32
3.2.3. Biorreatores para FES .....	35
3.2.3.1. Biorreator tipo bandeja.....	36
3.2.3.2. Biorreator do tipo leito fixo.....	37
3.2.3.3. Biorreator do tipo tambor rotativo e agitado .....	37
3.2.4. Vantagens e desvantagens da FES .....	38
3.3. Resíduos agroindustriais.....	39
3.3.1. Resíduos da indústria cervejeira e suas aplicações .....	41
3.4. Planejamento experimental.....	45
3.4.1. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) .....	46
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
4.1. Microrganismo.....	48
4.1.1. Contagem de esporos .....	48
4.2. Preparo do substrato.....	50
4.3. Preparo do suporte.....	50
4.4. Caracterização do substrato .....	50
4.4.1. Granulometria.....	51
4.4.2. pH.....	51
4.4.3. Umidade .....	51
4.4.4. Teor de cinzas .....	52
4.4.5. Minerais .....	52
4.4.5.1. Fósforo.....	52
4.4.5.2. Cálcio .....	53
4.4.5.3. Magnésio.....	53
4.4.5.4. Potássio .....	54

4.4.6.	Proteína bruta.....	54
4.4.7.	Lipídeos.....	55
4.4.8.	Carboidratos.....	56
4.4.9.	Energia.....	56
4.5.	Preparo do meio mineral de suplementação para fermentação.....	56
4.6.	Cultivos em estado sólido.....	56
4.7.	Planejamento experimental DCCR.....	57
4.8.	Análises do substrato fermentado.....	59
4.8.1.	Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase.....	59
4.9.	Otimização e cinética de produção enzimática.....	61
4.10.	Efeito do pH na extração e na estabilidade da $\alpha$ -amilase.....	61
4.11.	Determinação das condições ótimas da hidrólise enzimática.....	61
4.12.	Caracterização cinética da $\alpha$ -amilase.....	63
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
5.1.	Caracterização do bagaço de malte.....	64
5.2.	Otimização das condições de fermentação.....	65
5.3.	Cinética da produção de $\alpha$ -amilase nas condições otimizadas.....	73
5.4.	Efeito do pH na extração e estabilidade da $\alpha$ -amilase.....	75
5.5.	Otimização das condições de hidrólise enzimática.....	78
5.6.	Estudo da cinética $\alpha$ -amilase.....	82
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem já utilizava enzimas para catalisar uma série de reações, mesmo sem dominar a tecnologia e o conhecimento desse produto. Segundo Sharma et al. (2001), através de uma melhor compreensão da bioquímica de produção, dos processos de fermentação, técnicas da engenharia genética, e métodos de recuperação, um número cada vez maior de enzimas pode ser produzido de forma acessível, tornando um grande atrativo para aplicação nas indústrias.

As  $\alpha$ -amilases (endo1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolase, EC 3.2.1.1) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na catálise do amido em cadeias menores, convertendo as moléculas de amilose e amilopectina em moléculas menores, como as maltoses e glicoses (EXPASY, 2018). Devido a tais características as  $\alpha$ -amilases são amplamente aplicadas em processos industriais, tais como, na indústria têxtil, indústria de papel, indústria de alimentos e bebidas e na indústria alcooleira (ALCALDE *et al.*, 2006). Com a finalidade de diminuir os custos dos processos e resolver os problemas ambientais de legislação, as enzimas produzidas estão cada vez mais substituindo reagentes químicos nocivos e causadores de tantos problemas ambientais, além de danos aos equipamentos industriais (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

As enzimas podem ser produzidas por via ou processos fermentativos, mais comumente por fermentação submersa, embora diversos estudos optam em produzi-las através da fermentação no estado sólido. Tal escolha pelo segundo método é devido ao baixo custo operacional e aumento da concentração enzimática como produto final (PANDEY, 2003; SPIER *et al.*, 2006).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo caracterizado pela ausência de água livre no meio, tendo condições de umidade necessária para que ocorra o desenvolvimento e crescimento celular no meio fermentativo. O microrganismo pode crescer sobre ou dentro de partículas de uma matriz sólida, enquanto a fermentação submersa (FS) é caracterizado pela atividade dos microrganismos submersos e que realizam suas etapas metabólicas em um meio aquoso (PANDEY, 1991).

Comparando a FES com a FS, encontram-se inúmeras vantagens para a primeira, principalmente quando os agentes de fermentação são os fungos filamentosos. Destaca-se na FES a condição de fermentação, já que este se

aproxima das condições dos habitats naturais desses microrganismos, apresentando baixa umidade do meio, que dificulta a contaminação, alta produtividade por volume de fermentado e conseqüentemente a fácil extração do produto. Além disso, torna-se interessante, do ponto de vista industrial, a possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de baixo custo, como substratos para geração de produtos de maiores valores agregados, como por exemplo, os inúmeros tipos de enzimas podendo substituir as tradicionais enzimas comerciais (RAIMBOUT,1998; MACIEL, 2006; SANTOS, 2007).

A partir do século XX, com as leis ambientais e fiscalizações mais severas, as grandes indústrias estão tomando ciência da importância do descarte consciente e responsável de seus resíduos (SANTAELLA et al., 2014). Uma das alternativas para o correto descarte dos resíduos é o reaproveitamento destes para obtenção de novos produtos. Casca de café, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de mandioca e bagaço de malte de cevada, são exemplos de subprodutos, de baixo valor comercial, que têm grande potencial para reutilização como insumos na produção de energia e produtos de interesses (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A indústria cervejeira no Brasil cresce a cada ano e se destaca no cenário mundial. Segundo Marcusso e Miller (2018), o país nos últimos anos vem desenvolvendo um enorme papel dentre os maiores produtores de cerveja global, chegando, em 2016, na marca de 138 milhões de hectolitros e se tornando o terceiro maior produtor mundial. A produção de resíduo na indústria cervejeira é alta, atingindo cerca de 1/5 na proporção de quilo de bagaço de malte por litro de cerveja produzido (MUSSATTO; ROBERTO, 2006), tornando-o, assim, um subproduto atrativo para estudos na área de reaproveitamento, podendo ser utilizado como substrato para fermentações (SPIER *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho tem o intuito de realizar o reaproveitamento de um subproduto, oriundo da indústria cervejeira, como substrato de uma fermentação no estado sólido, para a produção de  $\alpha$ -amilase com alto potencial de aplicação biotecnológica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a otimização das condições de produção de  $\alpha$ -amilases por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido.

### 2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o bagaço de malte de cevada quanto à sua composição centesimal;
- Realizar estudos em frascos de erlenmeyers utilizando resíduo de bagaço de malte em diferentes condições de umidade, concentração de substratos e tempo de cultivo e otimizar as condições de cultivo aplicando as técnicas de planejamento experimental e superfície de resposta
- Avaliar o perfil cinético da atividade de  $\alpha$ -amilases na condição ótima determinada;
- Estudar o efeito em uma ampla faixa de pH quanto à estabilidade das  $\alpha$ -amilases e selecionar o pH ideal para a extração das enzimas;
- Otimizar, as condições de hidrólise do substrato de amido utilizando a técnica de planejamento experimental, tendo as variáveis de estudo temperatura e tempo de hidrólise;
- Realizar estudo da cinética enzimática em substrato de amido solúvel e determinar as velocidades iniciais da reação para cada concentração para a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ) aplicando as enzimas obtidas nas condições ótimas de fermentação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Enzimas

Os primeiros estudos sobre a natureza das enzimas, aconteceram no século XVIII quando foram estudadas as secreções do estômago na digestão da carne. No século seguinte, começaram os primeiros estudos da conversão do amido em açúcar pela saliva. Em 1831, um pesquisador químico sueco Jöns Jacob Berzelius constatou que certas substâncias tinham uma “força catalítica” que lhes permitia acelerar certas reações (LEHNINGER *et al.*, 2014). No ano de 1833, os famosos químicos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz encontraram uma substância que perdia suas propriedades com a temperatura no precipitado do álcool, extrato de malte, que convertia amido em açúcar. Primeiramente, foi chamada de diástase, mas atualmente é denominada por amilase (MORAN *et al.*, 2014).

As enzimas, por definição, são proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros por ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente, que apresentam atividade catalítica (LEHNINGER *et al.*, 2014). A velocidade de uma reação, termodinamicamente possível, é acelerada com a presença de enzimas específicas do processo, uma vez que a barreira energética é diminuída de forma significativa na presença dessas proteínas (HARGER, 1982). Atualmente, são catalogados mais de 6000 tipos de enzimas que ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples aos mais desenvolvidos (EXPASY, 2018).

Devido à ambiguidade e à grande quantidade de enzimas que são descobertas com o passar tempo, por meio de um acordo internacional, adotou-se o sistema de classificação de enzimas. Dividiu-se as enzimas em seis grandes grupos e subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam, apresentados no Quadro 1.

A cada enzima foi atribuído um “código EC” (Enzyme Commission) que contém 4 números separados por pontos (EC. W.X.Y.Z), em que W, X e Y representam, respectivamente, à classe, subclasse, sub-sub-classe e o número Z é específico de cada enzima (EXPASY, 2018).

Quadro 1. Classificação internacional das enzimas.

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hídrido ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água).
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

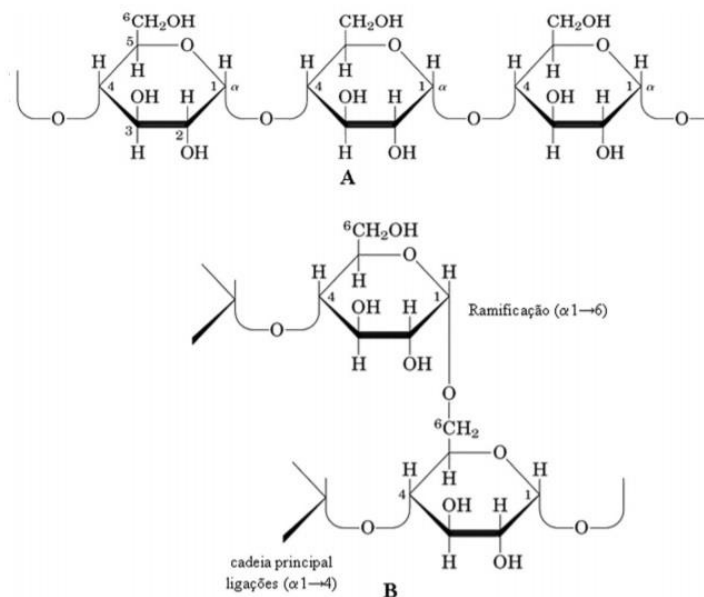
Fonte: Lehninger *et al.*, (2014).

### 3.1.1. Enzimas amilolíticas

As amilases têm sido relatadas mais amplamente em microrganismos, embora, também sejam encontradas em plantas e animais (PANDEY *et al.*, 2000). O termo amilase indica a hidrólise sobre o amido, que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) de cadeia linear, não ramificada, de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, e a amilopectina (80-85%), ramificada, menos hidrossolúvel que a amilose, constituída de aproximadamente 1400 resíduos de  $\alpha$ -glicose ligadas por pontes glicosídicas  $\alpha$ -1,4, e ligações  $\alpha$ -1,6 (HARGER, 1982). Suas estruturas orgânicas podem ser observadas na Figura 1.

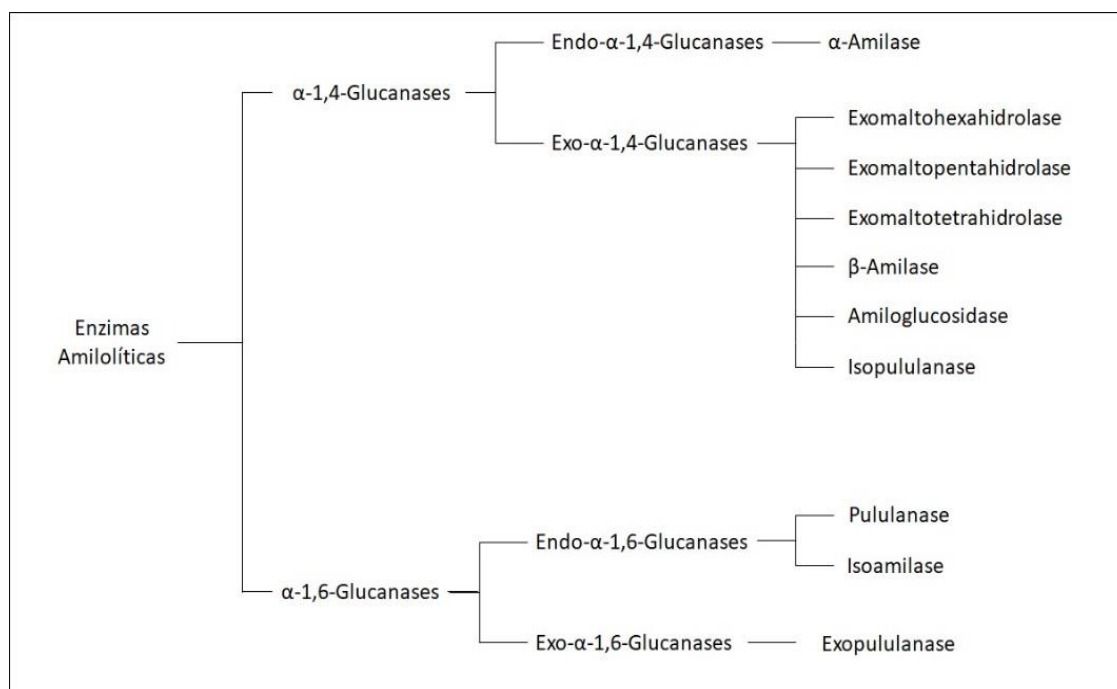
As amilases são as enzimas mais importantes do grupo de glicídios hidrolisados e são, basicamente, divididas em dois grupos: as enzimas denominadas desramificadoras, que hidrolisam as ligações 1,6 entre as cadeias, e as enzimas que hidrolisam as ligações 1,4, conforme a Figura 2 (NIGAM e SINGH, 1995). Este último grupo consiste em exoenzimas que partem pontos específicos nas extremidades de cadeias e endoenzimas que hidrolisam, ao acaso, pontos ao longo das cadeias (GUPTA *et al.*, 2003).

Figura 1 – Representação da cadeia da amilose (A) e amilopectina (B).



Fonte: Lehninger *et al.* (2014).

Figura 2 – Classificação das enzimas amilolíticas.



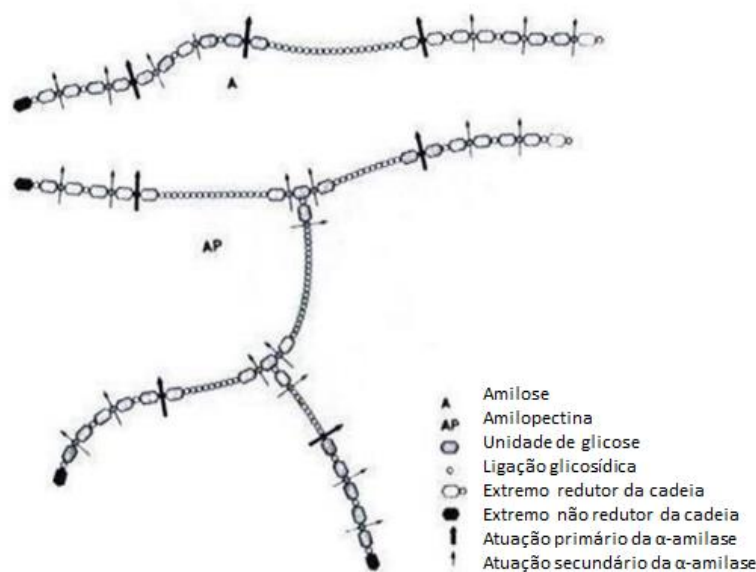
Fonte: Nigam e Singh (1995).

A hidrólise do amido realizada pelas enzimas amilolíticas, geram como produto as dextrinas e pequenas moléculas de glicose (GUPTA *et al.*, 2003). A atuação na amilose pela enzima  $\alpha$ -amilase é diretamente nas ligações  $\alpha$ -1,4 por toda a cadeia da parte linear, produzindo uma mistura de maltose e glicose. A  $\beta$ -amilase atua nas

extremidades não redutoras da amilose, formando inúmeras cadeias de maltose. Na amilopectina, a atuação feita pelas enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase tem como produto a dextrina livre, um núcleo condensado e ramificado, uma vez que, as ligações  $\alpha$ -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações  $\beta$ -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. (CONN; STUMPF, 1975; LEHNINGER *et al.*, 2014).

Segundo Pandey *et al.* (2000), as  $\alpha$ -amilases (endo1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolase, EC 3.2.1.1) são enzimas extracelulares que quebram aleatoriamente as ligações 1,4- $\alpha$ -D-glucosídicas. A ação ocorre de forma não seletiva (como endoenzima) em diferentes pontos da cadeia simultaneamente, de modo que os primeiros produtos de hidrólise são oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose, representando uma atuação preferencial a cada passo da hélice, da cadeia espiral de amilose e amilopectina (PANDEY *et al.*, 2005). A Figura 3 apresenta um esquema de atuação da  $\alpha$ -amilase nas estruturas de amilose e amilopectina.

Figura 3 – Esquema de ação da  $\alpha$ -amilase nas estruturas da amilose e amilopectina.



Fonte: Bruchmann (1980).

Após a hidrólise, unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas são liberados. Segundo Spier *et al.* (2006), as  $\alpha$ -amilases podem atuar de forma isoladas ou simultaneamente com outras enzimas amilolíticas, tornando, assim, possível uma eficiência da conversão do amido.

Embora os estudos para produção de enzimas amilolíticas estejam voltados para a produção por bactérias, devido à obtenção de enzimas com maior

termoestabilidade, muitos autores defendem a produção de amilases por fermentação em estado sólido (FES), pelo baixo custo operacional e pela facilidade de obtenção de substrato para a fermentação (SPIER 2005; SOUZA *et al.*, 2010; FREITAS; MARTINS; FERREIRA, 2014). Pandey *et al.* (2005) descreveram espécies como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* para produção de  $\alpha$ -amilases, enquanto Wainwright (1995) utilizou os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Mucor pusillus* e *Trichoderma viride* para produção desse tipo de enzima.

Gonçalves (2016) em seu estudo, obteve atividade enzimática de 511 U/gMS para  $\alpha$ -amilase, utilizando a espécie de fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, usando farelo de trigo na fermentação, enquanto Spier *et al.* (2006), apresentaram resultados mais elevados de atividade enzimática para  $\alpha$ -amilase (1732,95 U/gMS), utilizando amido de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Outros autores estudaram fungos das espécies *Syncephalastrum racemosum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium chrysogenum*, *Nectria haematococca*, *Metarhizium anisopliae* (FERNANDES *et al.*, 2007; GUANDALINI, 2007; FREITAS; MARTINS; FERREIRA, 2014; SALEEM; EBRAHIM, 2014;). Embora outras espécies de fungos apareceram sendo estudados como alternativas de produção de  $\alpha$ -amilase, Pandey *et al.* (2005) já indicava que as espécies *Aspergillus* e *Rhizopus* tinham mais potencial para a produção de enzimas amilolíticas, além do fator a ser levado em consideração: a combinação entre o substrato para a FES e a espécie de fungo a ser empregado no processo.

### 3.1.2. Aplicação das enzimas amilolíticas na indústria

Segundo Hmidet *et al.* (2009), as indústrias de detergente em países desenvolvidos mudaram a formulação de seus produtos e substituíram por enzimas muitos dos agentes que agrediam o ambiente, eram tóxicos e provocavam o desgaste de materiais e equipamentos. Os detergentes enzimáticos atuam de maneira mais competente sobre a matéria orgânica, comparado com os detergentes iônicos (BON; GÍRIO; PEREIRA, 2008). As amilases têm sido utilizadas em detergentes em pó de lavanderias para remoção de manchas contendo amido, chocolate, comida de bebê, entre outras (GUPTA *et al.*, 2003). As amilases termoestáveis testadas e usadas em detergentes têm sido extraídas das espécies

*Aspergillus oryzae*, *Bacillus* sp., *Bacillus halodurans* (KONSULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2004; KIRAN; CHANDRA, 2008; HMIDET *et al.*, 2009).

Na indústria têxtil existe a tecelagem, que é um processo para o melhoramento da qualidade dos fios. Esse processo é geralmente banhado em goma de amido, que descartado de forma irregular pode gerar problemas ambientais. Estima-se que a cada 1 kg de amido despejado no efluente produz cerca de 4 a 5 kg de lodo, gerando custos adicionais ao descarte. A utilização da enzima  $\alpha$ -amilase ou o complexo enzimático amilolítico durante o processo, garante a redução do teor de amido no efluente sem causar deterioração do tecido (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Para a indústria farmacêutica, as enzimas, atrás apenas dos antibióticos, são os produtos mais explorados, podendo ser aplicadas tanto na produção de medicamentos e desenvolvimento de novos produtos, quanto em diagnóstico clínico e terapia (MONTEIRO; SILVA, 2009). A utilização e comercialização das enzimas  $\alpha$ -amilases vêm como fonte de terapia, usada no tratamento da deficiência de secreção do suco pancreático e nas inflamações crônicas do pâncreas. Na área de cosméticos as enzimas glucoamilase (E.C. 3.2.1.3), são oriundas da espécie fúngica *Aspergillus oryzae* e tem aplicação na renovação ou prevenção da placa dentária (MONTEIRO, SILVA; 2009)

A indústria alcooleira é grande consumidora do amido, substrato da hidrólise para formação dos açúcares fermentescíveis para a fabricação do etanol. Seu grande uso é dado pelo baixo custo do amido e a facilidade de obtenção (CHI *et al.*, 2009). A utilização de enzimas amilolíticas para a etapa da hidrólise do amido é viabilizada pela rápida e fácil conversão, sem exigir condições extremas de pH ou temperatura (MORAES *et al.*, 1999).

Van der Maarel *et al.*, (2002) citaram a aplicação de enzimas amilolíticas na indústria do papel, principalmente na etapa de produção de papeis de alta qualidade. O amido é um bom agente de colagem para o acabamento do papel, apurando a sua facilidade e qualidade no uso. A aplicação se dá diminuindo a viscosidade do amido natural com enzimas  $\alpha$ -amilases em processos descontínuo e contínuos (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

Na indústria de alimentos, as amilases são aplicadas nos processos de panificação, cerveja e sucos. Na indústria de panificação, os grãos de cereais da farinha possuem enzimas, porém suas quantidades nem sempre são ideais, necessitando de adição para o processo. Os problemas com a falta ou excesso de  $\alpha$ -amilases nas farinhas resultam em um pão fora do padrão das características

sensoriais, podendo ser adicionadas enzimas oriundas de malte ou de fermentação fúngica, assegurando a quantidade suficiente de açúcares fermentescíveis para a lecedura (SONDERGAARD *et al.*, 2005).

Na indústria cervejeira, sob condições normais de produção, as enzimas da malteação não têm capacidade de hidrolisar todo amido presente (GUPTA *et al.*, 2003; LEHNINGER *et al.*, 2014). Cerca de 1/3 do amido é convertido em dextrinas que é repassado para o produto final em forma de carboidratos, o que significa calorias. Com a adição de enzimas amilases no processo de mosturação ou fermentação, o restante dessa dextrina poderia ser hidrolisado em glicose, tornando o processo mais eficiente, quanto a conversão de açúcares em álcool, e consequentemente, diminuindo o teor calórico da cerveja (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

A produção de enzimas amilolíticas é, portanto, de grande interesse industrial, uma vez que o processamento do amido possui aplicação direta dessas enzimas, de forma a substituir totalmente a hidrólise química. Outros setores industriais onde são utilizadas as enzimas amilases são indústrias do suco e bebidas fermentáveis a partir da hidrólise do amido, indústria de papel, entre outras (HARGER, 1982).

### 3.1.3. Cinética enzimática

A cinética enzimática de uma reação é definida pela mudança de concentração de um dos reagentes ou de um produto em um dado intervalo de tempo. Inúmeros métodos experimentais podem ser utilizados para monitorar as mudanças dessas concentrações (CAMPBELL, 2000). Considerando uma reação catalisada por uma enzima, em seu sentido mais simples, existe um único substrato formando um único produto. O mecanismo da reação enzimática pode ser descrito pela da Equação 1:



Em que: E = Enzima; S = Substrato; ES = Complexo Enzima-Substrato; P = Produto;  $k_1$  é a constante de velocidade de formação do complexo;  $k_2$  é a constante de velocidade de dissociação do complexo e  $k_p$  é a constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto.

Esse modelo foi proposto em 1913, por Leonor Michaelis e Maud Menten e atualmente ainda é amplamente usado, mesmo tendo passado por muitas

modificações (RAIMUNDO, 2003; CHEN *et al.*, 2011; HALDAR; GAYEN; SEN, 2018). Para esse modelo é evidente que o produto não é convertido em substrato.

Observa-se na Equação 1 a presença explícita da enzima, tanto em concentrações de enzima livre, E, quanto em concentrações do complexo enzima-substrato, ES. Este fato é característica desse tipo de biocatalizador, no qual é regenerado ao fim da reação completa (CAMPBELL, 2000). Além disso, o mecanismo de reação proposto por Michaelis-Menten (1913) é de grande valia no campo da enzimologia industrial, pois permite os cálculos de velocidade e medidas de afinidade de ligação entre enzimas obtidas por diferentes fontes de um determinado substrato (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A atividade de uma enzima pode ser expressa em termos de  $V_{m\acute{a}x}$ , ou seja, a quantidade máxima de produtos formado em um determinado tempo, e também da constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , que representa a concentração de substrato na qual se detecta uma velocidade de reação igual a metade de  $V_{m\acute{a}x}$ . Essa relação é apresentada na Equação 2.

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Em que:  $v_0$  são as velocidades iniciais para cada concentração do substrato [S] utilizado na hidrólise enzimática.

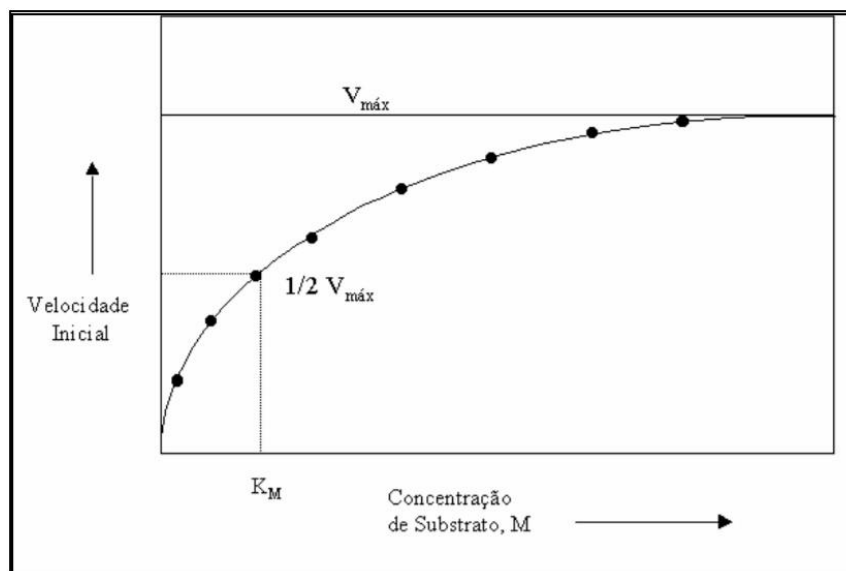
Outro modo de expressar a constante de Michaelis-Menten é definido pela Equação 3.

$$K_m = \frac{K_2 + K_p}{K_1} \quad (3)$$

A Figura 4 apresenta o comportamento das velocidades iniciais ( $V_0$ ) em função da concentração de substrato [S]. Observa que para baixas concentrações de substrato, a reação é de primeira ordem, implicando que a velocidade,  $V_0$ , depende da concentração do substrato. De modo que a concentração do substrato aumenta a ordem da reação se torna zero, ou seja, a velocidade se torna independente da concentração de substrato. Dessa forma, os sítios ativos de todas as moléculas da enzima começam a ficar saturados e a reação acontece em velocidade máxima (RAIMUNDO, 2003). Observa-se que a constante de Michaelis ( $K_m$ ) pode ser determinada através do comportamento apresentado pela figura 4,

uma vez que  $K_M$  tem o mesmo valor do substrato quando a velocidade da reação for a metade da velocidade máxima.

Figura 4 – Comportamento da velocidade inicial em função da concentração de substrato



Fonte: Raimundo (2003).

### 3.2. Fermentação no Estado Sólido na produção de amilases

A FES é um processo onde consiste no desenvolvimento microbiano na ausência (ou quase ausência) de água livre, tendo o substrato como fonte suficiente de umidade para suportar esse crescimento (PANDEY, 1991).

Raimbault (1998) sugeriu que a FES pode ser definida como o processo no qual o crescimento microbiano ocorre em partículas sólidas sem a presença de água livre. A água presente no sistema existe em uma forma complexada dentro da matriz sólida ou como uma camada fina ou absorvida na superfície das partículas, não podendo exceder a capacidade máxima de retenção de água na matriz, a fim de manter os valores de atividade de água (SANTOS, 2007). A matriz sólida pode ser caracterizada tendo as partículas sólidas como, e ao mesmo tempo, suporte e substrato ou tendo as partículas apenas como suporte, necessitando de nutrientes para o meio fermentativo (PALMA, 2003). Segundo Viniegra-Gonzalez (1997), os nutrientes são indispensáveis para que ocorra a FES. Tais nutrientes são situados sob ou sobre a matriz sólida, facilitando o acesso para o desenvolvimento do microrganismo e evitando o gasto com adição de minerais ao processo.

Em meados de 1940, no ocidente, houve uma redução drástica nos estudos relacionados a FES, como consequência direta da produção de penicilina em fermentação submersa. Apenas a partir da década de 70, os estudos com a FES voltaram a chamar atenção, devido ao enriquecimento proteico de rações animais, envolvendo o resíduo agroindustrial, valorizando esses resíduos e abrindo ampla área de pesquisas sobre o tema (AFONSO, 2012).

Os substratos mais utilizados para a FES são os resíduos agroindustriais, devido à facilidade de acesso e seu baixo custo agregado. Muitos autores utilizam esses resíduos e descrevem como excelente forma de destinação e reaproveitamento dessas fontes renováveis, além de possuírem nutrientes necessários para o crescimento microbiano (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; SILVA *et al.*, 2005; SANTANA, 2012; LESSA *et al.*, 2017).

Spier (2005) sugeriu o estudo da FES para produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por *Aspergillus* e *Rhizopus*, com substrato de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar, como suporte, alcançando resultados de máxima produção de  $\alpha$ -amilase com suplementação de  $\text{KNO}_3$  (10%), concentrações abaixo de 5% para  $\text{CaCO}_3$  e solução salina 30%, enquanto para as amiloglicosidase obteve-se máxima produção em 10%, 0% e 30% para  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$  e solução salina, respectivamente. Por outro lado, Wisniewski *et al.* (2010) estudaram o crescimento micelial e a produção de  $\alpha$ -amilase e glicoamilase de *M. titans* utilizando bagaço de malte suplementado com diferentes farelos (trigo, arroz e soja). Resultados efetivos foram obtidos quanto ao crescimento micelial, proporcionando ao fungo capacidade em produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas. Canedo (2015) propôs uma FES tendo como substrato o bagaço de malte, com a finalidade do enriquecimento proteico desse substrato para a dieta de peixes, proporcionando um aumento de 2 vezes em relação ao teor de proteína bruta e 4 vezes o valor de proteína solúvel, demonstrando potencialidade desse resíduo como substrato.

### 3.2.1. Microrganismos para FES

Os fungos filamentosos são a espécie de microrganismo mais adaptáveis às condições na ausência de água livre, em substratos sólidos e a altas pressões osmóticas, comparados às bactérias e leveduras (SOCCOL *et al.*, 1994). O crescimento dos fungos filamentosos, que é uma combinação da extensão apical

das hifas associado à formação de novas hifas por ramificação do micélio, favorece a associação do microrganismo com o substrato, pois o fungo penetra a porosidade do substrato sólido, afim de, formar uma estrutura sólida. Esse fenômeno de crescimento do fungo, favorece a captação de nutrientes na superfície interna do substrato (MACIEL, 2006).

A escolha do microrganismo adequado no processo de FES é importante no sucesso da produção desejada. Os fungos filamentosos podem se reproduzir através dos conidióforos, onde formam estruturas filamentosas chamadas de hifas. Segundo Amorim (2011), o *Aspergillus niger*, por exemplo, é capaz de produzir 19 tipos diferentes de enzimas como, por exemplo, xilanase, pectinase, glucoamilase,  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase, lipase e celulase.

Maciel *et al.* (2008) estudaram a produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus niger* cultivado em substrato lignocelulósico composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja em FES. Em seus resultados obtiveram uma atividade xilanásica de 3099 UI /g de matéria seca para as condições de 10 g de bagaço de cana e farelo de soja, na proporção de 65 e 35%, respectivamente, umedecido a 85% do teor de água inicial com solução salina e incubados a 4 dias em 30 °C.

Maciel *et al.* (2011) avaliaram a produção máxima de pectinases pela FES do *Aspergillus niger* em palma forrageira utilizando a técnica de planejamento experimental. Os resultados máximos para atividade de pectinase foi de 66,19 U /g para endo-poligalacturonase, 3,59 U /g para exo-poligalacturonase e 40615,62 U /g de pectina liase em 96, 24 e 72 horas de fermentação, respectivamente. As condições ótimas para a produção dessas enzimas foram em 10 g de substrato,  $10^7$  esporos /g e 28 °C.

Slivinski (2007) estudou a produção de glucoamilase pela FES pelo do fungo *Aspergillus niger*, utilizando como substrato resíduo de uma indústria de processamento de batata, por um período de 48 horas a 32 °C. O mesmo autor aplicou um processo de purificação da enzima por meio da i) precipitação com sulfato de amônio, ii) cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose e iii) cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100. Após o processo de purificação, a enzima obteve a atividade média de 152,85 U/mL, para as condições de pH entre 4,5 e 5,0 e temperatura de 60 °C.

Spier *et al.* (2006) avaliaram a produção de  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus niger* na FES, utilizando como substrato e suporte, o farelo de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. Os resultados mostraram que o amido de mandioca e o

bagaço de cana-de-açúcar nas proporções de 2/1 foi a melhor condição para a produção da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. O rendimento máximo para os dois tipos foram 1732,95 U /g matéria seca para  $\alpha$ -amilase e 2044,94 U /g de matéria seca para amiloglucosidase, em condições ótimas de 60 horas de incubação, 90% de umidade do meio e 30°C para a temperatura de fermentação.

Reinehr *et al.* (2014) analisaram a produção de lipase por FES através do fungo do mesmo fungo citado pelos autores acima e obtiveram a produção de 364,58 U /g de matéria seca com o substrato composto de 85% de farelo de soja e 15% de casa de soja. Além disso, a umidade foi ajustada para 60%, a temperatura em 30°C e foi adicionado 2% de óleo de soja como indutor para a produção de lipases.

### 3.2.1.1. Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* compreende os fungos filamentosos muito comuns, por serem amplamente distribuídos na natureza. Suas características morfológicas e de adaptação permitem que esses tipos de fungos possam ser isolados em diversos ambientes, tais como, solo, água e ar, tornando-os, os mais utilizados em FES (ROSA *et al.*, 2002). O gênero *Aspergillus* tem grande capacidade de deteriorar alimentos e de materiais vegetais e sua colônia tem grande capacidade de crescimento, favorecendo seu rápido desenvolvimento. Inicialmente o crescimento da colônia é de coloração branca e amarelada, devido ao crescimento das hifas e micélios, e posteriormente passando para a coloração marrom ou preto, proveniente dos conídios (SANTOS, 2007), como observado na Figura 5.

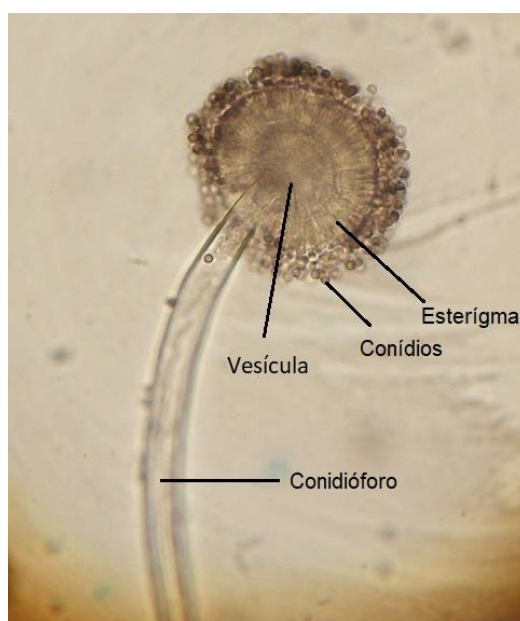
A espécie do *Aspergillus niger* tem sido estudada de forma intensiva com base no critério morfológico. De acordo com Klich (2002), até a década de 1990, o estudo de identificação dos fungos e suas distinções era apenas realizado por meio das características morfológicas, baseados no diâmetro, coloração, tamanho e textura das colônias e dos conídios, além da estrutura do conidióforo. A identificação do *Aspergillus niger* constitui-se uma das mais complexas do gênero *Aspergillus*, tendo como principais características, conídios de coloração marrom-escuro a negras, conidióforo hialino ou levemente pigmentado próximo ao ápice, esterigma uniseriado (apresentam apenas fiálides) ou biseriado (apresentam fiálides e métulas) e vesícula globosa. Essas características são comparadas com chaves de identificação recomendadas por Raper e Fennell (1965) e Klich (2002). A morfologia pode ser observada na Figura 6.

Figura 5 – Colônia de *Aspergillus niger* após 4 dias de incubação.



Fonte: Tomé (2011).

Figura 6 – Morfologia da espécie *Aspergillus niger*.



Fonte: Tomé (2011), modificado pelo autor.

A classificação taxonômica, segundo a Flora do Brasil (2018), de *Aspergillus niger* é dada pelo Domínio: Eukaryota; Reino: Fungi; Divisão: Ascomycota; Subdivisão: Pezizomycotina; Classe: Eurotiomicetos; Ordem: Eurotiales; Família: Trichocomaceae; Gênero: *Aspergillus*; Espécie: *Aspergillus niger*.

Quanto a formação de enzimas a partir da FES, existem uma ampla e diferenciada gama desses produtos, reflexo da variedade e capacidade de adaptação desses microrganismos. A Tabela 1 apresenta a relação de cada enzima com o microrganismo produtor e o substrato utilizado.

Tabela 1 – Enzimas que podem ser obtidos por FES a partir de diferentes substratos e microrganismo.

Enzima	Microrganismo	Substrato
Pectinases	<i>Lentinus enodes</i>	Resíduos de frutas
-	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo
-	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
-	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Farelo de trigo/sabugo de milho/bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
-	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
-	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de chá
-	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
-	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá

Fonte: Rocha (2010), adaptado pelo autor.

### 3.2.2. Fatores que influenciam a FES

Como a FES simula as condições naturais dos fungos, diversos fatores afetam diretamente o processo de fermentação, fatores como pH, umidade, temperatura, tamanho das partículas, concentração de inóculo, nível de oxigênio. Segundo Del Bianchi, Moraes e Capalbo (2001) e Pandey (2003), o controle dessas variáveis no processo fermentativo em estado sólido é imprescindível para o alcance de produtos com as mesmas características desejáveis.

- **pH:** O pH é uma variável importante em qualquer processo microbiano, possuindo valores mínimos, máximos e ótimos para o crescimento de cada microrganismo. Para o crescimento fúngico normalmente adota-se uma faixa de pH baixo (4,5 – 5,0), devido à preferência do microrganismo, uma vez que seus habitats naturais estão próximos à essa faixa. Para as bactérias os valores de pH são utilizados próximos a neutralidade (6,5 – 7,0) (SANTOS, 2007). Segundo Pandey (2003), o controle e monitoramento do pH é de difícil realização, devido às condições do meio fermentativo.

Segundo Palma (2003) a medida de pH no processo de FES é realizada colocando, em suspensão, uma parte da amostra sólida em uma proporção de água, medindo assim, o pH global. Sendo assim, a determinação do pH, em substratos sólidos é realizada somente no início e no final do processo de fermentação.

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas de pH na superfície do substrato sólido, porém a medida da solução aquosa do extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Além disso, a utilização de substratos com boa capacidade tamponante, ou seja, substratos que conseguem resistir a uma variação natural do pH, ou a adição de soluções-tampão, como tentativa de amenizar o efeito de variações severas nos valores de pH é bastante usual para a FES (DEL BIANCHI, MORAES E CAPALBO, 2001).

- Umidade: O teor de água na FES é um dos fatores mais primordiais para a realização desse tipo de fermentação e é responsável pelo processo de difusão de nutrientes, gases, metabólitos inibitórios e pela adsorção celular (PANDEY, 2003).

A umidade presente na FES deve ser suficiente para a formação de uma fina camada de água na superfície, facilitando os fenômenos de transferência de massa e calor na fermentação. Porém, os espaços entre os sólidos devem permanecer livres, para permitir a dissipação de calor e a transferência de oxigênio, para o microrganismo (DESCHAMPS *et al.*, 1985).

O equilíbrio no teor de água deve ser estudado e avaliado, com o intuito de se encontrar a ótima condição para o processo. O alto teor de umidade resulta em diminuição dos fatores que favorecem as trocas térmicas e de massa na fermentação, além de aumentar o risco de contaminação. Níveis reduzidos de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE *et al.*, 1985).

Para a realização da FES, alguns autores relatam o estudo sobre a umidade do meio, o qual afeta diretamente os resultados dessas fermentações. Batista (2014) estudou a otimização da produção de dextranase por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 em FES, obtendo condições de cultivos favoráveis ao melhor desempenho do microrganismo, sendo a condição ótima obtida com 70% de umidade, dentro da faixa estudada de 53,2 – 86,8%. Segundo Júnior (2014), o maior pico de atividade enzimática obteve-se com 66% de umidade, dentro da região de 66 – 75%, para o estudo da produção de celulasas por *Aspergillus fumigatus* em FES utilizando bagaço de coco e pedúnculo de cajú como substrato. Por outro lado, um alto teor de umidade foi relatado no estudo de Spier (2005), em que encontrou o ótimo de 90%,

dentro da faixa de 80-90% de umidade para produção de enzimas amilolíticas fúngicas,  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, por fermentação no estado sólido.

Segundo Narahara *et al.* (1982), para cada espécie de microrganismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, as enzimas.

- Temperatura: Um dos problemas da FES é a dissipação do calor que é gerado pelo crescimento microbiano, pois altas temperaturas prejudicam o crescimento dos microrganismos (JÚNIOR, 2014). Segundo Hasan (2002), o uso de refrigeração se mostra inadequado para dissipação de calor metabólico. Para facilitar a troca térmica do meio fermentado com o ambiente, é necessário que haja porosidade suficiente para que o ar possa percorrer entre a fermentação e facilitar a dissipação do calor (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Alguns autores estudaram a aeração forçada, empregando o uso de ar comprimido, para aumentar a eficiência de troca térmica e controle da temperatura (PALMA, 2003; CACHUMBA, 2017). Cachumba (2017), após comparar os resultados do estudo da aeração, concluiu que FES aerada tem ganho de 30% na atividade enzimática de L-asparaginase, quando comparada com a FES não-aerada.

- Tamanho das partículas: O tamanho da partícula é um dos fatores mais importantes na FES, pois está diretamente associado às trocas gasosas do meio fermentado. A disponibilidade de nutrientes para o crescimento do microrganismo é uma consequência da granulometria das partículas. Um meio muito empacotado ou muito acoplado desfavorece o fornecimento de nutriente, troca térmica, além da oxigenação e a diminuição da superfície de contato, acarretando um baixo crescimento do microrganismo. Todavia, partículas maiores favorecem uma melhor respiração e aeração, porém limita o fornecimento dos nutrientes, acarretando também em um baixo crescimento microbiano. A partir daí, estuda-se a granulometria adequada do substrato e suporte para a otimização do processo fermentativo em estado sólido (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2006).

- Concentração de inóculo: Segundo Sandhya *et al.* (2005), a concentração de inóculo deve estar sempre relacionada com a quantidade de substrato, podendo assim, garantir que o substrato não limite o crescimento celular. Uma concentração alta do inóculo no início da fermentação pode afetar diretamente na formação do produto, devido à grande quantidade de biomassa formada no processo. Por outro lado, uma quantidade baixa de inóculo inserido no início da FES pode prevalecer a

proliferação de agentes contaminantes e ocasionar em um atraso na formação do produto desejado (ARAUJO, 2004). Alguns autores utilizam a concentração de inóculo na faixa de  $10^6$  e  $10^8$  esporos /g de massa seca (BOGAR *et al.*, 2002; CAVALCANTE *et al.*, 2005; GUTARRA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2016).

### 3.2.3. Biorreatores para FES

Segundo Palma (2003), os biorreatores para os processos fermentativos, devem criar um ambiente adequado para o crescimento e a atividade de microrganismos. Algumas características gerais são estabelecidas e projetadas para que os diversos biorreatores atendam o requisito para um ambiente adequado de fermentação, bem como, serem de material atóxico, para evitar que contaminação no meio fermentativo; suportarem altas pressões e temperaturas, podendo assim, serem esterilizados; possuírem mecanismos de aeração para o resfriamento e controle de temperatura da fermentação; serem capaz de operar em condições assépticas, impedindo a entrada de substâncias ao ambiente (THIEMANN, 2001).

A limitação no desenvolvimento de biorreatores para a FES é um fator que vinha desafiando os pesquisadores quanto ao assunto (PANDEY; SOCCOL; LEON, 2001), uma vez que, as dificuldades, normalmente encontradas para se operar um biorreator em FES, em pequena escala, alcançam grandes proporções, o que dificulta o controle, em escala maior. Alguns autores vêm desenvolvendo técnicas e tecnologia para o melhoramento e ampliação de escalas para a FES, tais técnicas alinhadas à modelagem matemática para a predição dos fenômenos de transportes envolvidos e o crescimento celular dos microrganismos vêm se mostrando eficiente para a reversão desse cenário (SILVA, 2014; BIZ *et al.*, 2016; PITOL *et al.*, 2017).

Segundo Pandey (1991), os reatores ideais para estudos primários e investigativos sobre a FES são reatores com menores volumes operacionais e que atendam todas as características citadas. Frascos de erlenmeyers, placas de Petri, béqueres e garrafas de Roux são usados por diversas pesquisas para otimização das condições de cultivo, para posteriormente, avançar com o aumento de escala e estudos em reatores mais complexos (SPIER *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2008; GUTARRA *et al.*, 2009; AMORIM *et al.*, 2017).

Segundo Singhanian *et al.* (2009), os biorreatores podem ser divididos em quatro classificações, baseados no sistema de aeração ou agitação, que são: reator tipo bandeja, reator de leito fixo, reator de tambor horizontal, reator de leito fluidizado e

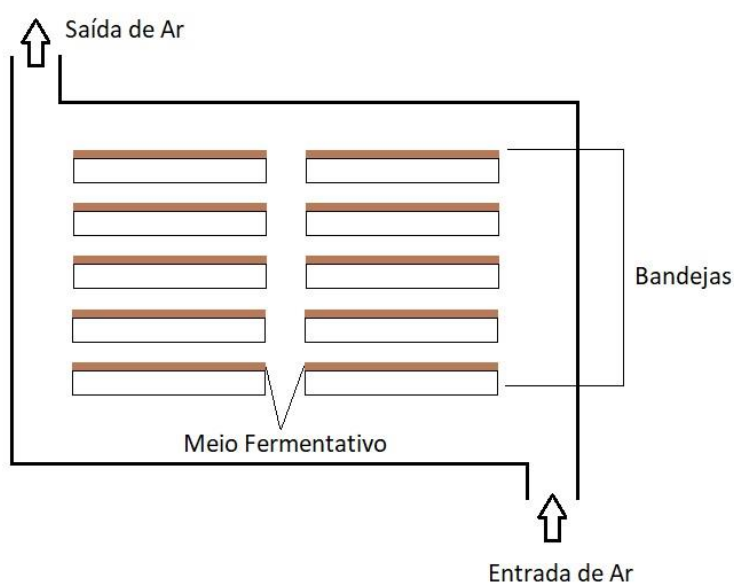
reator de leito agitado. Cada tipo de reator tem suas vantagens e desvantagens, tornando esse tipo de estudo uma área de interesse científico.

### 3.2.3.1. Biorreator tipo bandeja

São os tipos de biorreatores mais simples usados na FES. O material das bandejas pode ser composto por madeira, plástico e até aço inox. O fundo da bandeja deve ser perfurado, com o intuito de permitir a aeração do substrato. A camada de meio sólido é de no máximo 15 cm de altura e são colocadas em grandes câmaras com circulação de ar úmido conforme a Figura 7 (PANDEY; SOCCOL; LEON, 2001).

Esse tipo de reator possui uma grande limitação, o qual é impedido de ser ampliado a sua escala de produção. As baixas transferências de calor e massa impedem o aumento da altura do leito, proporcionando um superaquecimento no meio fermentativo. Sendo assim, uma forma de contornar essa situação é o aumento da área das bandejas, o que torna tipo de biorreator um problema físico (MITCHEL *et al.*, 2000). Além disso, o controle de temperatura do fermentado é feito pela temperatura do ar de entrada juntamente com a temperatura interna do biorreator, onde geralmente possui aberturas no topo para fuga de ar quente.

Figura 7 – Esquema do biorreator do tipo bandeja.



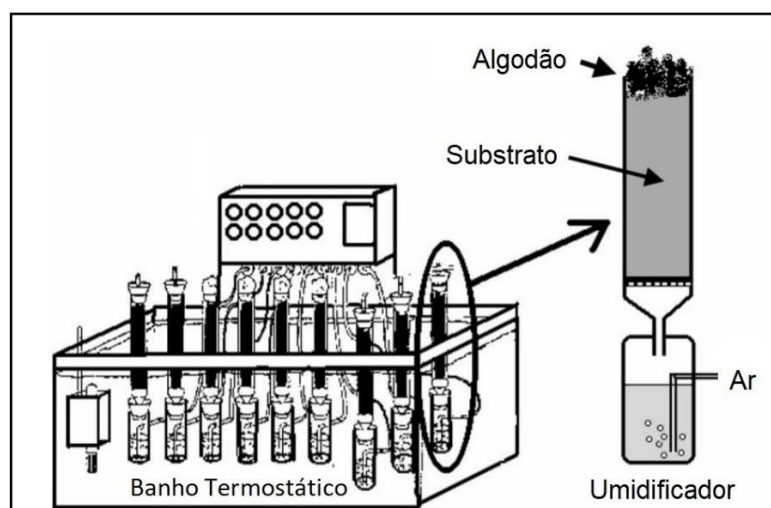
Fonte: Gutarra (2007), modificado pelo autor.

### 3.2.3.2. Biorreator do tipo leito fixo

Para avaliar o efeito da aeração e aumento da produção do cultivo e o estudo de cinética, opta-se pela implementação de reatores, tipo coluna de leito fixo, formando um sistema com as colunas de vidro em torno de 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, submergidas em banho termostático, para o controle de temperatura, e ainda submetidas à aeração (Figura 8). A remoção do calor para esse sistema é realizada por dois fenômenos: condução entre parede do reator e o banho termostático, e pela convecção do ar inserido no fundo das colunas. Esse sistema ficou conhecido como “colunas de Raimbault” após ser usado por Maurice Raimbault nos anos de 1980.

Biorreatores do tipo leito fixo com aeração são utilizados em escala laboratorial para estudos de modelagem matemática de crescimento celular na FES. Enquanto alguns autores relacionaram a respiração celular com a taxa de crescimento celular, em seus trabalhos, outros autores avaliaram a influência da aeração na produção de enzimas extracelulares (PALMA, 2003; TERZI *et al.*, 2003; RUTSATZ, 2006; CACHUMBA, 2017).

Figura 8 – Esquema coluna de Raimbault.



Fonte: Durand (2003), adaptado pelo autor.

### 3.2.3.3. Biorreator do tipo tambor rotativo e agitado

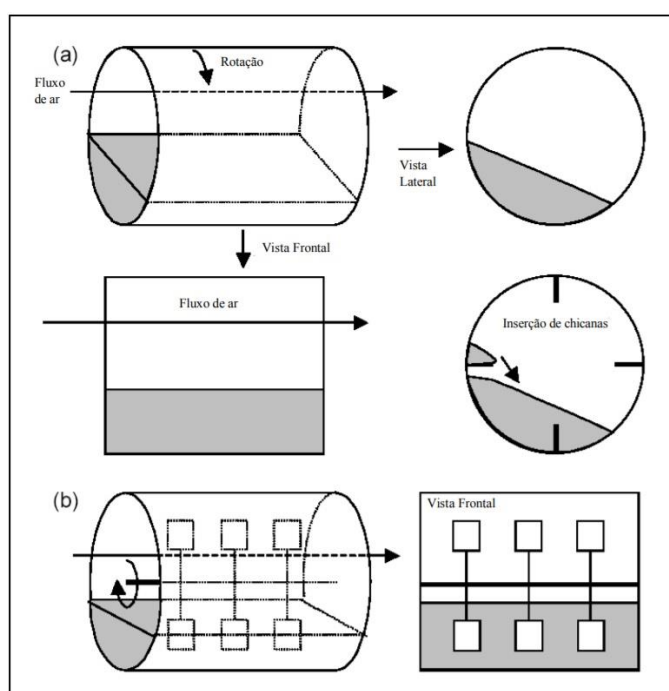
Os biorreatores desse tipo são cilíndricos e podem ser inclinados ou horizontais. De acordo com Mitchell, Krieger e Berovic (2006), as dimensões dos biorreatores podem variar de acordo com as necessidades de produção.

O grupo dos biorreatores de tambor rotativo, nos quais a rotação do casco do biorreator permite a homogeneização do meio, a remoção de calor e dos gases gerados pelo metabolismo microbiano, evitam a deterioração das hifas e micélios dos fungos filamentosos, podendo haver períodos maiores de agitação, por outro lado, esse tipo de biorreator pode causar problema devido à aglomeração ou atrito das partículas do meio (MITCHEL *et al.*, 2006).

Os biorreatores de tambor agitado, possuem pás para agitação do meio fermentativo, que promovem a dissipação de calor e homogeneidade, além disso, permitem o controle da umidade por meio da adição de água no sistema. Isso permite que se utilize ar seco na aeração forçada, removendo calor por evaporação. Essas pás estão em contato direto com os fungos filamentosos, tendo assim, algum cuidado no momento da agitação (von MEIEN; MITCHEL, 2002).

A figura 9 apresenta o esquema desses dois tipos de biorreatores.

Figura 9 – Biorreatores com aeração superficial e agitação. (a) biorreator de tambor rotativo. (b) biorreator de tambor agitado.



Fonte: Mitchel *et al.* (2006).

### 3.2.4. Vantagens e desvantagens da FES

Muitos trabalhos apresentam comparações quanto aos tipos de fermentações, além das vantagens e desvantagens de uma fermentação sobre a outra (GERVAIS; MOLIN, 2003; SPIER, 2005; FERNANDES, 2007). Sabendo que cada

microrganismo pode adequar melhor a um ou a outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes (SANTOS, 2007). A seguir segue no Quadro 2 as vantagens e desvantagens da FES.

Quadro 2 – Vantagens e desvantagens da FES.

Vantagens	Desvantagens
- Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de substratos baratos, como matéria prima;	- Difícil controle e regulação dos parâmetros de cultura especialmente do pH, concentração de O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> e umidade;
- Crescimento celular ocorre em condições mais próximas aos dos habitats naturais;	- Risco de elevação excessiva de temperatura, devido a deficiência de troca térmica e de perda de umidade;
- Baixa umidade e conseqüentemente a diminuição das contaminações devido à baixa umidade e atividade de água;	- Necessidade de pré-tratamento do suporte (moagem, tratamento térmico, umidificação, homogeneização);
- Fácil aeração devido a porosidade do material;	- Difícil automação do processo;
- Volume do fermentador menor que o da cultura líquida; produtividade maior. Extração facilitada pela alta concentração de produtos;	- Quando se usa substrato com baixa granulometria, dificulta a transferência de oxigênio;
Para as fermentações tradicionais, a microbiota do suporte pode servir como inóculo;	- Os extratos podem estar contaminados com componentes indesejáveis do suporte.
- Baixa demanda energética.	

Fonte: Raimbout (1998); Santos (2007); Maciel (2006); Cachumba (2017), adaptado pelo autor.

A decisão de escolha pela fermentação no estado sólido ou pela submersa, para a produção de enzimas extracelulares, deve basear-se, principalmente, no custo e na eficiência do processo (DEMAIN *et al.*, 1999).

### 3.3. Resíduos agroindustriais

Com o crescimento do agronegócio e o desenvolvimento no processo de transformação dos alimentos, obteve-se, conseqüentemente, um aumento significativo e preocupante relacionado aos resíduos agroindustriais produzidos, os quais são ricos em matéria orgânica, tornando-se um dos grandes problemas

ambientais no Brasil (AFONSO, 2012). Esses tipos de resíduos necessitam de um pré tratamento antes do descarte no meio ambiente, estando assim, enquadrados nos padrões estabelecidos pelos órgãos de fiscalização.

A grande preocupação com esses resíduos é o fato da taxa de produção ser muito maior que a taxa de degradação, gerando um grande acúmulo no ambiente, e pelo fato das indústrias estarem situadas em torno dos centros urbanos, acarretando em grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos nos aterros sanitários (FIORI; SCHOENHALS; FOLLADOR, 2008). Muitos resíduos ainda são armazenados, de forma irregular, próximos as áreas de produção das agroindústrias sem planejamento para seu destino.

Alguns autores estudam técnicas para o destino correto, ou tratamentos dos resíduos industriais, com o objetivo de reduzir o impacto negativo ao meio ambiente. Fiori, Schoenhals e Follador (2008) estudaram a compostagem aeróbica de resíduos agroindustriais, utilizando uma gama de materiais: resíduos agroindustriais de linha verde, resíduos de cereais, cama de aviário, maravalha e resíduos de incubatório de ovos, obtendo resultados satisfatórios no processo de recuperação de elementos presentes na matéria orgânica e no destino desses resíduos.

Silva (2018) estudou diversos métodos de conservação do restolho de abacaxi “pérola” para alimentação de ruminantes. No primeiro método, o autor armazenou o resíduo em forma de silagem com adição de diferentes níveis de feno de leucena. No segundo método, Silva (2018) utilizou a técnica de amonização com ureia sobre o feno do restolho de abacaxi “pérola”. Como conclusão o autor discute que tanto sob forma de silagem associada a 10% de inclusão de feno de leucena, quanto em condição de feno amonizado, o restolho de abacaxi apresenta valor nutricional satisfatório à alimentação de ruminantes.

O não aproveitamento dos subprodutos industriais, principalmente os subprodutos de origem agroindustrial, além de criar problemas ambientais, apresenta grande perda de matéria-prima e poder energético para aplicação em processos industriais (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Segundo Ferreira e Rocha (2009), os subprodutos industriais, classificados como biomassa renováveis, têm grande potencial energético e econômico como produção de diversos produtos químicos, produtos biológicos e uma variedade de combustíveis, aumentando o valor agregado desses produtos e tornando-os uma fonte atraente para novos processos.

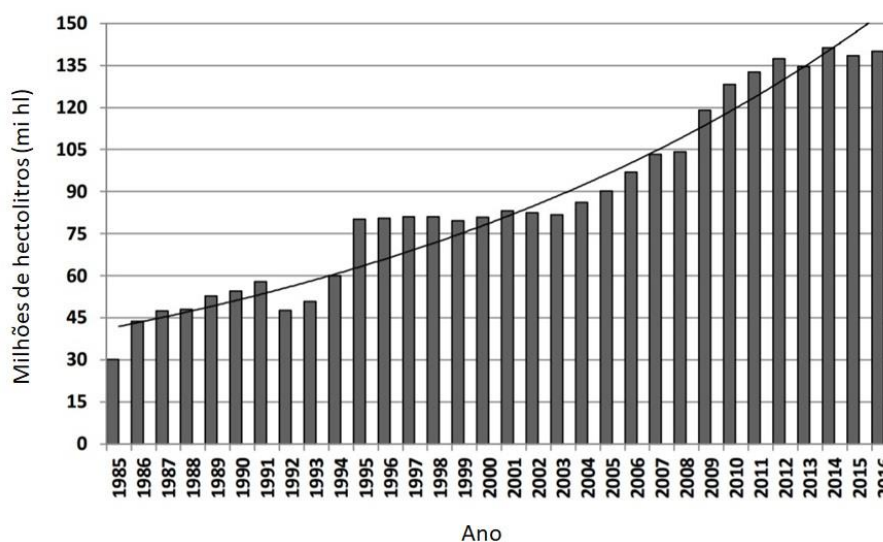
A combinação do baixo valor comercial desses subprodutos, que por muitas das vezes é visto como um resíduo inconveniente, e a geração de produtos com alto valor comercial motivados por esses atrativos, vêm mudando o cenário industrial e ambiental nos últimos anos.

### 3.3.1. Resíduos da indústria cervejeira e suas aplicações

A indústria cervejeira tem sido considerada economicamente atrativa nas últimas décadas. Segundo Swinnen (2011), os motivos dessa transformação estão em mudanças substanciais nas economias associadas à produção, mas, talvez mais importante, na publicidade do mercado cervejeiro, o qual, alavanca o produto e atua na influência do consumidor final.

No ano de 2016, o Brasil atingiu a marca de 138 milhões de hectolitros (mi hl) de cerveja produzida, estando em terceiro lugar no ranking mundial, atrás apenas da líder China (460 mi hl) e dos EUA (221 mi hl) e a frente da tradicionais produtoras, como a Alemanha (95 mi hl) e a Rússia (78 mi hl) (MARCUSO; MULLER, 2018). A produção de cerveja no Brasil vem em constante crescimento nos últimos 30 anos, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10– Produção nacional de cerveja em milhões de hectolitros por ano.



Fonte: CERVBRASIL (2016); Marcusso; Muller (2018).

O bagaço de malte (BM) é o resíduo mais abundante da indústria cervejeira, representando cerca de 85% de todo o resíduo gerado (REINOLD, 1997). De acordo com Mussatto e Roberto (2006), para cada 100 litros de cerveja, 20 kg de BM são obtidos após o processo de mosturação da cerveja. Com base nos dados de

Marcusso e Muller (2018), em 2016 a produção anual foi de 138 milhões de hectolitros de cerveja, gerando em torno de 2,76 milhões de toneladas desse resíduo.

O BM é muito rico em proteínas e carboidratos e tem grande aproveitamento na suplementação alimentar de animais (REINOLD, 1997). Outra forma de aproveitamento desse bagaço é o seu processamento por meio da secagem, com a finalidade de reduzir a umidade, e a utilização como ingredientes para formulação de alimentos, como pães, bolos, biscoitos e farinhas (ÖZTÜRK *et al.*, 2002; PANZARINI *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2014; MELO; MANFIO; ROSA, 2016). Mesmo com inúmeras aplicações na indústria alimentícia, o BM é utilizado de forma minoritária nas formulações desses alimentos, gerando um acúmulo positivo desse resíduo (DRAGONE, 2007).

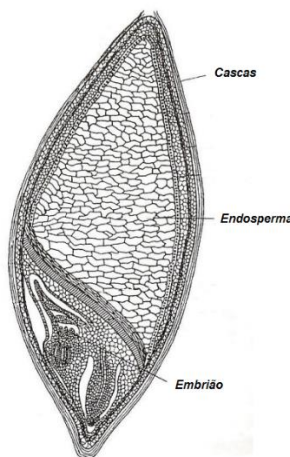
Alguns autores estudam aplicações do BM em outras áreas não tão usuais. Russ *et al.* (2005) propuseram a aplicação do farelo do BM para aumentar a porosidade de tijolos. Ishwaki *et al.* (2000) sugeriram usar o BM como matéria-prima para a produção de papel toalha, cartões de visitas e porta-copos, sendo relatado uma textura de alta qualidade nos produtos.

A utilização do BM também vem sendo estudada nos processos biotecnológicos, empregando-os como substratos ou suportes para fermentações e produções de enzimas. Melnikov (2007) estudou a imobilização de leveduras ao bagaço de malte para realização de fermentação em cerveja de alta densidade, mostrando eficiência do BM como suporte e na integridade do processo de fermentação, proporcionando a adesão das células tanto na superfície como nos poros do material. Wisniewski *et al.* (2010) realizaram a fermentação no estado sólido em BM para produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Macrocybe titans*, obtendo eficiência como substrato para o crescimento micelial, proporcionando ao fungo capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas. Batista (2014) estudou a produção da enzima dextranase por *Penicillium aculeatum* em fermentação no estado sólido, usando diferentes subprodutos como substrato e concluiu que o bagaço de malte reuniu as melhores características pela sua composição, disponibilidade, custo e por propiciar uma produção de dextranase superior aos outros resíduos testados.

Com o atual cenário mundial da indústria cervejeira, o cereal de cevada vem ganhando grande importância dentre os cereais mais utilizados do mundo, ficando apenas atrás dos cereais de milho, arroz e trigo (MELO; MANFIO; ROSA, 2016). O grão de cevada é rico em amido e proteína e é constituído por três partes principais:

o germe (embrião), o endosperma amiláceo e a casca externa (Figura 11). A casca é basicamente composta por celulose, proteína, resinas e taninos em menores quantidades (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Figura 11 – Malte de cevada produzido sob diferentes condições de malteação.



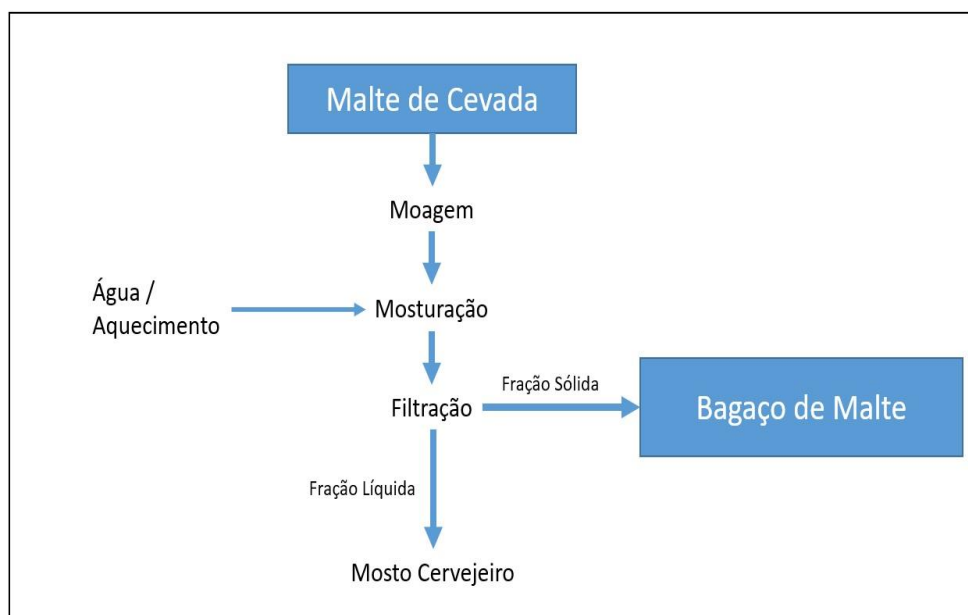
Fonte: Goronah (2018).

Para a utilização do grão de cevada na indústria cervejeira, é necessária a etapa de malteação do grão, que, por definição, é o processo de germinação do cereal sob condições controladas, principalmente as condições de umidade e temperatura. Tais condições potencializam o poder germinativo do cereal, formando e ativando as principais enzimas do malte de cevada (amilases, proteases, glucanases) (DRAGONE, 2007).

Alguns parâmetros devem ser levados em conta quando se trata da qualidade do malte de cevada produzido. A característica mais importante na qualidade do malte é o teor de proteína do grão, tendo o intervalo ótimo de 10 a 11% (MORENO; MORENO, 2002). Alto teor de proteína no malte de cevada leva ao aumento da viscosidade do mosto cervejeiro, deixando-o instável. Por outro lado, teores menores podem acarretar na baixa atividade enzimática do mosto (HECTOR *et al.*, 1996; MORENO; MORENO, 2002).

No processo de produção de cerveja, o malte é processado na etapa de mosturação, no qual todo grão é triturado e misturado à água para a conversão do amido em açúcares de cadeias menores, como a maltose e maltotriose, por hidrólise enzimática (SANTOS, 2005). Ao fim da etapa de mosturação e filtração é obtida uma fração sólida, denominada como bagaço de malte, como observado na Figura 12, sendo esse a maior fração de resíduos da indústria cervejeira.

Figura 12 – Fluxograma do processo de obtenção do bagaço de malte a partir do malte de cevada.



Fonte: Dragone (2007), modificado pelo autor.

A composição do BM pode apresentar variações significativas. Fatores como o clima do cultivo do cereal, tempo de colheita, processo de malteação, variedade da cevada e processo cervejeiro do mosto são fatores que potencializam essa variação (MUSSATTO, 2014). A Tabela 2 resume a composição química do BM em diferentes estudos.

Observam-se variações significativas de composição do BM analisado por diversos autores, constatando a influência dos fatores citados acima. Mussatto e Roberto (2006), Wilhelmson, Lehtinen e Weymarn (2009), Cordeiro, El-Aouar e Gusmão (2012) utilizaram no processo malte de cevada brasileiro e europeu sem adição de aditivos (100% cevada de malte). A utilização de aditivos, como fontes alternativas de carboidratos, é uma técnica bastante usada no processo cervejeiro e que também interfere na composição final do BM, conforme observado por Carvalheiro *et al.*, (2004) e Meneses *et al.*, (2013), que caracterizaram BM derivados de processos cervejeiros aplicando aditivos.

Tabela 2 – Composição química do bagaço de malte.

Componente (%)	Carvalho <i>et al.</i> (2004)	Mussatto e Roberto (2006)	Wilhelms, Lehtinen, Weymarn (2009)	Cordeiro, El-Aouar, Gusmão (2012)	Meneses <i>et al.</i> (2013)
Celulose	21,90	16,78	16,80 – 25,40	N.D*	21,70
Hemicelulose	29,60	28,42	21,80 – 28,40	N.D*	19,20
Lignina	21,70	27,78	11,90 – 27,80	N.D*	19,40
Cinzas	1,20	4,60	2,40 – 4,60	1,31	4,20
Fibras	N.D*	N.D*	N.D*	4,15	N.D*
Lipídeos	N.D*	5,82	3,90 – 10,60	2,49	10,70
Proteína	24,60	15,25	15,20 – 24,20	5,67	24,70
Grupo acetil	1,20	1,35	N.D*	N.D*	N.D*
Umidade	N.D*	N.D*	N.D*	75,45**	N.D*

\*N.D – não determinado. \*\*A umidade foi obtida com o bagaço úmido.

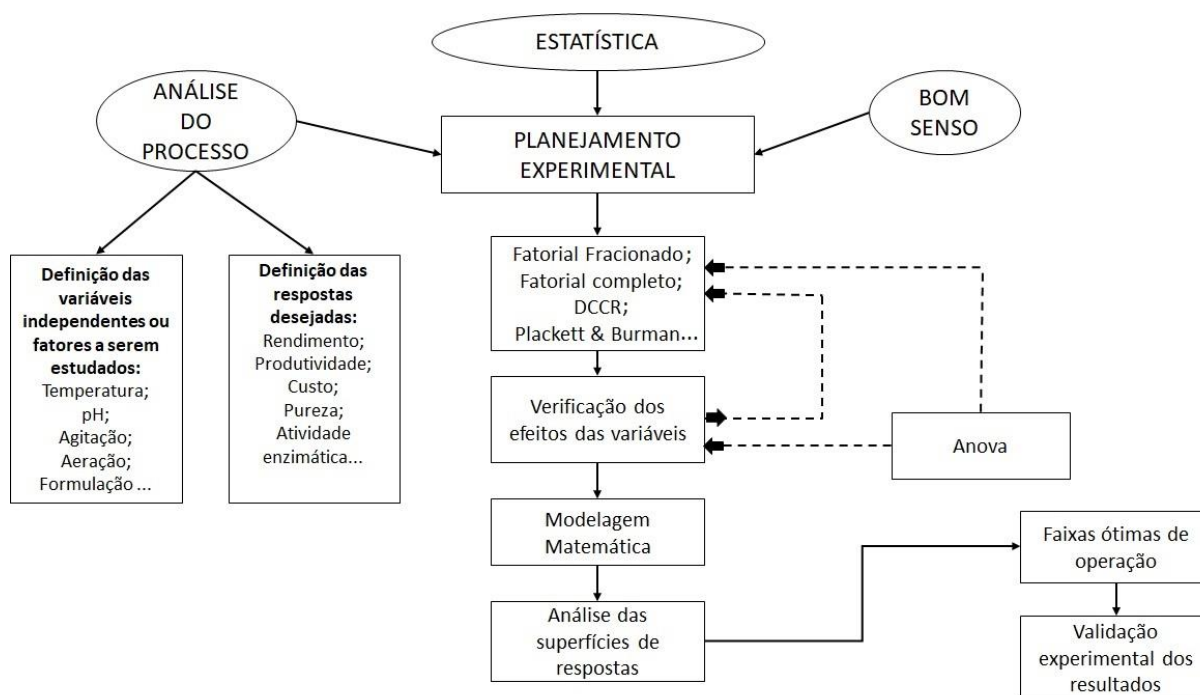
Fonte – Mussatto (2014), adaptado pelo autor.

### 3.4. Planejamento experimental

O caminho para se atingir um objetivo partindo-se da condição distante da otimizada é proposto por diversas metodologias e estratégias. Uma técnica usada comumente é o planejamento experimental, no qual o número de tratamentos necessários para esse planejamento experimental depende, principalmente, do número de variáveis independentes (ou fatores) a serem estudadas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O planejamento de experimentos se mostra uma ferramenta poderosa e útil no sentido de redução de custo experimental. É uma ferramenta que estuda a interação entre as variáveis determinadas, com o objetivo de diminuir a quantidade de experimentos, porém, mantendo a sua capacidade preditiva. São classificados em dois grandes grupos, segundo Rodrigues e Iemma (2005): (i) Planejamento para seleção de variáveis e (ii) planejamento para otimização das variáveis estudadas, podendo atuar como etapa anterior ou etapa posterior um do outro. A Figura 13 representa esquematicamente as etapas necessárias para se atingir a(s) resposta(s) desejada(s) de um experimento, por meio da metodologia de otimização por um planejamento experimental.

Figura 13 – Fluxograma das etapas envolvidas até se chegar ao objetivo desejado.



Fonte: Rodrigues e Iemma (2005), adaptado pelo autor.

### 3.4.1. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O delineamento composto central rotacional é um tipo de planejamento experimental que começou a ser estudado com o objetivo de resolver problemas industriais. Essa estratégia de planejamento foi adotada com o intuito de minimizar a quantidade de experimentos e simplificar a análise dos fatores estudados (BOX; WILSON, 1951). As respostas desse planejamento são dadas por estudos de funções polinomiais.

Os experimentos compostos centrais são os mais populares dentre os estudos acadêmicos de planejamentos de experimentos de segunda ordem. Esses experimentos são compostos de um ponto central, nos quais serão aplicadas as réplicas, tornando possível a estimativa do erro puro e o estudo de falta de ajuste do modelo proposto, além de pontos axiais, que são responsáveis pela determinação dos termos quadráticos (RODRIGUES; IEMMA, 2005). As distâncias dos níveis, escolhidos para esses experimentos, em relação ao ponto central é determinada por um  $\alpha$  expresso pela Equação 4.

$$\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}} \quad (4)$$

Em que,  $\alpha$  é a distância dos pontos axiais do centro e  $k$  é o número de variáveis independentes (fatores) para o DCCR (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

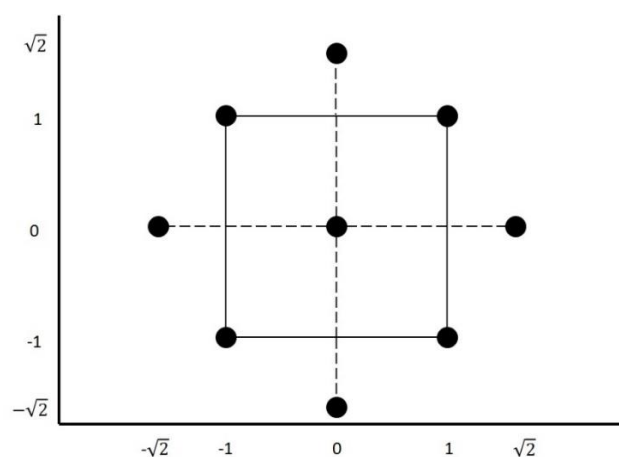
O número de experimentos para o DCCR é expresso pela Equação 5.

$$n = 2^k + 2 \cdot k + pc \quad (5)$$

Na qual:  $n$  é a quantidade de experimentos totais para o DCCR,  $k$  é o número de fatores e  $pc$  é a quantidade de experimentos no ponto central.

A estrutura caracterizada por um delineamento composto central rotacional é dada pela Figura 14, onde observa-se os pontos axiais com  $\alpha$  igual a  $(2^k)^{\frac{1}{4}}$  para dois fatores em estudo ( $k=2$ ).

Figura 14 – Experimento de composição central com  $\alpha$  igual a  $\sqrt{2}$ .



Fonte: Autoria própria

A partir desse tipo de delineamento é possível ajustar um modelo quadrático completo, modelo que permite observar as interações entre os fatores  $x_1$  e  $x_2$ . Para um delineamento com 3 fatores em estudo pode-se observar as interações entre os fatores  $x_1$  e  $x_2$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , além de,  $x_1$  e  $x_3$ , assim sucessivamente para experimentos com mais números de fatores. Para um experimento com 2 fatores e  $\alpha$  de  $\sqrt{2}$ , obtêm-se modelos da característica polinomial quadrático, observado pela Equação 6.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e_i \quad (6)$$

Na qual:  $\hat{y}$  são as respostas previstas pelo modelo,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  são os parâmetros do modelo,  $e_i$  é o erro do modelo e  $x_1$  e  $x_2$  são os fatores do experimento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do curso de Engenharia Química e nas instalações dos laboratórios do Curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAЕ) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES.

### 4.1. Microrganismo

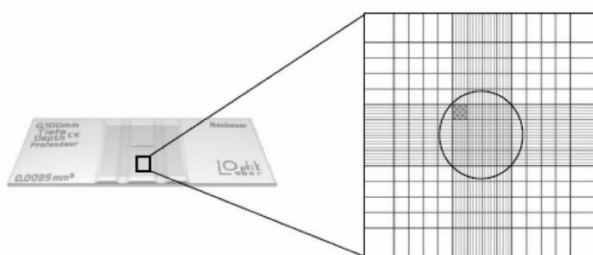
O microrganismo utilizado no presente trabalho foi *Aspergillus niger*, um fungo filamentoso recentemente isolado do solo e incubado a 25 °C. As colônias foram inoculadas em placas de Petri em meio BDA, pelo Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAЕ/UFES).

No preparo do estoque, esporos da cepa foram suspensos em solução salina e inoculados em 10 gramas de meio composto por farelo de bagaço de malte e farelo bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 70:30 (massa), com 60% de umidade inicial (base úmida), esterilizados por 20 minutos a 120 °C, 1 bar de pressão e inoculados em estufa (NOVA Instruments) para fermentação por 7 dias a 30 °C, para estimular a esporulação do fungo. A cultura foi mantida a temperatura de 25 °C e umidade de 40%, armazenada em câmara de fluxo laminar vertical (FLV 1040 – IDEOXIMA), até a conclusão da pesquisa.

#### 4.1.1. Contagem de esporos

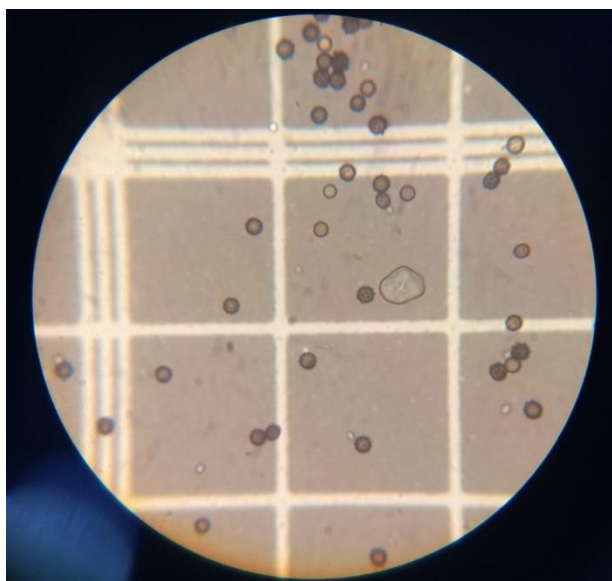
Para determinação da concentração de esporos dos estoques utilizou-se câmara de Neubauer espelhada e um microscópio ótico (BIOVAL). Foram contados 13 quadrículos dos 25 totais presentes na região central da câmara, conforme a Figura 15. As dimensões dos quadrículos da câmara de Neubauer são de uma área de 0,0025 mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,1 mm para cada quadrículo. A Figura 16 apresenta uma foto feita pela leitura em câmara de Neubauer de *Aspergillus niger*.

Figura 15 – Câmara de Neubauer.



Fonte: Barga (2007).

Figura 16 – Fotografia da suspensão de esporos em câmara de Neubauer de *Aspergillus niger* em microscópio ótico com lente de aumento 400X.



Para a contagem de esporos, foi diluída a 0,1 g suspensão do inóculo para 300 mL de água deionizada, adicionando 4 mL de solução *twen* 80 e agitação com auxílio de um agitador magnético por 15 minutos. Colocou-se esta solução, com auxílio de uma micropipeta estéril, na câmara de Neubauer e anexou a lamínula de vidro para fixação da solução. A realização da contagem dos esporos em microscópio ótico foi utilizando um aumento de 400 X. O cálculo da concentração de esporos na suspensão foi realizado de acordo com a Equação 7, onde NE é o valor médio de esporos em cada quadrante da placa e FD é o fator de diluição (ROCHA, 2010).

$$\left[ \frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right] = \frac{NE}{10^{-4}\text{mL}} \times FD \quad (7)$$

#### 4.2. Preparo do substrato

Para o processo de fermentação no estado sólido, adotou-se a matriz sólida composta por bagaço de malte de cevada (substrato) e bagaço de cana-de-açúcar (suporte).

O bagaço de malte (BM) foi obtido a partir de cervejarias artesanais da cidade de Jerônimo Monteiro – ES. Manteve-se o bagaço de malte congelado e armazenado no congelador à -18 °C, com o objetivo de preservar as características e evitar a fermentação precoce do material.

O bagaço de malte congelado foi acondicionado em bandejas de aço inox e submetido a secagem em um secador de bandejas à temperatura de 60 °C até pesagem constante, após 24 horas de secagem. O resíduo seco foi moído em moinho de facas tipo Willy (SOLAB) e armazenado em recipiente de plástico fechado à temperatura ambiente.

#### 4.3. Preparo do suporte

A utilização do suporte para a FES foi necessária, tendo como objetivo o aumento da porosidade da matriz sólida do meio fermentativo. Como suporte no processo fermentativo, utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar (BC).

O BC, já triturado, foi obtido na Usina Paineiras, localizada em Itapemirim-ES. Esse material foi armazenado em congelador à -18 °C até o uso, evitando perdas das suas propriedades e ação de microrganismos. O preparo do suporte foi realizado por sucessivas lavagens em água corrente, para remoção de seus açúcares residuais e posteriormente, secagem em estufa à 105 °C por aproximadamente 8 horas, temperatura e tempo necessário para redução da sua umidade. O BC foi peneirado para obtenção da granulometria inferior a 2 mm, granulometria adequada para aumento da porosidade da matriz sólida.

#### 4.4. Caracterização do substrato

Todas as análises de caracterização do resíduo de bagaço de malte foram realizadas em três repetições.

#### 4.4.1. Granulometria

A granulometria foi ajustada em agitador de peneiras (BERTEL). Para a seleção da granulometria utilizada no substrato, utilizou-se todo material retido na peneira de abertura 12 mesh Tyler (1,40 mm) O material fino, ou seja, o que passou pela abertura de 1,40 mm, optou-se pelo descarte, pois o mesmo poderia compactar a fermentação e causar problemas com a oxigenação do meio.

#### 4.4.2. pH

O pH foi medido de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (1985), onde foi preparado uma suspensão com 1 g da amostra sólida e 10 mL de água deionizada. Após a homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos e assim, mensurado o pH em potenciômetro digital (DM-22 - DIGIMED), previamente calibrado com as soluções padrões.

#### 4.4.3. Umidade

Para análise de umidade pesaram-se de 3 a 5 g da amostra em uma placa de Petri previamente seca e aferida. As placas de Petri foram colocadas em estufa a 105 °C por 24 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A umidade, em base úmida, foi determinada conforme a Equação 8.

$$Umidade (x.b.u \%) = \frac{(massa\ inicial - massa\ final\ da\ amostra)}{massa\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (8)$$

x.b.u = base úmida.

Foi utilizado outro método para determinação de umidade, pelo método termogravimétrico por meio da balança de análise de umidade (MOC63u), um equipamento que determina a umidade por perda de massa. A estrutura do equipamento consiste em um sensor de alumínio "UNIBLOC", que garante a precisão do resultado e aquecimento por lâmpada de halogênio. Compararam-se as medidas com o método gravimétrico em estufa e avaliou a confiabilidade do método.

#### 4.4.4. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração da amostra em mufla de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (1985). Cadinhos de porcelana vazios e limpos foram depositados em mufla e deixados a 550 °C, durante 15 minutos. Após o preparo dos cadinhos, foram deixados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados vazios. Pesou-se cerca de 2 gramas da amostra e levou-se a mufla durante 6 horas, a 550 °C, até obter a cinza clara. Após, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente por 2 horas e pesadas. O teor de cinzas foi determinado conforme a Equação 9.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (9)$$

#### 4.4.5. Minerais

Para de determinação dos minerais fósforo, cálcio, magnésio e potássio foi realizado a digestão úmida nitroperclórica (HNO<sub>3</sub> + HClO (3:1)), conforme a metodologia descrita pela EMBRAPA (2009).

Para a digestão, transferiu-se 0,5 g de amostra seca de BM triturado para os tubos digestores e adicionou 8 mL da mistura ácida (HNO<sub>3</sub> + HClO), mantendo a frio por período de 3 horas no bloco digestor. Aqueceu-se lentamente até 120 °C e manteve nessa temperatura até o total desprendimento do vapor castanho de NO<sub>2</sub>. Aumentou-se a temperatura para 200 °C mantendo-a até o desprendimento do vapor branco de HClO. Esse procedimento durou em torno de 3 horas. Após a digestão, esfriaram-se os blocos e completaram os volumes até 25 mL de H<sub>2</sub>O para a próxima análise.

##### 4.4.5.1. Fósforo

Foi determinado a concentração de fósforo por meio do método de espectrofotometria com azul-de-molibdênio. O método tem princípio na reação do molibdato (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), formando um complexo de coloração azul, e a intensidade da coloração é proporcional à concentração de P.

Pipetou-se 5 mL da solução digerida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em tubo de 30 mL e adicionou-se 10 mL de uma solução de molibdato, 2 g de ácido ascórbico e agitou-se. Após 30 minutos foram realizadas as leituras no espectrofotômetro (IL-227 - KASUAKI) a 660 nm e pela curva padrão do P, com concentrações de 0; 0,5 mg L<sup>-1</sup>; 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 2,0 mg L<sup>-1</sup>; 3,0 mg L<sup>-1</sup> e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, obtiveram-se os valores das concentrações em mg L<sup>-1</sup>. O teor de P foi calculada com auxílio Equação 10.

$$P (\%) = mg L^{-1} \times 5 \quad (10)$$

#### 4.4.5.2. Cálcio

A determinação de cálcio foi feita com a da técnica de espectrofotometria de absorção atômica (EAA). O princípio do método consiste na aspiração das soluções na faixa de 2000 °C a 2500 °C transformando-os em estado fundamental dos átomos (M<sup>0</sup>). O átomo de cada elemento químico absorve a energia em um comprimento de onda definida. A quantidade de energia é proporcional à população do átomo na chama, que, por sua vez é proporcional à concentração da solução. Na determinação de um metal por EAA, utiliza-se a lâmpada de cátodo oco do próprio metal como fonte de energia (EMBRAPA, 2009).

O tipo de chama para a determinação de cálcio é ar-acetileno, o comprimento de onda para a quantificação do Ca é de 422,7 nm.

Pipetou-se 1,0 mL da solução da digestão para um tubo e completou-se o volume até 20,0 mL com H<sub>2</sub>O. Pipetou-se uma alíquota de 1,0 mL dessa solução em outro tubo de ensaio e adicionou-se 4,0 mL de solução lantânio (La) 1% e determinou-se a concentração de Ca com o auxílio da curva padrão com concentrações conhecidas de Ca de 0 mg L<sup>-1</sup>; 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 2,0 mg L<sup>-1</sup>; 4,0 mg L<sup>-1</sup> e 6,0 mg L<sup>-1</sup>. A adição de La na solução tem como objetivo minimizar a formação de composto refratário de Ca em Al e Fe na chama. A Equação 11 apresenta o cálculo para a determinação de cálcio.

$$Ca (\%) = mg L^{-1} \times 500 \quad (11)$$

#### 4.4.5.3. Magnésio

A determinação de magnésio foi realizada conforme a descrita pelo item 4.4.5.2, porém com a mudança do comprimento de ondas, para Mg é de 285,2 nm, e no tipo

de lâmpada, trocada para magnésio. A curva de calibração foi determinada a partir de concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup>; 0,2 mg L<sup>-1</sup>; 0,4 mg L<sup>-1</sup>; 0,8 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>. A determinação de magnésio foi realizada pela Equação 12.

$$Mg (\%) = mg L^{-1} \times 500 \quad (12)$$

#### 4.4.5.4. Potássio

A determinação de potássio (K) foi realizada pelo do método de fotometria de chama. O método tem princípio na aspiração de K da solução aquosa na chama gás liquefeito de petróleo, e as energias emitidas por esse elemento são proporcionais às concentrações de K.

Pipetou-se 2 mL da solução da digestão em tubos de 30 mL e completou-se o volume até 20 mL com H<sub>2</sub>O destilada (alíquota b). Após o ajuste do fotômetro de chama com a solução padrão de K com concentrações de 0; 5,0 mg L<sup>-1</sup>; 10,0 mg L<sup>-1</sup>; 20,0 mg L<sup>-1</sup> e 40,0 mg L<sup>-1</sup>, efetuou-se a leitura da alíquota b. O cálculo para a determinação de potássio na amostra foi realizado pela Equação 13.

$$K(\%) = mg L^{-1} \times 5 \quad (13)$$

#### 4.4.6. Proteína bruta

Determinou-se o teor das proteínas brutas, utilizando o método de Kjeldahl, adaptado por Fornazier (2015). Esse método baseia-se em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na primeira etapa, pesou-se 200 mg da amostra seca em balança analítica, adicionou-se no tubo 1,5 g da mistura de catalisadores (proporção: 1:10 de sulfato de cobre pentaidratado – CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e sulfato de potássio – K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e adicionou-se 6 mL de ácido sulfúrico PA. No aparelho digestor, colocou-se para aquecer o tubo digestor com aumento gradativo da temperatura (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 °C) em intervalos de 10 minutos. Após a estabilização da temperatura de 350 °C, aguardou-se cerca de 2,5 horas até a amostra atingir coloração verde claro e a fumaça do ácido estivesse quase desaparecendo, colocando posteriormente os tubos para resfriar dentro da capela de fluxo laminar.

Após a digestão, a etapa de destilação foi realizada. No destilador de nitrogênio, colocou-se tubo digestor cerca de 15 a 20 mL de hidróxido de sódio a 33,5%. Na

saída do destilador posicionou-se um erlenmeyer contendo uma solução de ácido bórico 4% (25 mL) + água destilada (25 mL). A destilação ocorreu até o volume de saída no erlenmeyer atingisse 100 mL e destilou-se o branco até 150 mL para melhor identificação de cor.

Por fim, após a destilação da solução, realizou a etapa de titulação, no qual, utilizando uma bureta de 50mL, completou-se seu volume com ácido clorídrico 0,1 N com fator de correção conhecido e titulou-se até a alteração de cor para o róseo, padronizando a cor da viragem. Anotou-se o volume gasto de HCl e calculou-se a porcentagem de nitrogênio de acordo com a Equação 14.

$$\%N = \frac{HCl \text{ gasto} \times \text{fator de correção HCl} \times \text{Normalidade HCl} \times 14,007 \times 100}{\text{peso da amostra (mg)}} \quad (14)$$

O conteúdo de nitrogênio obtido será convertido em proteína por meio de um fator de conversão, que para alimentos em geral é determinado o valor médio de 6,25, calculado pela Equação 15 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

$$\% \text{ Proteína bruta} = \%N \times 6,25 \quad (15)$$

#### 4.4.7. Lipídeos

Para determinação de lipídeos, utilizou-se o método de extração direta em Soxhlet, que tem como princípio básico a extração da fração lipídica da amostra com éter de petróleo e posteriormente a remoção do solvente por destilação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ 1985). Pesou-se cerca de 2 gramas da amostra de bagaço de malte seco em cartucho de Soxhlet. Acoplou-se o extrato ao balão de fundo chato previamente aferido a 105 °C. A extração foi realizada com éter de petróleo por 8 horas. Após a extração, recuperou-se a maior parte do éter de petróleo por destilação e em seguida eliminou-se o teor residual do solvente por banho termostato. Após a etapa de extração completa, dessecou a amostra em estufa a 105 °C até que não houvesse variação de massa após duas pesagens consecutivas, podendo assim, calcular o teor de lipídeos presente na amostra, conforme a Equação 16.

$$\% \text{ Lipídeo} = \frac{(\text{massa balão} + \text{gordura}) - \text{massa balão}}{\text{massa da amostra}} \quad (16)$$

#### 4.4.8. Carboidratos

A quantificação de carboidratos foi determinada pelo método da diferença, no qual se subtrai de 100 as porcentagens de umidade, cinzas, proteínas, gorduras e fibras, segundo RDC nº 360 (BRASIL, 2003). A Equação 17 apresenta a fórmula para o cálculo.

$$\%Carboidratos = 100 - \%(umidade + cinzas + proteínas + gorduras) \quad (17)$$

#### 4.4.9. Energia

O cálculo de energia foi realizado pela relação com os valores de carboidratos, proteínas e lipídeos, onde se multiplica o valor de carboidratos pelo fator de conversão 4, o valor de proteínas pelo mesmo fator de conversão 4 e o valor de lipídeos pelo fator de conversão 9. A unidade de energia é representada em quilojoule (KJ).

#### 4.5. Preparo do meio mineral de suplementação para fermentação

Nos meios de fermentação foi utilizada solução salina como forma de suplementação de minerais para o fungo *Aspergillus niger*, conforme o trabalho de Urbánszki, Szakács e Tengerdy (2000). Foi preparada a solução nutriente com a seguinte composição: 5 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g.L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1 g.L<sup>-1</sup> NaCl; 5,0 mg.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,6 mg.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>; 3,45 mg.L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Após o preparo da solução salina, a mesma foi esterilizada a 120 °C por 20 minutos. A solução salina foi calculada em relação à quantidade da matriz sólida adicionada (BM e BC).

#### 4.6. Cultivos em estado sólido

As FES seguiram os planejamentos experimentais DCCR (item 4.7) para otimização do processo de produção enzimática. Inicialmente pesou-se as proporções pré-definidas de substrato (bagaço de malte) e suporte (bagaço de cana-

de-açúcar) totalizando 10 g. Esse meio foi suplementado com a solução nutriente, ajustando a umidade de acordo com o planejamento. Todo material foi esterilizado por 20 minutos a 120 °C e 0,98 bar.

Para a inoculação com o fungo foi acrescentado 0,1 g da cultura estoque de *Aspergillus niger* em solução nutritiva esterilizada, de forma a se obter  $10^7$  esporos de *A. niger*. A fermentação aconteceu em estufa bacteriológica (NOVA Instruments) controlada a 30 °C e tempo determinado pelo planejamento experimental.

#### 4.7. Planejamento experimental DCCR

O DCCR foi realizado com 3 fatores ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ). Este planejamento foi utilizado para selecionar o ponto ótimo de produção de enzimas amilolíticas e gerar um modelo quadrático completo que descreva o processo.

Para o estudo, nomearam-se os fatores:  $x_1$  = umidade em base úmida;  $x_2$  = tempo, dado em horas e  $x_3$  = porcentagem de substrato. Pela Equação 18 foi possível realizar a codificação e decodificação dos fatores estudados, tornando, assim, possível relacionar os valores reais para cada variável independente em estudo com os valores do DCCR.

$$x_n = \frac{x_0 - \bar{x}}{\sigma_x} \quad (18)$$

Em que:  $x_n$  é o valor da variável codificada,  $x_0$  é o valor da variável não codificada,  $\bar{x}$  é o valor médio para cada variável e  $\sigma_x$  é o delta para cada fator.

As tabelas 3 e 4 mostram o delineamento adotado para o DCCR  $2^3$ , contendo 5 pontos centrais e 6 pontos axiais.

Tabela 3 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes para a fermentação.

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$x_1$ (Umidade, % b.u)	60	65	72,5	80	85
$x_2$ (Tempo, h)	48	72	108	144	168
$x_3$ (Porcentagem de substrato)	50	58	70	82	90

O valor de  $\alpha$  foi calculado em função do número de variáveis independentes (K) por meio da Equação 4 e apresentados na Equação 19

$$\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}} \quad (4)$$

Para  $k = 3$ :

$$\alpha = (2^3)^{\frac{1}{4}} = 1,6818 \quad (19)$$

As faixas de variação entre o limite inferior e o limite superior de cada variável independente foram estabelecidas de acordo com testes prévios.

Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental DCCR para a fermentação com os valores codificados e decodificados para os fatores  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ .

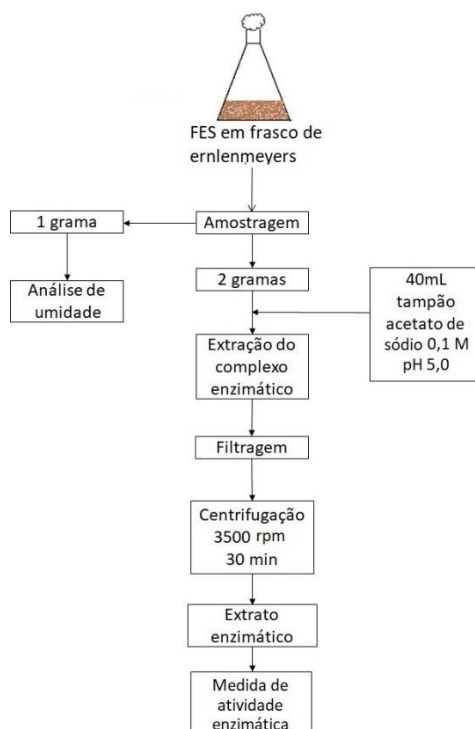
Tratamento	Umidade (%)	Tempo (horas)	BM (%)
	( $x_1$ )	( $x_2$ )	( $x_3$ )
1	65 (-1)	72 (-1)	58 (-1)
2	80 (1)	72 (-1)	58 (-1)
3	65 (-1)	144 (1)	58 (-1)
4	80 (1)	144 (1)	58 (-1)
5	65 (-1)	72 (-1)	82 (1)
6	80 (1)	72 (-1)	82 (1)
7	65 (-1)	144 (1)	82 (1)
8	80 (1)	144 (1)	82 (1)
9	60 (-1,6818)	108 (0)	70 (0)
10	85 (1,6818)	108 (0)	70 (0)
11	72,5 (0)	48 (-1,6818)	70 (0)
12	72,5 (0)	168 (1,6818)	70 (0)
13	72,5 (0)	108 (0)	50(-1,6818)
14	72,5 (0)	108 (0)	90 (1,6818)
15	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)
16	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)
17	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)
18	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)
19	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)

O planejamento experimental DCCR foi analisado utilizando-se o *software Statistica 7.0*® para obtenção da regressão dos dados experimentais, o modelo experimental, os testes de normalidade, testes estatísticos para a regressão e o diagrama de Pareto, com objetivo de avaliar a influência dos fatores.

#### 4.8. Análises do substrato fermentado

Após as fermentações concluídas, foi retirado 1 g de amostra para análise de umidade em balança de análise de umidade (MOC63u), conforme o item 4.4.3. Em seguida, realizou-se a etapa de extração das enzimas do meio sólido fermentado. Retirou-se uma amostra de 2 g e foi adicionado 40 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 numa proporção de 1:20. A suspensão formada ficou em agitação em incubadora agitadora orbital (SP-180/B - SPLABOR) por 60 minutos em temperatura de 25°C. Em seguida foi filtrada em compressa gaze para remoção dos sólidos presentes, obtendo-se um extrato escuro, que foi centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos à temperatura de 25 °C em centrífuga digital (NT-810 - Novatécnica). Após o processo de centrifugação, o sobrenadante resultante, contendo o extrato enzimático, foi utilizado para a análise da atividade enzimática. A Figura 17 representa o fluxograma do experimento completo.

Figura 17 – Fluxograma para análise da atividade enzimática.



##### 4.8.1. Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada por meio da liberação de açúcares redutores totais (ART), dosados pelo método DNS (MILLER, 1959).

O reagente DNS foi preparado com 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de uma solução de NaOH 2,0 mol/l. Essa mistura foi adicionada a uma solução de 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos em 500 mL de água destilada, sob aquecimento e agitação constante. Após resfriamento, o volume foi aferido para 1000 mL (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Para a hidrólise enzimática, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de solução 1% de amido solúvel em água deionizada foram alocados em tubos de ensaios. O tubo foi aquecido em banho termostático (Q334M-28 - QUIMIS) a 60 °C por 30 min, garantindo condições adequadas de hidrólise. Após a etapa de hidrólise, adicionou 1 mL de DNS, aqueceu a 100 °C por 5 minutos e resfriou em banho de gelo, para garantir o fim da reação, até temperatura ambiente. Essa etapa indica os açúcares redutores foram liberados do amido hidrolisado. As soluções contidas no interior dos tubos de ensaios foram medidas em espectrofotômetro (IL-227 - KASUAKI) a 540 nm e, pela curva padrão da glicose, obtiveram-se os valores das concentrações de ART (CN), para cada tratamento realizado no DCCR.

Para evitar possíveis leituras de açúcares já presentes na extração do extrato enzimático, foi realizado um branco enzimático (BE). Foi realizado o mesmo procedimento para a análise da CN, exceto na etapa de inserção da enzima. A adição da enzima é feita após os 60 minutos no banho termostático, garantindo assim, a não conversão do amido solúvel em glicose. Esse processo foi determinado para ter a concentração real (CR) de ART na hidrólise. A concentração real de ART da hidrólise foi calculada pela diferença entre CN e BE, expressa pela Equação 20.

$$CR = CN - BE \quad (20)$$

Segundo a comissão internacional para a nomenclatura bioquímica, por definição, a atividade enzimática de enzimas hidrolíticas (U) é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto nas condições de pH e temperaturas ótimas (ADOLPH; LORENZ, 1980). As atividades enzimáticas nos líquidos biológicos são em geral referidas a 1 mL, sendo expressas em U/mL. No meio fermentativo sólido, atividade enzimática é expressa em massa de material seco (MS) que está na fermentação, sendo expressas em U/gMS.

#### 4.9. Otimização e cinética de produção enzimática

O modelo de otimização foi apresentado no formato da Equação 21, obtido pelo método de superfície de resposta.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + e_i \quad (21)$$

A função “*fmincon*” do software Matlab 2015 foi utilizada para determinar os pontos ótimos para as variáveis estudadas. Essa função é usada em casos de otimização não linear restrita, que tem o objetivo de calcular um valor mínimo ou máximo de uma função escalar de várias variáveis a partir de uma estimativa inicial pelo método de programação quadrática sequencial. A região de busca do modelo é para intervalos entre a região dos dados experimentais, ou seja,  $-\alpha$  e  $+\alpha$  para as 3 variáveis independentes em estudo.

A validação do modelo foi realizada por experimento de cinética de fermentação, no qual, avaliaram-se a atividade enzimática nas condições ótimas propostas pelo método, retirando amostras em tempos pré-definidos.

#### 4.10. Efeito do pH na extração e na estabilidade da $\alpha$ -amilase

O efeito do pH na atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase foi avaliado na faixa de 4,0 a 9,0 com intervalos de 0,5 unidades. As soluções tamponantes utilizadas foram, tampão acetato (pH 3,0-5,0), tampão fosfato (pH 5,5-7,0 e pH 8,5-9,0), tampão Tris-HCl (pH 7,5) e tampão borato (pH 8,0).

A melhor condição para o pH foi determinada utilizando as soluções tampão na extração do complexo enzimático, conforme descrito no item 4.7 e avaliando a atividade enzimática pelo método de Miller (1959), conforme o item 4.7.1.

A estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH foi avaliada deixando o sobrenadante extraído em repouso por 24 e 48 horas em temperatura ambiente. Foi realizado o teste f para avaliação da existência de diferença entre as médias dos tratamentos, seguido do teste de Tukey para comparação e classificação das médias, entre si, dos tratamentos em diferentes pHs.

#### 4.11. Determinação das condições ótimas da hidrólise enzimática

A partir dos resultados obtidos para a otimização do meio de cultivo para a maximizar a produção de  $\alpha$ -amilase, foi preparado um novo meio, inoculando-se o microrganismo e após o tempo determinado, foi obtido o extrato bruto enzimático para as análises de hidrólise. Para isso, realizou um DCCR com 2 fatores (A e B), no qual, A é denominado a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e B o tempo de hidrólise (min). As Tabelas 5 e 6 mostram o delineamento adotado para o DCCR  $2^2$ , contendo 3 pontos centrais e 4 pontos axiais.

Tabela 5 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes, para a hidrólise enzimática.

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A (Temperatura, $^{\circ}\text{C}$ )	50	54,4	65	75,6	80
B (Tempo, min)	5	8,7	17,5	26,3	30

$\alpha=1,4142$ , calculado com a Equação 4, para  $k=2$ .

As faixas de temperatura foram determinadas baseado na temperatura ótima de atuação da atividade enzimática.

Tabela 6 – Planejamento experimental para hidrólise enzimática

Tratamento	Temperatura (A)	Tempo (B)
1	54,4 (-1)	8,7 (-1)
2	75,6 (+1)	8,7 (-1)
3	54,4 (-1)	26,3 (1)
4	75,6 (+1)	26,3 (1)
5	50 (-1,4142)	17,5 (0)
6	80 (1,4142)	17,5 (0)
7	65 (0)	5 (-1,4142)
8	65 (0)	30 (1,4142)
9	65 (0)	17,5 (0)
10	65 (0)	17,5 (0)
11	65 (0)	17,5 (0)

A atividade enzimática foi realizada conforme o item 4.7.1 e todos os testes estatísticos para esse planejamento foram realizados utilizando o *software* estatística 7.0<sup>®</sup>. A otimização das condições de hidrólise fora realizada pelo software Matlab 2015 pela função "*fmincon*", conforme o item 4.8.

#### 4.12. Caracterização cinética da $\alpha$ -amilase

A caracterização da cinética da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase foi realizada a partir das condições ótimas para a FES nas variáveis estudadas (umidade, tempo de fermentação e porcentagem do bagaço de malte).

Foram preparadas soluções de amido comercial solúvel nas seguintes concentrações: 5,0 g/L; 7,5 g/L; 10 g/L; 20 g/L; 30 g/L; 40 g/L e 50 g/L dissolvidos em água deionizada à 50 °C sob agitação. A partir de então foram utilizados 0,5 mL de cada solução de amido, adicionado 0,5 mL do extrato enzimático obtido do sobrenadante após a centrifugação. As amostragens para a realização da cinética da hidrólise foi de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; e 40 min. O procedimento para determinação da medida da atividade de  $\alpha$ -amilase foi o mesmo descrito no item 4.7.1. Foram calculadas a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da  $\alpha$ -amilase, segundo Lehninger (1993).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização do bagaço de malte

Após a obtenção, o bagaço de malte foi lavado com água para remover os açúcares residuais provenientes das etapas do processo cervejeiro, e secado a 60° C até pesagem constante. Este procedimento teve a finalidade da preservação do material durante a estocagem. Após o processo de brassagem o BM apresenta uma umidade aproximadamente de 80% que favorece a ação de bactérias, leveduras e fungos, deteriorando o material (CORDEIRO; EL-AOUAR; GUSMÃO, 2012; MUTHUSAMY, 2014). Além da conservação do BM, outro fator que é favorecido por meio da secagem é o seu volume, uma vez que diminuído o teor de água, o volume obtém-se uma drástica redução, acarretando em menores custos de armazenamento.

A composição química do BM seco e triturado está apresentado na Tabela 7. Os valores encontrados no substrato em estudo apresentam resultados semelhantes segundo Carvalheiro *et al.*, (2004), Mussatto e Roberto (2006), Wilhelmso, Lehtinen e Weymarn, (2009), Cordeiro, El-Aouar e Gusmão, (2012); e Meneses *et al.*, (2013).

Tabela 7 – Tabela de composição centesimal do bagaço de malte.

Componente	Valores obtidos (%)
Umidade	6,66 ± 0,32
Carboidratos	70,58 ± 0,97
Proteína	16,13 ± 0,15
Lipídeos	4,37 ± 0,89
Cinzas	2,26 ± 0,01
Fósforo	0,039 ± 0,0006
Cálcio	0,162 ± 0,0081
Magnésio	0,149 ± 0,0035
Potássio	0,084 ± 0,0012
Energia (Kcal/g)	366,99 ± 0,21

No presente estudo, o teor de aproximadamente 70,58 % de carboidrato foi encontrado. Esse alto teor de carboidrato representa as frações e seus componentes da fibra bruta (celulose, hemicelulose e lignina insolúvel) e os extratos

não nitrogenados (açúcares, amidos e pectinas). Segundo Xiros e Christakopoulos (2012), Steiner *et al.* (2015) e Lynch, Steffen e Arendt (2016) a composição típica do BM apresenta cerca de 20-25% de hemicelulose, 12-25% de celulose e 12-28% de lignina. Os resíduos de glicose ligados à celulose [ $\beta$ -1,4] são outros tipos de polissacarídeos abundantes no BM. Níveis baixos de (1-3, 1-4) –  $\beta$ -D-glucano e amido também podem estar presentes. Os monossacarídeos mais abundantes do BM são xilose, glicose e arabinose (MANDALARI *et al.*, 2005, FORSELL *et al.*, 2008).

Observa-se que o bagaço de malte produzido a partir de 100% de malte de cevada é um material rico em proteína apresentando teor de aproximadamente 16,13 %. Xiros *et al.* (2008) e Mussatto e Roberto (2006) encontraram teores próximos aos do presente estudo, apresentando valores de 15,2 % e 14,2 %, respectivamente. Outros autores encontraram teores mais elevados de proteínas entre 20-31% (SANTOS *et al.*, 2003; CARVALHEIRO *et al.*, 2004; MENESES *et al.*, 2013). O BM é um material heterogêneo, que varia de cervejaria para cervejaria. Isso se deve a vários fatores, como a variedade de cereais, o tempo de colheita, o regime da maltagem e se as adições de adjuntos foram empregadas durante a infusão.

Para o pH do substrato obtiveram-se resultados de  $5,93 \pm 0,14$ . Esses resultados são próximos ao estimado pelos cervejeiros artesanais em cujo os processos de brasagem, a faixa de pH é de 5,1-5,7 (BRAWKaiser, 2011).

## 5.2. Otimização das condições de fermentação

Os valores da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase obtidos nas diferentes condições de ensaio assim como os da matriz codificada do planejamento encontram-se descritos na Tabela 8, com destaque para o melhor resultado obtido no ensaio 10, atingido a atividade enzimática de 790,75 U/gMS.

Usando o *software* Statística 7.0<sup>®</sup>, foram feitas as análises estatísticas dos resultados. Foram estimados os efeitos das variáveis estudadas assim como a interação entre elas. A significância dos efeitos das variáveis estudadas umidade, tempo e porcentagem de BM sobre a atividade de  $\alpha$ -amilase, foram testadas pelos efeitos padronizados das variáveis (valores de  $t$ ) e a probabilidade da significância do teste (valor de  $p$ ), apresentados na Tabela 9.

Tabela 8 – Resultados do planejamento experimental para a FES para os fatores codificados.

Ensaio	Umidade (%) (x <sub>1</sub> )	Tempo (horas) (x <sub>2</sub> )	BM (%) (x <sub>3</sub> )	Atividade Enzimática (U/gMS)
1	65 (-1)	72 (-1)	58 (-1)	286,90
2	80 (1)	72 (-1)	58 (-1)	356,09
3	65 (-1)	144 (1)	58 (-1)	324,68
4	80 (1)	144 (1)	58 (-1)	515,70
5	65 (-1)	72 (-1)	82 (1)	463,38
6	80 (1)	72 (-1)	82 (1)	516,78
7	65 (-1)	144 (1)	82 (1)	461,09
8	80 (1)	144 (1)	82 (1)	526,26
9	60 (-1,6818)	108 (0)	70 (0)	356,49
<b>10</b>	<b>85 (1,6818)</b>	<b>108 (0)</b>	<b>70 (0)</b>	<b>790,75</b>
11	72,5 (0)	48 (-1,6818)	70 (0)	437,58
12	72,5 (0)	168 (1,6818)	70 (0)	460,55
13	72,5 (0)	108 (0)	50(-1,6818)	340,14
14	72,5 (0)	108 (0)	90 (1,6818)	537,90
15	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)	456,20
16	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)	470,97
17	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)	436,97
18	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)	474,40
19	72,5 (0)	108 (0)	70 (0)	500,93

Tabela 9 – Coeficientes de regressão do DCCR da FES para a produção de  $\alpha$ -amilase.

Variáveis	Coeficientes de regressão	Erro padrão	Test <i>t</i>	Valor de <i>p</i>
Umidade (L)	<b>81,2135</b>	<b>16,76157</b>	<b>4,84522</b>	<b>0,000515</b>
Umidade (Q)	25,2154	16,76557	1,50399	0,160740
Tempo (L)	17,8086	16,76157	1,06247	0,310792
Tempo (Q)	-18,8203	16,76557	-1,12256	0,285530
BM (L)	<b>59,8038</b>	<b>16,76157</b>	<b>3,56791</b>	<b>0,004411</b>
BM (Q)	-22,3733	16,76557	-1,33448	0,209013
Tempo x BM	-23,7747	43,80017	-1,08560	0,300874

Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual à 0,820

Considerando o nível de significância de 5% (valor de  $p < 0,05$ ), é possível observar que os termos de umidade (termo linear – L) e a proporção de bagaço de malte (termo linear – L) apresentaram efeitos significativos para a produção de  $\alpha$ -amilase.

A partir dos resultados obtidos foi possível a construção do modelo da superfície de resposta ajustado, conforme a Equação 22.

$$\hat{y} = 470,10 + 81,21x_1 + 25,22x_1^2 + 17,81x_2 - 18,82x_2^2 + 59,80x_3 - 22,37x_3^2 - 23,77x_2x_3 \quad (22)$$

Em que:  $x_1$  = Valor codificado da umidade;  $x_2$  = valor codificado do tempo;  $x_3$  = valor codificado da porcentagem de BM.

O critério de seleção do modelo foi por meio da eliminação gradativa dos parâmetros não significativos ao nível de 5 %, de acordo com o valor de  $p$ , ou seja, a eliminação do parâmetro  $\beta_{12}$  e  $\beta_{13}$ , que obtiveram maiores valores de  $p$ , fizeram o valor do  $R^2_{adj}$  aumentar. O maior valor de  $R^2_{adj}$  foi utilizado para seleção do modelo. O modelo apresentou o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,820 e coeficiente de regressão ajustado ( $R^2_{adj}$ ) igual a 0,676.

Um estudo sobre a significância do modelo foi realizado pelo teste de análise da variância (ANOVA), apresentado na Tabela 10. O modelo representado pela Equação 22 apresentou valor de F calculado pela distribuição de Fisher 2,11 vezes maior do que o valor do F crítico (tabelado), o que torna o modelo significativo para o experimento realizado. A falta de ajuste do modelo foi testada e se mostrou significativa. Optou-se mesmo assim por escolher o modelo para a representação da FES pois o mesmo obteve um bom ajuste aos dados ( $R^2=0,820$ ).

Tabela 10 – ANOVA resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de  $\alpha$ -amilase.

95% de confiança	GL	SQ	QM	F calculado	$F_{(0,5;7;11)}$ crítico
Regressão	7	171159,0	24451,29	6,37*	3,012
Resíduo	11	42206,0	3836,91		
Falta de Ajuste	7	39970,0	5710,01	10,21*	6,094
Erro Puro	4	2236,0	558,99		
Total	18	213365,0			

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma de quadrado; QM = Quadrado médio

A Figura 18 representa os valores preditos versus os valores observados. Os pontos próximos à linha contínua mostram uma proximidade entre os dados experimentais e preditos, o que indica bom ajuste do modelo. Observa-se que o ponto com maior atividade de  $\alpha$ -amilase está com maior afastamento da reta,

indicando a importância de validação do modelo de superfície de resposta, além do estudo dessa região. O gráfico da homogeneidade da variância reafirma a confirmação citada acima. Na Figura 19 é possível observar a aleatoriedade da distribuição dos pontos, o que caracteriza variância constante dos erros para todas as observações.

Figura 18 - Valores preditos versus valores observados, resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de  $\alpha$ -amilase.

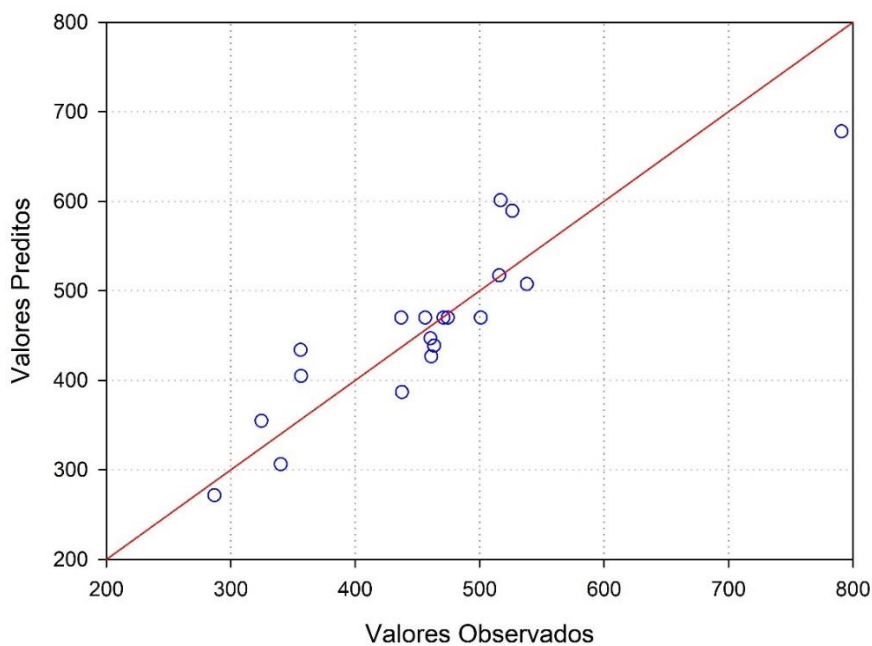
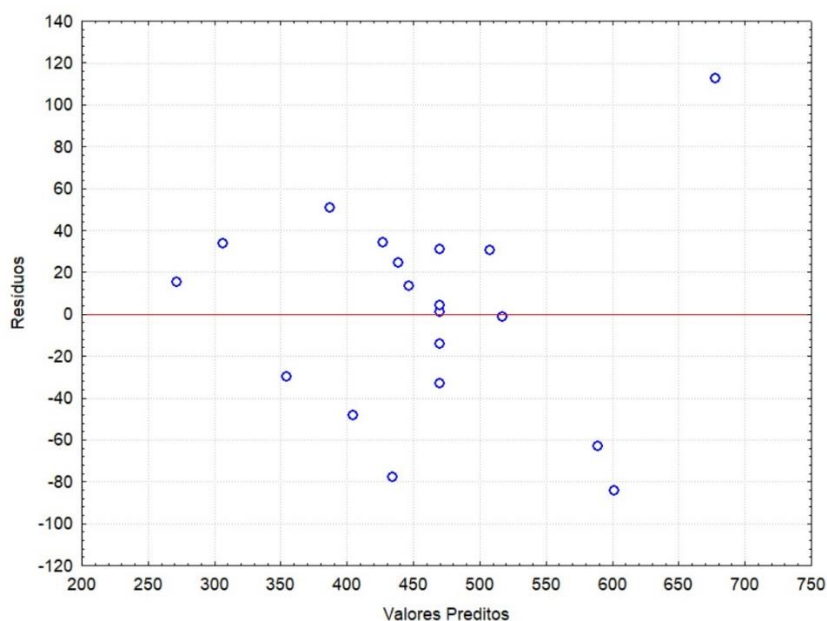


Figura 19 - Homogeneidade da variância, resultante do planejamento experimental da FES para otimização da produção de  $\alpha$ -amilase.



O efeito das variáveis independentes e das suas interações na produção de  $\alpha$ -amilase podem ser visualizados por meio da análise de superfície de resposta e as curvas de contorno. Nas Figuras 20 e 21 apresentam-se a atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase em função das variáveis umidade e tempo, fixada a variável BM centralizada. Observa que a atividade de  $\alpha$ -amilase é maximizada quando a umidade se aproxima do limite superior predefinido de 85 % e o tempo de cultivo de 102 horas. Nas Figuras 22 e 23 é possível observar a região máxima para a atividade de  $\alpha$ -amilase em função das variáveis umidade e porcentagem de BM, fixada a variável tempo de fermentação centralizada, situada em 85 % de umidade e a proporção de BM entre 70-80%. Por fim, as Figuras 24 e 25 apresentam a interação entre as variáveis tempo e porcentagem de BM, fixando a variável umidade centralizada, obtendo condições máximas, apresentadas pela superfície de resposta e pela curva de contorno, de tempo entre 100-120 horas de cultivo e proporção de bagaço de malte entre 82-90%.

O experimento apresentou uma restrição física de que a umidade não apresentasse valores próximos de 85% (limite máximo), pois nessas condições percebeu-se que a quantidade de água, na matriz sólida, estava próxima do ponto de saturação. Além disso, foi observado um maior crescimento na superfície da matriz sólida, o que poderia acarretar problemas quanto às características da FES. Optou-se, assim, restringir a umidade em 80%, tornando, então, possível determinar a atividade máxima de  $\alpha$ -amilase pelo modelo da superfície de resposta, expresso pela Equação 22. A atividade máxima de 618,20 U/gMS foi obtida nas condições de  $x_1$  igual a 1,0091,  $x_2$  igual a -0,1642 e  $x_3$  igual a 1,3365 para os valores codificados do modelo. Decodificando esses resultados, obtêm-se os valores de 80,0 % de umidade, 102,1 horas de fermentação e 85,9 % de proporção de BM na matriz sólida, conforme a Tabela 11.

Tabela 11 – Valores otimizados codificados e decodificados

Valor codificado		Valor decodificado	
$x_1$	1,0091	Umidade (%)	80,0
$x_2$	-0,1642	Tempo (h)	102,1
$x_3$	1,3365	BM (%)	85,9 %

Figura 20 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e tempo de fermentação.

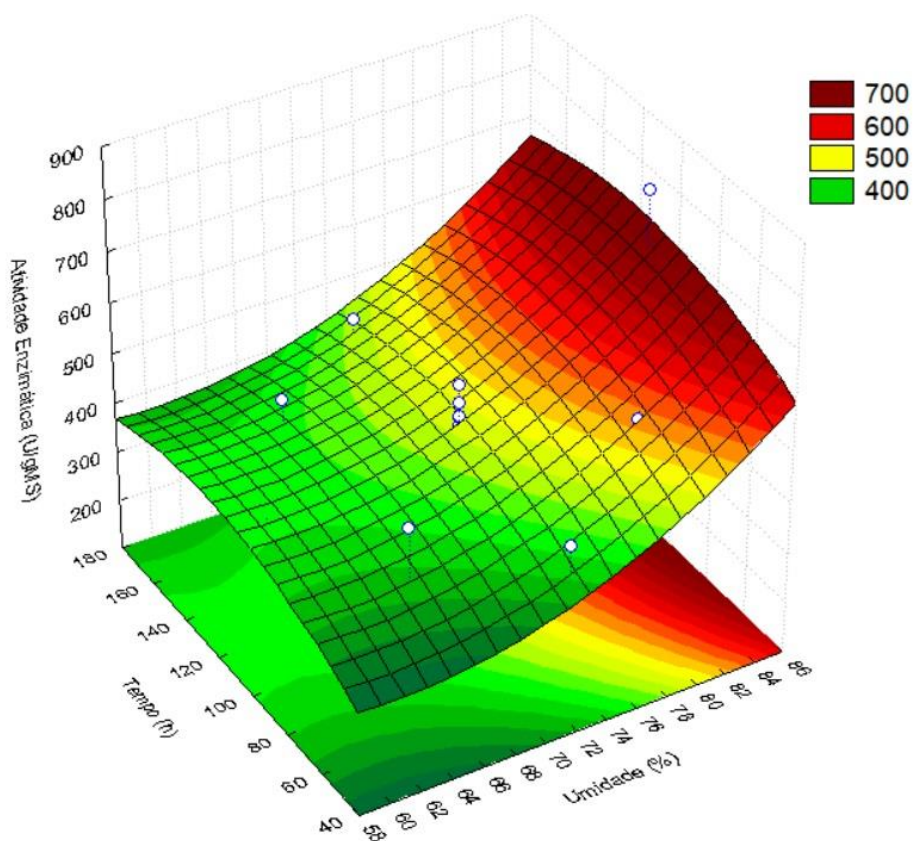


Figura 21 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e tempo de fermentação.

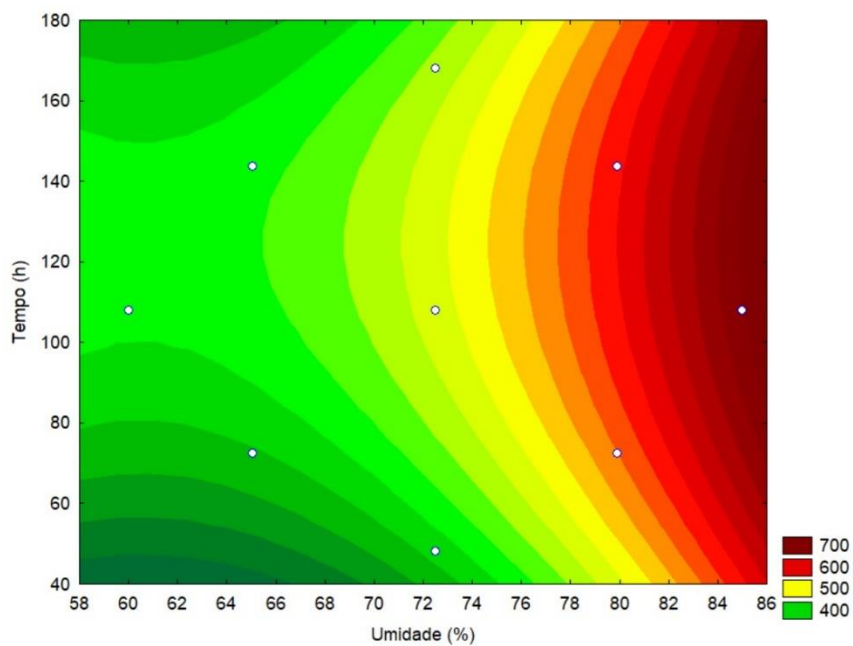


Figura 22 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e BM

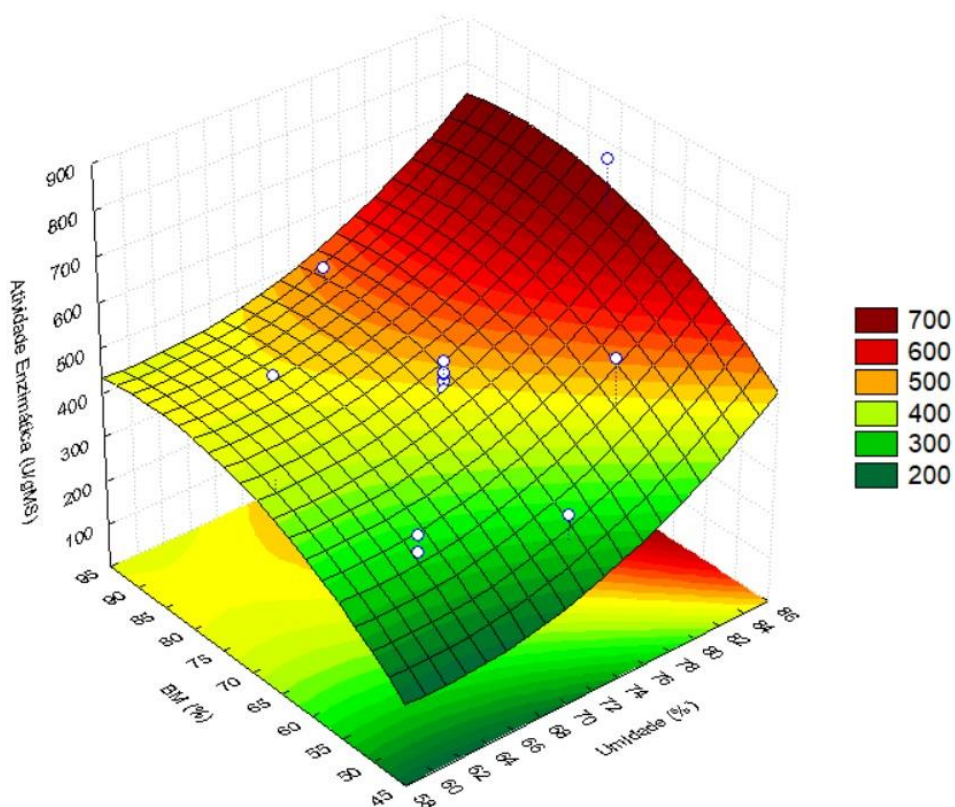


Figura 23 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade e BM

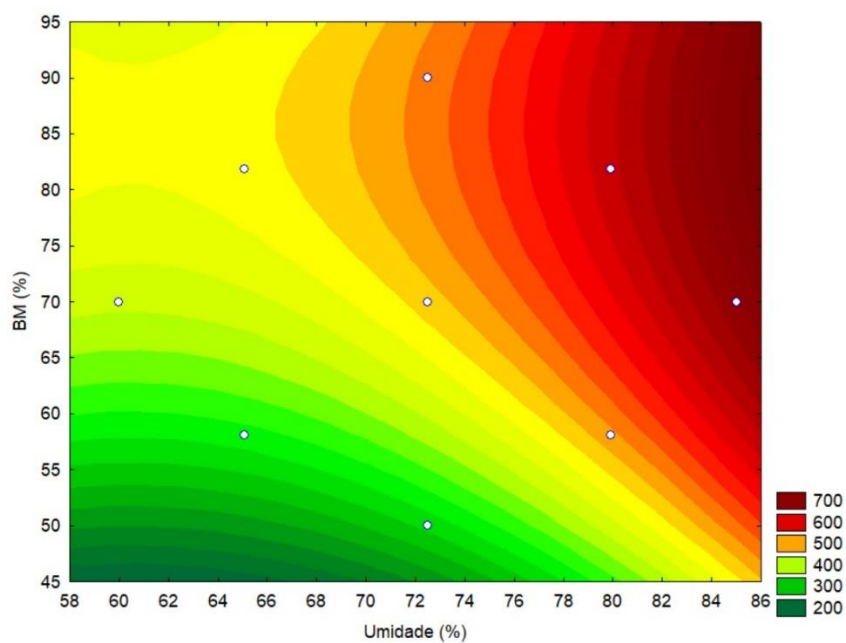


Figura 24 – Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis tempo de fermentação e BM

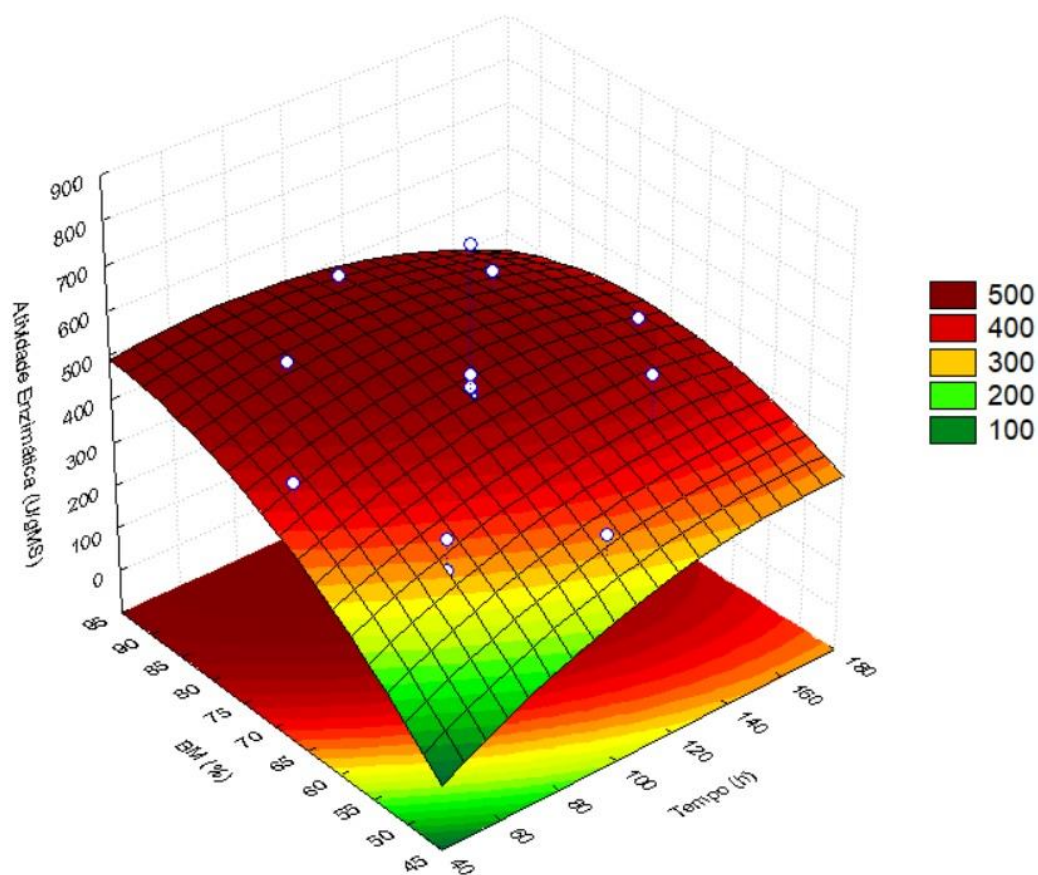
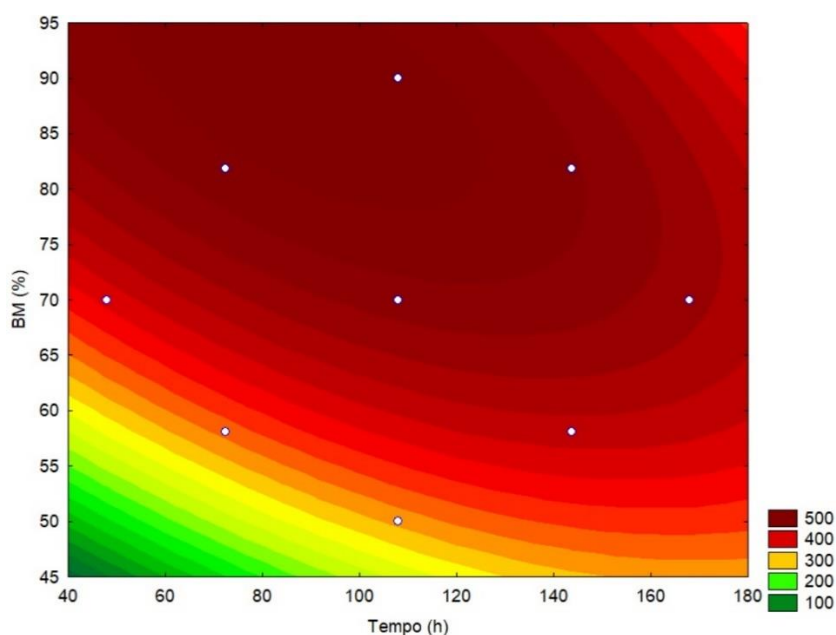


Figura 25 – Curva de contorno para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis tempo de fermentação e BM



A validação do modelo foi realizada a partir das condições ótimas para a FES pelo planejamento experimental de DCCR e apresentou resultados satisfatórios para

a atividade de  $\alpha$ -amilase com valor observado de  $622,25 \pm 33,76$  U/gMS, validando fielmente o modelo proposto pela técnica de superfície de resposta.

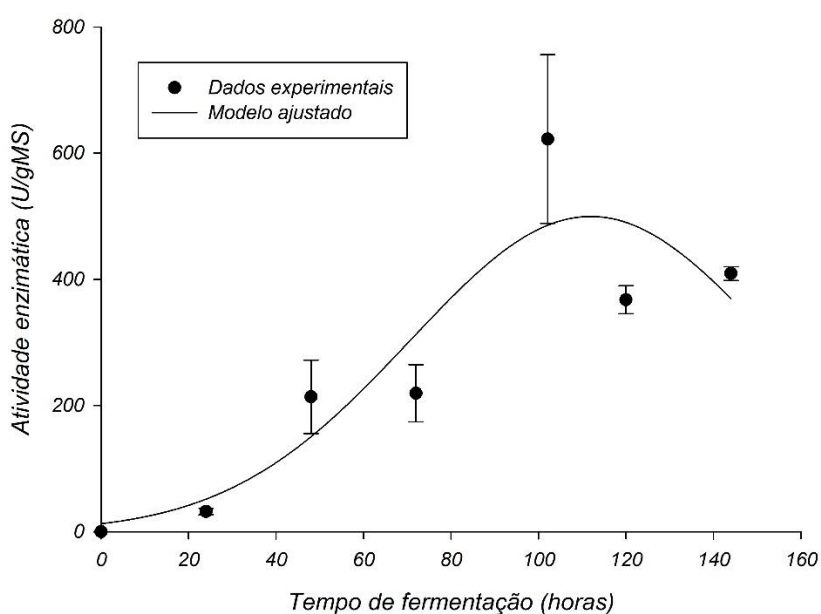
### 5.3. Cinética da produção de $\alpha$ -amilase nas condições otimizadas

A cinética da produção da enzima  $\alpha$ -amilase pelo fungo filamentososo *Aspergillus niger*, nas condições ótimas encontradas, foi realizada. Os resultados experimentais da cinética de fermentação estão expressos na Tabela 12. A Figura 26 apresenta a cinética de FES e o modelo Gaussiano de 3 parâmetros ajustado.

Tabela 12 – Dados experimentais da cinética de fermentação nas condições ótimas

Tempo (h)	Atividade Enzimática (U/gMS)
0	0
24	$31,86 \pm 5,82$
48	$213,72 \pm 45,27$
72	$219,45 \pm 45,27$
102,1	$622,25 \pm 133,76$
120	$367,56 \pm 22,18$
144	$409,16 \pm 10,94$

Figura 26 – Cinética da FES para produção de  $\alpha$ -amilase.



A Equação 23 apresenta a estrutura do modelo de ajuste para os dados experimentais e os parâmetros estimados pela regressão estão expressados na

Tabela 13. Considerando o nível de significância de 5% (valor de  $p < 0,05$ ), pode-se observar que os valores dos parâmetros estimados pela regressão são todos significativos.

$$\hat{y} = a \cdot \exp\left[-0,5\left(\frac{x-x_0}{b}\right)^2\right] \quad (23)$$

Tabela 13 – Coeficientes de regressão para a cinética de produção de  $\alpha$ -amilase

Parâmetros	Coeficiente da regressão	Erro padrão	Teste $t$	Valor de $p$
a	498,62	76,727	6,4986	0,0029
b	41,40	10,858	3,8128	0,0189
$x_0$	113,31	10,410	10,7882	0,0004

O teste de Fisher para o estudo da significância do modelo foi realizado, apresentado pela ANOVA, descritos na Tabela 14. O modelo apresentou  $R^2$  de 0,8344 e  $R^2_{adj}$  de 0,7515, mostrando um bom ajuste para a cinética da produção de  $\alpha$ -amilase por FES nas condições ótimas.

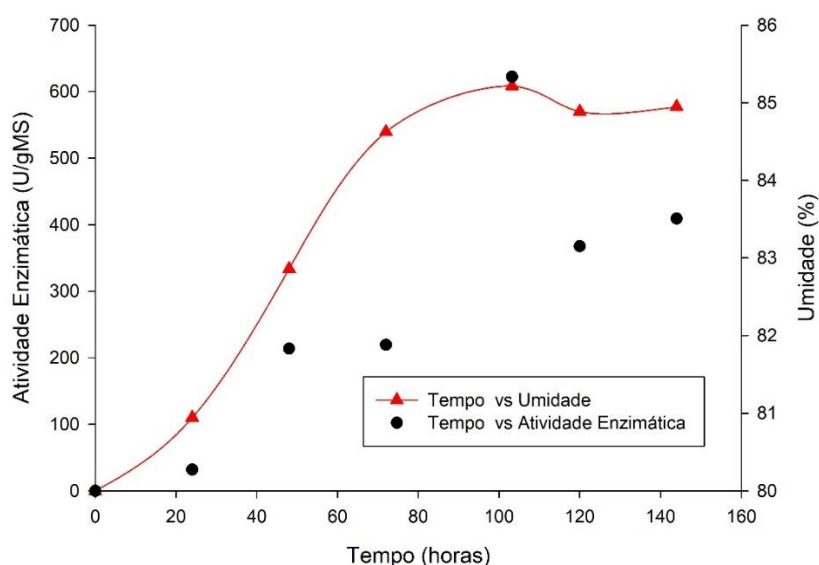
Tabela 14 – ANOVA da regressão para a cinética de produção de  $\alpha$ -amilase à 5% de significância

	Grau de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F calculado	F <sub>(0,5;2;4)</sub> crítico
Regressão	2	240463,0690	120231,5345	10,0748*	6,94
Resíduo	4	47735,6704	11933,92		
Total	6	288198,7394	48033,1232		

A cinética de fermentação é um estudo importante, que permite avaliar o comportamento do crescimento microbiano, a formação de produtos e até a característica do meio fermentativo como pH, umidade e atividade de água (SPIER, 2005; GUTARRA *et al*, 2009; SILVA, 2014). Tanyildizi, Selen e Özer (2009) avaliaram, por meio da cinética enzimática para produção de  $\alpha$ -amilase em FES, que o tempo para obtenção da atividade máxima a partir das condições otimizadas foram de 48 horas, utilizando torta de avelã como substrato. O tempo de fermentação para obtenção da atividade máxima, varia de cada enzima, para cada estudo, microrganismos e para as diversas condições de fermentação.

A Figura 27 apresenta os resultados do estudo onde foi avaliada a atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação. Observa-se que a umidade aumentou paralelamente com o crescimento da atividade enzimática e se estabilizou após o tempo de produção máxima de atividade de  $\alpha$ -amilase. Por outro lado, Silva (2014) verificou que a umidade e a atividade de água da FES para a produção de lipases por *Rhizopus miehei* decaiu com o crescimento celular, onde o mesmo explica que os metabólitos secundários justificam essa queda de umidade.

Figura 27 – Perfil das curvas da atividade de  $\alpha$ -amilase (●) produzida pelo *A. niger* nas condições otimizadas (70% BM, 80% umidade e 102,1 horas de fermentação) em intervalos de tempo de 24 horas e variação da umidade do meio (▲) a 30 °C.



Uma justificativa para o resultado foi a falta de controle de umidade para a FES, uma vez que a umidade pode ter sido alterada por fatores externos, fazendo com que a umidade se altere com o tempo de fermentação. A esporulação nessa etapa é algum sinal de que alguma condição de estresse no meio fermentativo aconteceu, fazendo com que os microrganismos chegassem na fase estacionária, estabilizando a umidade do meio.

#### 5.4. Efeito do pH na extração e estabilidade da $\alpha$ -amilase

Com a finalidade de estudar o efeito e a estabilidade ao pH para produção da enzima  $\alpha$ -amilase. Os resultados encontrados foram agrupados a partir do teste de Tukey (Tabela 15). As atividades de  $\alpha$ -amilase para a realização do teste foram medidas após a extração (t=0 horas).

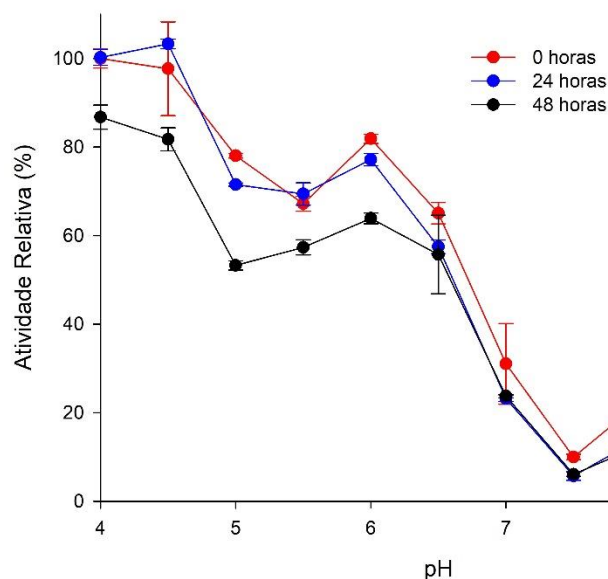
O pH ótimo encontrado para a atividade máxima de  $\alpha$ -amilase foi o de 4,5. Percebeu-se que com a diminuição do valor do pH próximo de 3,0, combinado com a temperatura de hidrólise, ocorreu a degradação e a precipitação do amido solúvel, o substrato da hidrólise enzimática. O agrupamento “a”, pelo teste de Tukey, se mostrou o melhor grupo de pH para a extração enzimática. Contudo, como a aproximação de baixos pHs pode causar a degradação do substrato da hidrólise enzimática, justificando a escolha do pH 4,5 como ótimo para extração da  $\alpha$ -amilase, com atividade de  $\alpha$ -amilase de 1421,2 U/gMS.

A caracterização enzimática quanto à estabilidade ao pH é importante para conhecer particularidades sobre o produto, informações relevantes para a aplicação industrial e que serão necessárias para manter o nível de atividade enzimática por um longo período de tempo (SOUZA *et al.*, 2010). A Figura 28 apresenta a estabilidade da  $\alpha$ -amilase, expressa em atividade relativa, após o armazenamento em 0 horas (após a extração do complexo enzimático), 24 horas e 48 horas a temperatura de 25 °C.

Tabela 15 – Tabela de agrupamentos para o teste estatístico de Tukey.

Agrupamento		
Fator (pH)	Média da atividade $\alpha$ -amilase (U/gMS)	Grupo
<b>4,0</b>	<b>1454,9</b>	<b>a</b>
<b>4,5</b>	<b>1421,2</b>	<b>a</b>
6,0	1191,2	b
5,0	1135,2	b
5,5	977,78	c
6,5	946,42	c
7,0	451,36	d
8,0	328,11	d
7,5	144,98	e
8,5	50,188	e
9,0	31,063	e

Figura 28 – Atividade enzimática relativa em diferentes pHs durante 0, 24 e 48 horas de armazenamento.



Avaliando a atividade enzimática em melhores pH, observa-se que para a FES pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* apresenta máxima atividade em uma faixa de pH entre 4,0 – 4,5 (1454,91 – 1421,20 U/gMS). A atividade relativa em pH 5,0 e pH 7,0 foram de 78,02 % (1135,16 U/gMS) e 31,02 % (337,39 U/gMS) em relação ao pH 4,0. Após o armazenamento por 24 horas e 48 horas as atividades de  $\alpha$ -amilase mantiveram 95,43 % e 89,57%, respectivamente, de atividade relativa. Para o pH igual a 5,0 após 48 horas obteve-se uma redução de 17,99 %, diminuindo a atividade relativa para 53,26 % (774,97 U/gMS) em relação da atividade original. Em pHs na faixa de 7,0 – 9,0 as atividades enzimáticas foram muito baixo, o que caracteriza o tipo de enzima produzida estável em meio ácido, o que faz todo sentido, uma vez que o meio de FES é ácido (pH 5,93 do BM), sugerindo que esse tipo de enzimas pode ser amplamente aplicado em processos industriais em meio ácidos.

Carvalho *et al.* (2008) estudaram em fermentação submersa, com meio de cultivo em pH igual a 7,5, a produção da enzima  $\alpha$ -amilase por *Bacillus sp.* cepa SMIA-2 e encontrou resultados para estabilidade da enzima liofilizada em pH 8,5 (36,1 U/mL). Özdemir *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade da atividade de  $\alpha$ -amilase em FES por *Anoxybacillus flavithermus sp.* utilizando casca de arroz como substrato e obtiveram resultados de pico na atividade enzimática em pH 6,0 incubados a 37 °C.

A variação da estabilidade do pH é dependente das condições do meio de cultivo, do isolamento dos tipos de microrganismos, tornando variável de acordo com cada estudo (ÖZDEMIR *et al.*, 2012).

### 5.5. Otimização das condições de hidrólise enzimática

Com a finalidade de maximizar a atividade enzimática avaliaram-se 2 fatores (A = temperatura e B = tempo em minutos) e realizou-se um planejamento experimental DCCR do tipo  $2^2$ , 4 pontos axiais e com três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. A Tabela 16 apresenta o DCCR com as respostas da atividade de  $\alpha$ -amilase com valor em destaque para a máxima atividade obtida experimentalmente de 2792,11 U/gMS.

Tabela 16 – Resultados do planejamento experimental da atividade da  $\alpha$ -amilase para os fatores codificados.

Tratamento	Temperatura (°C) (A)	Tempo (min) (B)	Atividade Enzimática (U/gMS)
1	54,4 (-1)	8,7 (-1)	1571,963
2	75,6 (+1)	8,7 (-1)	2102,192
3	54,4 (-1)	26,3 (1)	1219,024
4	75,6 (+1)	26,3 (1)	1151,531
5	50 (-1,4142)	17,5 (0)	1026,306
6	80 (1,4142)	17,5 (0)	1036,182
<b>7</b>	<b>65 (0)</b>	<b>5 (-1,4142)</b>	<b>2792,112</b>
/8	65 (0)	30 (1,4142)	1495,752
9	65 (0)	17,5 (0)	1916,56
10	65 (0)	17,5 (0)	1940,545
11	65 (0)	17,5 (0)	1947,599

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software Statística 7.0<sup>®</sup>. A Tabela 17 apresenta os coeficientes de regressão, o erro padrão, teste *t* para cada coeficiente e o valor de *p*, que mostra a significância ( $p < 0,05$ ) dos coeficientes da regressão.

Tabela 17 – Coeficientes de regressão do DCCR da caracterização da  $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido.

Variáveis	Coeficientes de regressão	Erro padrão	Test <i>t</i>	Valor de <i>p</i>
Temperatura (L)	59,588	42,56107	1,40007	0,220384
Temperatura (Q)	-470,939	50,65822	-9,29640	0,000242
Tempo (L)	-392,118	42,56107	-9,21307	0,000253
Tempo (Q)	85,416	50,65822	1,68612	0,152584
Temperatura x Tempo	-149,430	60,19015	-2,48264	0,055661

As variáveis temperatura (termo quadrático – Q) e o tempo (termo linear – L) foram significativos ao nível de 5 % de significância para a hidrólise enzimática. A partir dos coeficientes determinados pelo DCCR foi possível determinar o modelo de superfície de resposta. A Equação 24 apresenta o modelo proposto para o planejamento experimental realizado.

$$\hat{y} = 1934,90 + 59,59A - 392,12B - 470,94A^2 + 85,42B^2 - 149,43AB \quad (24)$$

A Tabela 18 apresenta o cálculo da ANOVA para a avaliação do ajuste do modelo gerado. O modelo apresentado pela Equação 24 apresentou valor calculado de F do teste de distribuição de Fisher 7,95 vezes maior do que o F crítico (tabelado), mostrando a significância do modelo. O coeficiente de regressão ( $R^2$ ) apresentou valor de 0,976 e coeficiente de regressão ajustado ( $R^2_{adj}$ ) igual a 0,951, mostrando um ótimo ajuste aos dados experimentais.

Tabela 18 – ANOVA resultante do planejamento experimental da hidrólise enzimática para otimização da atividade de  $\alpha$ -amilase.

F.V	GL	SQ	QM	Fcal	Ftab
Regressão	5	2910112	582022,4	40,16*	5,050
Resíduo	5	72457	14491,4		
Falta de Ajuste	3	71928	23976	90,56*	19,16
Erro Puro	2	529	265		
Total	10	2982569			

Observando a Figura 29 e apresenta os valores preditos versus os observados. Nota-se que as respostas experimentais obtidas para a hidrólise da atividade enzimática apresentam valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na

Figura 30, verifica-se que a distribuição dos resíduos se comportou aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

Figura 29 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a caracterização da  $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido.

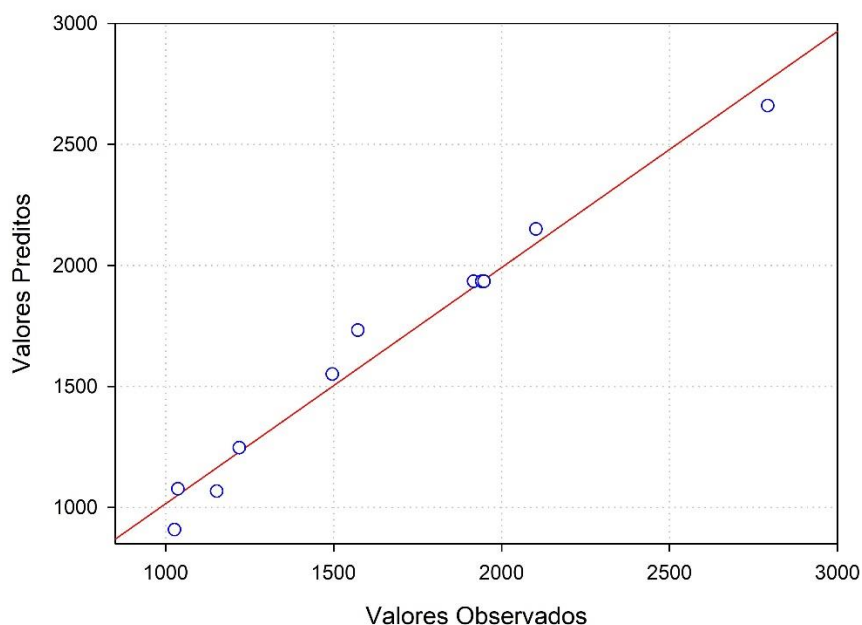
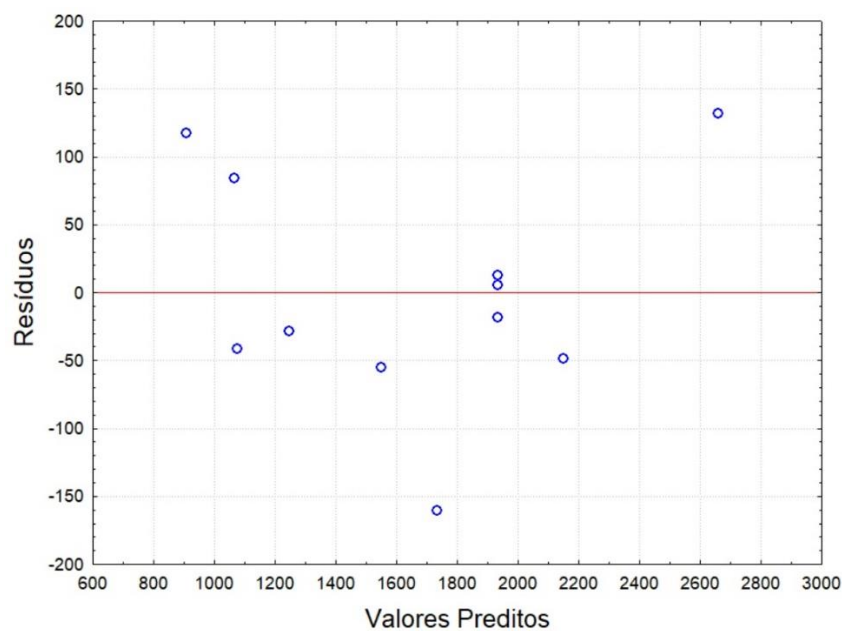


Figura 30 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a caracterização da  $\alpha$ -amilase para hidrólise do amido.



Considerando a validade do modelo proposto pela Equação 24, construiu-se a superfície de resposta e a curva de contorno para a cinética da hidrólise de  $\alpha$ -

amilase em função da temperatura e tempo de hidrólise, conforme as Figuras 31 e 32, respectivamente.

Figura 31 – Superfície de resposta para o planejamento experimental da cinética de hidrólise de  $\alpha$ -amilase.

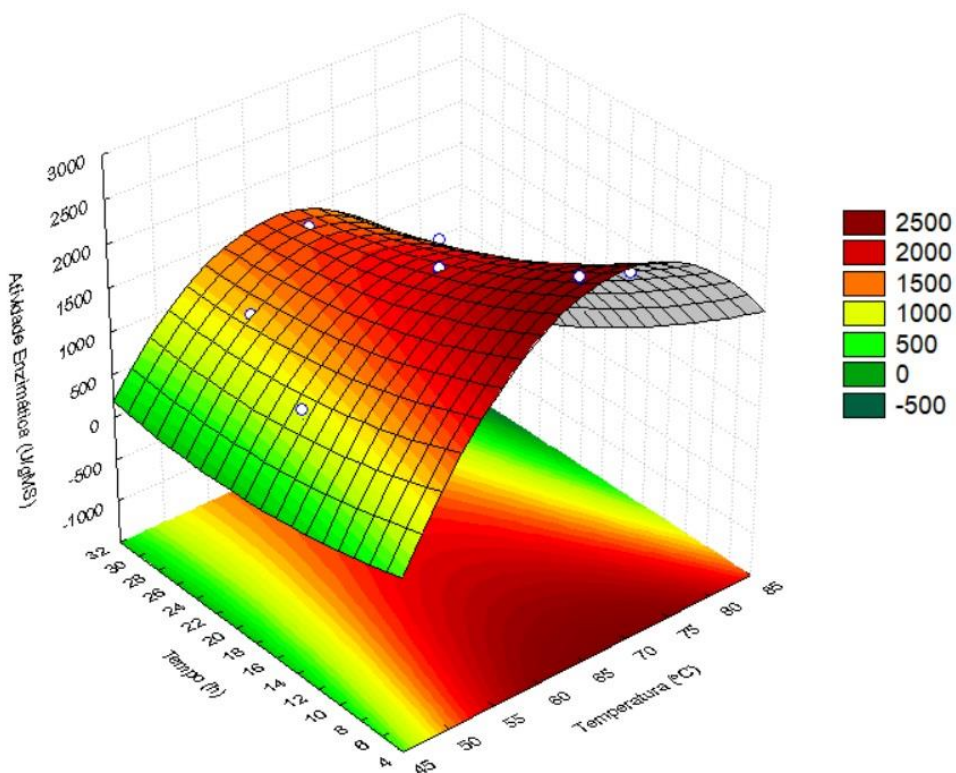
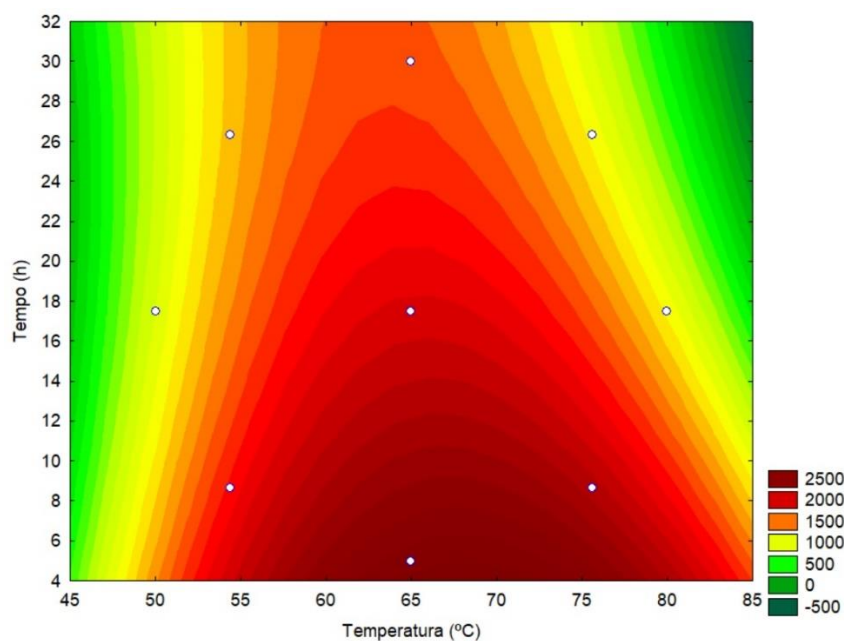


Figura 32 – Curva de contorno para o planejamento experimental da cinética de hidrólise de  $\alpha$ -amilase.



É possível observar nas Figuras 34 e 35 a região ótima de temperatura e tempo para a hidrólise de  $\alpha$ -amilase em amido solúvel, localizando entre a temperatura 65

e 70°C e tempo de 5 min de hidrólise. O resultado se mostra muito coerente com a temperatura de atuação da enzima  $\alpha$ -amilase, uma vez que a faixa de atuação dessa enzima está entre 60-75 °C (PALMER, 2017). A acessibilidade do substrato à ação da enzima  $\alpha$ -amilase favorece a diminuição do tempo de conversão do amido solúvel, tornando-o suscetível à hidrólise. Outra justificativa para o baixo tempo de hidrólise favorecer a alta atividade enzimática pode ser justificada pela afirmação de que a atividade enzimática hidrolítica é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto, ou seja, quanto menor o tempo de hidrólise maior será a atividade enzimática para uma mesma concentração de glicose convertida (ADOLPH; LORENZ, 1980).

A atividade máxima de 2699,22 U/gMS foi obtida nas condições de temperatura codificada (A) igual a 0,2828 e tempo de hidrólise codificado (B) igual a -1,4142 para os valores do modelo. Decodificando esses resultados, obtêm-se os valores de 68,0 °C de temperatura e 5 min de hidrólise, conforme a Tabela 19.

Tabela 19 – Valores otimizados codificados e decodificados para a hidrólise de  $\alpha$ -amilase.

Valor codificado		Valor decodificado	
A	0,2828	Temperatura (°C)	68,0
B	-1,4142	Tempo (min)	5

#### 5.6. Estudo da cinética $\alpha$ -amilase

No estudo da cinética da enzima  $\alpha$ -amilase, observa-se o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada por esta enzima.

A Tabela 20 apresenta os resultados do estudo da cinética da enzima  $\alpha$ -amilase pela realização da dosagem enzimática utilizando soluções de amido solúvel em diferentes concentrações (5; 7,5; 10; 20; 30; 40 e 50 g/L). A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foram determinados de acordo com Lehninger (1993), baseando-se nos dados apresentados na Tabela 20 e mostrados na Figura 36.

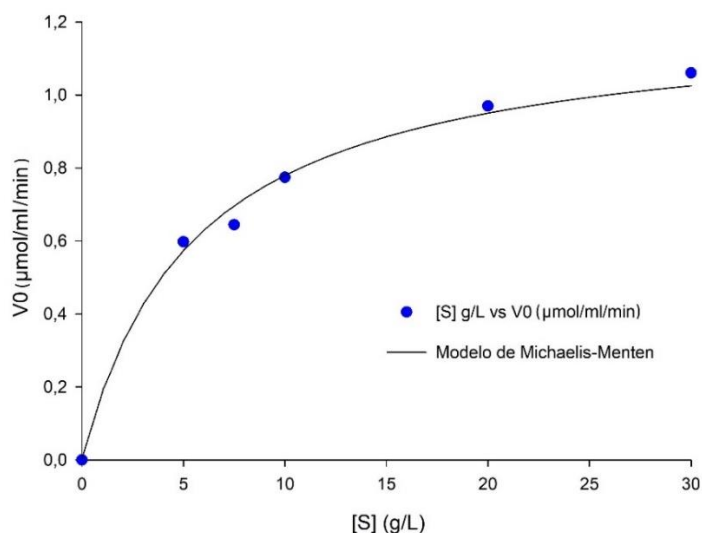
O gráfico da Figura 33 mostra o efeito da concentração de amido (g/L) sobre a velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -amilase ( $\mu$ mol/mL/min). Observa-se que a curva se assemelha à curva de concentração de substrato em função da velocidade da reação catalisada pela enzima apresentada por Borzani *et al* (2001). Para uma

concentração de substrato baixo, a velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) é proporcional à concentração de substrato. Ao aumentar a concentração de substrato, a velocidade inicial deixa de ser proporcional e começa a se tornar constante para concentrações de substrato superiores a 20 g/L. A partir dessa concentração a enzima passa a ser considerada saturada com seu substrato, conforme explicam Chaplin e Bucke (1992) e Borzani *et al* (2001).

Tabela 20 – Velocidade da  $\alpha$ -amilase em reação com diferentes concentrações de substrato

Ensaio	Amido Solúvel (g/L)	Velocidade ( $\mu\text{mol/mL/min}$ )
1	0	0
2	5	0,5976
3	7,5	0,6445
4	10	0,7740
5	20	0,9695
6	30	1,0602
7	40	0,8875
8	50	0,8277

Figura 33 – Efeito da concentração de amido sobre a velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -amilase.



Segundo Borzani *et al* (2001) para o modelo de Michaelis-Menten (1913) serem válidas são de que o substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato (ES) e que o complexo formado se decomponha, ou tenha reação com outra substância,

regenerando a enzima e formando os produtos da reação. Essas duas considerações são expressas pela Equação 1, no qual é possível observar esse mecanismo.



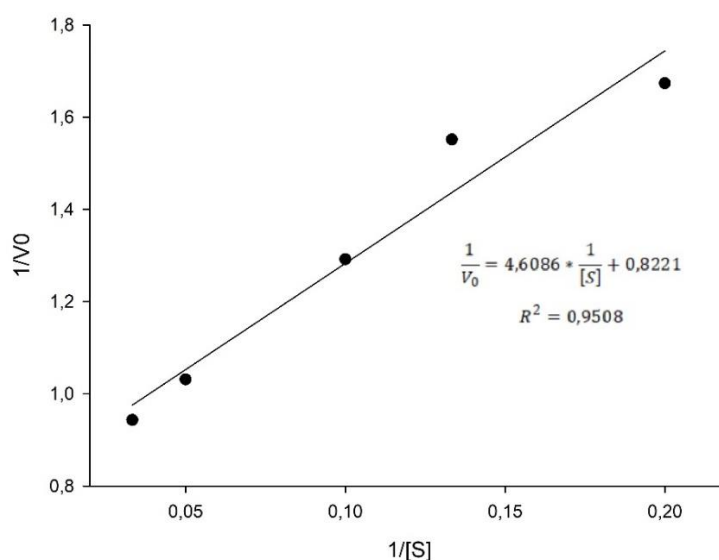
A constante  $K_m$  é a concentração do substrato à qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima (BORZANI *et al*, 2001). O  $K_m$  para uma reação e um substrato tem a dimensional de moles por litro, sendo independente da concentração enzimática. Quanto menor for o valor de  $K_m$ , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

Aplicando a equação de Lineweaver-Burk (Equação 25) para determinação de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  a partir da linearização do modelo de Michaelis-Menten (Equação 2).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (25)$$

A Figura 34 apresenta  $1/V_0$  colocado em um gráfico em função de  $1/[S]$ . Observou-se o comportamento linear entre as duas variáveis, onde os coeficientes lineares e angulares dessa reta são iguais a  $1/V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente. A partir dos valores experimentais de  $[S]$  e os correspondentes valores de  $V_0$  foi possível determinar, por regressão linear, os valores de  $1/V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m/V_{m\acute{a}x}$  e, conseqüentemente,  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ .

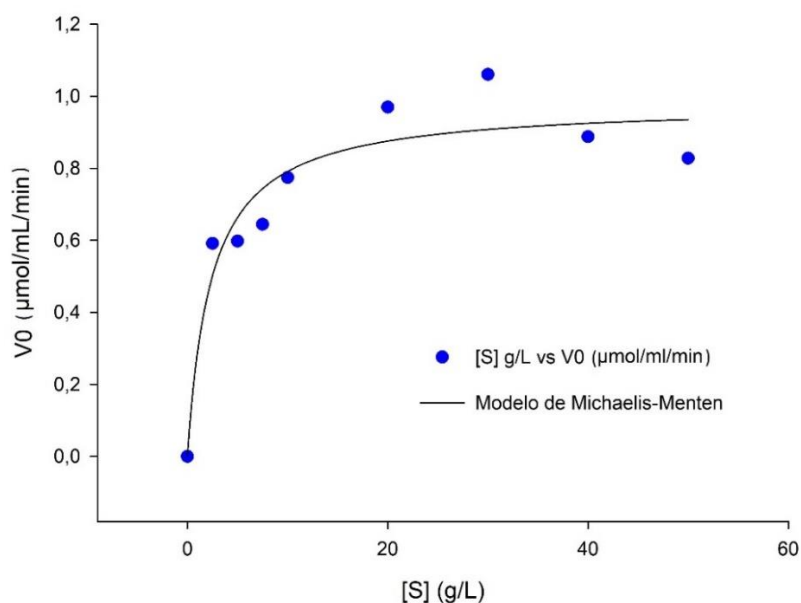
Figura 34 – Determinação de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  pelo método de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais.



Portanto, a constante de Michaelis-Menten da  $\alpha$ -amilase, bem como a velocidade máxima dessa enzima foram determinadas pela da Equação 25, apresentando os seguintes valores:  $K_m = 5,60$  g/L e  $V_{m\acute{a}x} = 1,216$   $\mu\text{mol/mL/min}$ . Comparativamente, os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  encontrados em diversos trabalhos mostram a diversidade de comportamento das enzimas amilásicas. Aguilar *et al.* (2000) avaliaram a cinética enzimática da  $\alpha$ -amilase produzidas a partir de *Lactobacillus manihotivorans* por FS em amido solúvel e obtiveram valores de 3,44 g/L e 2,78  $\mu\text{mol/mL/min}$  para os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente. Oliveira (2017) encontrou valores de  $K_m$  igual a 1,37 g/mL e  $V_{m\acute{a}x}$  igual a 4,07  $\mu\text{mol/mL/min}$  para enzima  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae*, utilizando amido solúvel com substrato para a hidrólise enzimática. Borzani *et al.* (2001) apresentaram o valor para  $K_m$  de 4,0 g/L para enzima amilase em substrato de amido como valor de referência de estudo para esse tipo de enzima.

A Figura 35 apresenta o efeito de inibição na hidrólise enzimática da  $\alpha$ -amilase. A inibição da hidrólise foi observada em concentrações de amido solúvel a partir de 30 g/L. Borzani *et al.* (2001) descreve que a  $\alpha$ -amilase sofre o efeito da inibição pelas dextrinas e pela maltose quando se encontram presentes em concentrações relativamente altas.

Figura 35 – Estudo do perfil da velocidade de reação da atividade enzimática em relação a concentração de substrato de amido solúvel.



A influência de um inibidor foi notada a partir da concentração de substrato de 30 g/L. Porém, não foi possível determinar qual o tipo de inibição presente. Outros estudos sobre inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase relatam que os inibidores podem

ser competitivos ou possuir inibição mista (MOURA, 2008; ZORZIN, 2014; OLIVEIRA, 2017).

## 6. CONCLUSÕES

O planejamento experimental para realização da otimização da fermentação em estado sólido se mostrou uma ferramenta poderosa para a obtenção dos resultados. A atividade  $\alpha$ -amilase para os dados otimizados, para o modelo polinomial quadrático ( $R^2 = 0,82$ ) obteve-se um valor de 618,20 U/gMS nas condições, com restrição na umidade de 80,0 %, 102,1 horas de fermentação e com 85,9 % de proporção de bagaço de malte em relação ao suporte de bagaço de cana-de-açúcar. Após o estudo da hidrólise do amido, baseados na temperatura e tempo de hidrólise, obteve-se um valor 4,36 vezes maior do que os resultados sem o respectivo estudo, com valor de 2699,22 U/gMS em pH 4,5 e nas condições otimizadas. No estudo de caracterização da cinética da  $\alpha$ -amilase, foram obtidos os valores de  $K_m = 5,60$  g/L e  $V_{m\acute{a}x} = 1,216$   $\mu$ mol/mL/min e observou-se uma inibição para altas concentrações de amido solúvel a partir da concentração de 30 g/L de substrato.

Com os resultados obtidos, avalia-se que o bagaço de malte de cevada se torna um grande e promissor substrato para a para a fermentação no estado sólido para produção de enzimas de baixo custo, devido sua composição rica em nutrientes favoráveis para esse processo.

## REFERÊNCIAS

- ADOLPH, L.; LORENZ, R. Diagnóstico enzimático das doenças do coração, fígado e pâncreas. Basel: Karger, 1980, 29-50p.
- AFONSO, L. C. **Produção de Celulases por Cultivo em Estado Sólido e Aplicação na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 119. 2012.
- AGUILAR, G.; MARLON-GUYOT, J.; TREJO-AGUILAR, B.; GUYOT, J.P. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 406-413. 2000.
- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology*, v. 24, p. 281-287, 2006.
- AMORIM, G. A. **Fermentação de farolo de cacao por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, p. 60, 2011.
- AMORIM, G. A.; OLIVEIRA, A. C.; GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 34-41. 2017.
- ARAUJO, L. DE F. **Enriquecimento proteico do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fermentação semi-sólida**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, p. 195. 2004.
- BARGA, M. C., **Modelo de inferência para a determinação da umidade do leite de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 145. 2007.
- BATISTA, M. C. T. **Produção de Dextranases a Partir de Bagaço de Malte: Caracterização e Avaliação do Potencial de Aplicação em Indústria Sucroalcooleira**. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 169. 2014.
- BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 111, p. 54-62, 2016.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA Jr., N. (2008). **Enzimas na produção de etanol**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p.241-271.
- BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo. Editora: Blucher. 2001. 254p.

BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. **On the experimental attainment of optimum conditions.** Oxford: J. Royal Stat. Soc, v.13, 1951, 1-45p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 360, de 23 de dezembro de 2003.** ANVISA. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003.

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

CACHUMBA, J. J. M. **Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação no estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, p. 124, 2017.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.MG. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2000. 752 p.

CANEDO, M. S. **ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE POR *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 E ADIÇÃO EM DIETAS DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. p. 81, 2015.

CARVALHEIRO F.; ESTEVES, M. P.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**, v 91, p.93-100, 2004.

CARVALHO, R. V.; CÔRREA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; MANSUR, L. R. C. O.; MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.102-107, 2008.

CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário**, 2016. Disponível:[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130\\_CervBrasilAnuario2016\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016_WEB.pdf). Acesso em: 19 março 2018

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology.** New York: Cambridge University Press, 1992. 264 p.

CHEN, J.; CHEN, X.; XU, X.; NING, Y.; JIN, Z.; TIAN, Y. Biochemical characterization of an intracellular<sup>α</sup>G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its use in production of neo-fructooligosaccharides (neo-FOSs). **Bioresource Technology**, v. 102, p.1715-1721, 2011.

CHI Z.; CHI Z.; LIU G.; WANG F.; JU L.; ZHANG T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnol Advances**, v. 27, p. 423-431, 2009.

COELHO, M. A. Z.; RIBEIRO, B. D.; SALGADO, A. M. **Tecnologia Enzimática.** Rio de Janeiro: editora EPUB, 2008. 288 p.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica.** São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447p.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v 7, n 3, p. 20-22, 2012.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001.

DESCHAMPS, F.; GIULIANO, C.; ASTHER, M.; HUET, M. C.; ROUSSOST, S. Cellulase Production by *Trichoderma harzianum* in Static and Mixed Solid-state Fermentation Reactors Under Nanoseptic Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v 27, p. 1385-1388, 1985.

DRAGONE, S. I. M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, p; 173, 2007.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes** / editor técnico: Fábio Cesar da Silva – 2ª ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2009. 627 p.

ENZYME. EXPASY. 2018. Disponível em: <<https://enzyme.expasy.org/>>. Acesso em: 01 de maio de 2018.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p; 120, 2007.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v 32, n 3, p. 623-638, 2009.

FORNAZIER, E. L. **Determinação de Proteínas pelo método de Kjeldhal**. Laboratório de Nutrição Experimental, 2015.

FIORI, M. G. S.; SCHOENHALS, M.; FOLLADOR F. A. C. Análise da evolução tempo – eficiência de duas composições de resíduos agroindustriais no processo de compostagem aeróbia. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 5, n. 3, p. 178-191, 2008.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 de maio. 2018.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial da  $\alpha$ -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v 13, ed 2-3, p. 85-101, 2003.

GONÇALVES, L. G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p. 66, 2016.

GORONAH. **Qual o malte para minha cerveja? Uma abordagem pela avaliação sensorial.** Disponível em: <https://goronah.blog.br/2017/artesanato/avaliacao-sensorial-malte-cevada>. Acesso: 15 março 2018.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p; 77, 2007.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, ed. 11, p.1599-1616, 2003.

GUTARRA, M.L.E. **Produção de lipase pelo fungo *Penicillium simplicissimum*: Caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido.** Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, p. 156, 2007.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M.G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HALDAR, D.; GAYEN, K.; SEN, D. Enumeration of monosugars' inhibition characteristics on the kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 130-136, 2018.

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

HASAN, S.D.M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtida por fermentação em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 176, 2002.

HECTOR, D.; FUKAI, S.; GOYNE, P. **Adapting barley growth model to predict grain protein concentration for different water and nitrogen availabilities.** In: Anais da 8ª Conferência Australiana de Agronomia, Toowoomba, 1996.

HMIDET, N.; BAYOUDH, A.; BERRIN, J.G.; KANOUN, S.; JUGE, N.; NASRI, M. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 499-510, 2009.

HMIDET, N.; EL-HADJ ALI, N.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S.; NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 71–79, 2009.

INSTITUTO ALDOFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3º ed. São Paulo, 1985.

JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JÚNIOR, S. D. O. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p. 103, 2014.

KIRAN, K.K.; CHANDRA, T.S. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1023-1031, 2008.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species.** 1. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1745-1749, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica.** v. 1. 2ª ed. 6. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1993, 262 p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6.ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1220p.

LESSA, O. A.; REIS, N. S.; LEITE, S. G. F.; GUTARRA, M. L. E.; SOUZA, A. O.; GUALBERTO, S. A.; DE OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 107-113, 2017.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**. v.7, p. 258-265, 1985.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT, E. K. Brewer's spent grain: a review with an emphasis on food and health. **Journal – Institute of Brewing**, v. 122, p. 553-568, 2016.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de Xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 133, 2006.

MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Production and partial characterization of pectinases from palm by *Aspergillus niger* URM4645. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2469-2475, 2011.

MACIEL, G. M. VANDENBERGHE, L. P. S.; HAMINIUK, C. W. I.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, B. E. D.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A. SOCCOL, C. R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 183-189, 2008.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. **A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>>. Acesso em: 19 março 2018.

MELNIKOV, G. M. D. **Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte.** Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, p. 140, 2007.

MELO, Â. A.; MANFIO, M.; ROSA, C. S. Composição e propriedades tecnológicas da farinha do resíduo da fermentação da cerveja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v 18, n 01, p. 91-95, 2016.

MENESES, N. G. T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separ Purif Technol**, v 108, p. 152-158, 2013.

MICHAELIS L., MENTEN M. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemistry. Z.** 49; p. 333-369, 1913.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, 1959, 426p.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Berlin: Springer, 2006, 447p.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista de Processos Químicos**. v. 3, p. 09-23, 2009.

MORAES L. M. P.; FILHO S. A.; ULHOA C. J. Purification and some properties of an  $\alpha$ -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 561-564, 1999.

MORAN, L. A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. **Bioquímica**. 5.ed. São Paulo: Pearson, 2014. 832p.

MORENO, A.; MORENO, M. El abonado nitrogenado de la cebada en Castilla La Mancha. **Revista Agropecuaria**, v 71, p. 453-455, 2002.

MOURA, V. L. **Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição *in vitro* da atividade da alfa-amilase salivar humana (HSA)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 55, 2008.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 94, p. 1264-1275, 2014.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v 81, p. 268-274, 2006.

MUTHUSAMY, N. Chemical composition of brewers spent grain – a review. International Journal of Science, **Environment and Technology**, v. 3, p. 2109-2112, 2014.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, v. 60, n. 4, p. 311-319, 1982.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. **Enzyme and Microbial Technology**. v.17, p. 770-778, 1995.

OLIVEIRA, G. A. V. **Equilíbrio Químico e cinética enzimática da interação de  $\alpha$ -amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, p. 68, 2017.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V. FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

ÖZDEMİR, S.; MATPAN, F.; OKUMUS, V.; DÜNDAR, A.; ULUTAS, M. S.; KUMRU, M. Isolation of a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. and production of thermostable  $\alpha$ -amylase under solid-state fermentation (SSF). **Annals of Microbiology**, v. 62, p.1367-1375, 2012.

ÖZTÜRK, S.; ÖZBOY, Ö.; CAVIDOĞLU, i.; KÖKSEL, H. Effect of Brewer's Spent Grain on the Quality and Dietary Fibre Content of Cookies. **Journal of the Institute of Brewing**, v 108, n 1, p. 23-27, 2002.

PALMA, M. B. **Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 188, 2003.

PALMER, J. J. **How to Brew. Erverything You Need to Know to Brew Great Beer Every Time**. 4<sup>o</sup> ed. Colorado: Brewers publication®, 2017. 608p.

PANDEY, A. Aspects of Fermenter Design for Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 335-361, 1991.

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

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Review: Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2000.

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

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**, New Delhi: Asiatech Publishers, 2005, 197p.

PANZARINI, N. H.; RABBERS, A.; TRINDADE, J, L, F.; MATOS, E. A. S. A.; CANTERI, M. H. G.; BITTENCOURT, J. V. M. Elaboração de bolo de mel enriquecido com fibras do bagaço da indústria cervejeira. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v 08, n 01, p. 1154-1164, 2014.

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

PITOL, L. O.; FINKLER, A. T. J.; DIAS, G. S.; MACHADO, A. S.; ZANIN, G. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Optimization studies to develop a low-cost medium for production of the lipases of *Rhizopus microsporus* by solid-state fermentation and scale-up of the process to a pilot packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 37-47, 2017.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v 1, n 3, p. 1-15, 1998.

RAIMUNDO, G. M. **Desenvolvimento do processo contínuo de produção de xaropes concentrados de açúcar invertido**. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, p. 78, 2003.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. 1. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1965. 686p.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de Lipase de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e acoólise. **Química Nova**, v. 37, p. 454-460, 2014.

REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. 1.ed. São Paulo: ADEN, 1997. 149p.  
ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 136, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005. 325p.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RUSS, W.; MORTEL, H.; MEYER-PITTROFF, R. Application of spent grains to increase porosity in bricks. **Constr Build Mater**, v 19, p. 117-126, 2005.

RUTSATZ, M. D. **Cultivo em Estado Sólido: Modelagem e Quantificação de Biomassa em Biorreator Cilíndrico Horizontal Agitado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 105, 2006.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, p. 90-97, 2014.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTANA, R. S. M. **Produção de Enzimas Amilolíticas Através da Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, p. 73, 2012.

SANTOS, I. J. **Cinética de fermentações e estudo de metabolismo e enzimas intracelulares envolvidas na fermentação alcoólica cervejeira conduzidas com leveduras de alta e baixa fermentação em diferentes composições do mosto**. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 139, 2005.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p. 148, 2007.

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J. J.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; DEL-NOZAL, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, v. 80, p. 17-21, 2003

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**, v. 2. São Paulo. Edgard Blücher LTDA, 2001.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662. 2001.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2005.

SILVA, J. N. **Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido Utilizando o Fungo *Rhizomucor miehei***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 96. 2014.

SILVA, R. R. **Métodos de conservação do restolho de abacaxi “pérola” para alimentação de ruminantes**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Maranhão. Chapadinha, p. 58. 2018.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

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

SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. **Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid-state fermentation**. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.

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

SONDERGAARD, H. A.; GRUNERT, K. G.; SCHOLDERER, J.; **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 466-479, 2005.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of Microbial  $\alpha$ -amylase in industry – A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. P. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n. 9, p. 987-992, 2010.

SPIER, M. R. **PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS FÚNGICAS  $\alpha$ -AMILASE e AMILOGLUCOSIDASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba p. 157 2005.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrial Products. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 1-19, 2006.

STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Brewer's spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to health claims. **European Food Research and Technology**, v. 241, p. 303-315, 2015.

SWINNEN, J. F. M. **The Economics of Beer**. Oxford University Press: Oxford and New York, 2011, p. 113-116, 2011.

TANYILDIZI, M. S.; SELEN, V. ÖZER, D. Optimization of  $\alpha$ -amylase production in solid substrate fermentation. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 87, p. 493-498 p, 2009.

TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S. **Influência da variação da concentração do inóculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção de enzima poligalacturonase**. Anais: SINAFRM, 14, Florianópolis 2003.

THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds), **Biociologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP, v. 2, p. 179-190, 2001.

TOMÉ, R. Atlas Micologia, ***Aspergillus niger***. Disponível em: <http://atlasmicologia.blogspot.com.br/2011/05/aspergillus-niger.html>. 2011. Acesso em: 22 abril 2018.

VAN DER MAAREL, M. J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G.; TENGÉRDY, R. P. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 65-69, 2000.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. – Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, 2013.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biociologia Industrial. Volume 4. Biociologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, p. 91-144.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring**, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) *Advances in solid-state fermentation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997.

Von MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n.4, p. 416-428, 2002.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. **Waste Biomass Valorization**, v. 3, p. 213-232, 2012.

XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5427-5435, 2008.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biociologia de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 240p.

WILHELMSON, A.; LEHTINEN, P.; WEYMARN, N. V. Future applications for brewer's spent grain. **New Food**, v 3, p. 58-61, 2009.

WISNIEWSKI, A. C.; ALMEIDA, M. Â. L.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v 08, n 03, p. 285-293, 2010.

ZORZIN, F. M. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília. Brasília, p. 99. 2014.