

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO

FÁTIMA RODRIGUES SANTANA

**RESÍDUO ÚMIDO CERVEJEIRO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE
EXTRATO ENZIMÁTICO AMILÁSICO POR *Aspergillus niger* NCQS 40371**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS
PPGQB

TOLEDO

2021

FÁTIMA RODRIGUES SANTANA

**RESÍDUO ÚMIDO CERVEJEIRO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE
EXTRATO ENZIMÁTICO AMILÁSICO POR *Aspergillus niger* NCQS 40371**

**BREWERY MOIST RESIDUE AS A SUBSTRATE FOR OBTAINING AMYLASTIC ENZYMATIC
EXTRACT BY *ASPERGILLUS NIGER* NCQS 40371**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Toledo.

Orientador(a): Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva

TOLEDO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



FATIMA RODRIGUES SANTANA

RESÍDUO ÚMIDO CERVEJEIRO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO AMILÁSICO POR *ASPERGILLUS NIGER* NCQS 40371

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 24 de Setembro de 2021

Prof.a Gracinda Marina Castelo Da Silva, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Cleverson Busso, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Patricia Aparecida Santiago, Doutorado - Latam Airlines

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/09/2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que até aqui me sustentou, a Ti toda honra e toda Glória.

Aos meus pais Valdir e Geralda, por todo apoio, paciência e incentivo.

Aos meus irmãos Aloisio, Valdir Filho e Silvana, por me apoiar e por acreditarem em mim.

Aos meus amigos, que me consolaram quando chorei e me incentivaram a não desistir quando eu já parecia não ter forças para continuar.

A Prati Donaduzzi, pelo apoio e pelas liberações para as aulas em horário de trabalho.

Aos técnicos da UTFPR – Toledo.

A minha orientadora Gracinda, a melhor que eu poderia ter tido. Gratidão por toda paciência, apoio, incentivo e amizade nesses anos. Te escolheria inúmeras outras vezes se fosse preciso.

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos de origem agroindustrial são encontrados em grande abundância sendo de baixo valor agregado e de fácil obtenção. Técnicas como a fermentação no estado sólido (FES), possibilitam a obtenção de enzimas como a amilase através de subprodutos agroindustriais, como o resíduo úmido cervejeiro (RUC). As enzimas microbianas são de grande importância biotecnológica e aplicáveis em diversos setores da indústria. Partindo desse princípio, o objetivo do presente estudo foi obter o extrato bruto amilásico através da FES utilizando o RUC como substrato por meio do fungo *A. niger* NCQS 40371. Procedeu-se a caracterização físico-química do RUC, seguido da determinação da melhor granulometria para a fermentação. Para a otimização da FES foi utilizado o planejamento experimental fatorial completo 3³, avaliando-se o pH (4,0 – 6,0), temperatura (25, 28 e 32°C) e umidade (60, 70 e 80%). A partir do melhor resultado obtido, realizou-se a cinética de produção enzimática e sua caracterização parcial, através da determinação do pH ótimo, termoestabilidade, além do efeito do tempo e agitação na extração enzimática. Os resultados da caracterização do RUC mostraram que o mesmo é rico em carboidratos e proteínas. O RUC em 16 mesh Tyler apresentou a melhor produção enzimática (48,56 U/g), sendo utilizado para os demais ensaios. O planejamento experimental mostrou que as variáveis estudadas são significativas para o processo, sendo a melhor atividade enzimática (215,26 U/g), obtida em pH 5, 32°C e 70% de umidade. A cinética de obtenção enzimática demonstra que a máxima produção (226,91 U/g) ocorre em 96 h de fermentação. Quanto a caracterização parcial enzimática, o melhor pH obtido encontra-se em 4,5 e a termoestabilidade é alcançada em 50°C, mantendo atividade relativa em 80% após 48 h. O tempo e a agitação de extração, apresentaram-se significativas, obtendo a melhor extração enzimática em 60 minutos a 100 rpm. Com os resultados obtidos, conclui-se que o RUC apresenta-se como substrato promissor para a obtenção da enzima amilase.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação no estado sólido; cinética; granulometria

ABSTRACT

The lignocellulosic residues of agro-industrial origin are found in great abundance, with low added value and easy to obtain. As a result of its properties, its use proves to be very promising for obtaining enzymes such as amylase, through techniques such as solid state fermentation (SSF). Microbial enzymes are of great biotechnological importance and applicable in various sectors of industry. Based on this principle, the aim of the present study was to obtain the crude amylasic extract through SSF using the WBG as substrate through the fungus *A. niger* NCQS 40371. Initially, the physical-chemical characterization of the WBG was carried out, followed by the determination of the best particle size for fermentation (16 mesh Tyler and without particle size separation). For the optimization of the SSF a complete factorial design 3³ was used, evaluating the pH, temperature (°C) and humidity (%). From the best superior result, the enzymatic production kinetics and its partial characterization were obtained, through the determination of the optimum pH, thermostability, in addition to the effect of time and added in the enzymatic extraction. The results of the characterization of WBG, which is the same rich in carbohydrates and proteins. The SSF in 16 mesh Tyler showed the best enzymatic production (48.56 U / g), being used for the other assays. The experimental design showed that the variables studied are for the process, with the best enzymatic activity (215.26 U / g) being obtained at pH 5, 32 °C and 70% humidity. The enzymatic obtainment kinetics demonstrate that a maximum production occurs in 96 h of fermentation. As for partial enzymatic characterization, the best pH is found at 4.5 and thermostability is reached at 50 °C, maintaining a relative activity at 80% after 48 h. The extraction time and beverage dissipate independently, obtaining the best enzymatic extraction in 60 minutes at 100 rpm. With the results obtained, it can be concluded that the WBG presents itself as a promising substrate to obtain the amylase enzyme.

KEY-WORDS: Solid state fermentation; kinetics; granulometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma referente ao processo de fabricação da cerveja.....	9
Figura 2 - Estrutura química do amido.....	16
Figura 3 - (a) Estrutura química da amilose; (b) Estrutura química da amilopectina.....	17
Figura 4 - Classificação e identificação das enzimas amilolíticas.....	18
Figura 5 - Representação geral da hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas.....	19
Figura 6 - RUC com granulometria de 20 (A) e 16 mesh (B).....	27
Figura 7- Fermentação no estado sólido do resíduo úmido cervejeiro.....	28
Figura 8 - Influência Granulométrica sobre a Cinética de Fermentação no Estado Sólido.....	36
Figura 9- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados na atividade amilolítica do fungo <i>A. niger</i>	40
Figura 10 - Valores preditos vs valores observados da atividade amilolítica para o planejamento fatorial 3^3	42
Figura 11 – Gráfico dos resíduos vs. Valores preditos da atividade amilolítica para o planejamento fatorial 3^3	43
Figura 12 - Superfície de resposta para a atividade amilolítica em função: (A) pH e umidade; (B) pH e temperatura; (C) Umidade e temperatura.....	44
Figura 13 - Curvas de contorno para a obtenção da enzima amilase em função de: (A) pH e umidade; (B) pH e temperatura; (C) umidade e temperatura.....	45
Figura 14 - Cinética da FES para obtenção de amilase por <i>A. niger</i> em condições ótimas de fermentação: 70 % de umidade, pH 5,0 e temperatura de 32°C durante 110 horas.....	48
Figura 15 - Efeito do pH sobre a extração da enzima amilase.....	49
Figura 16 - Estabilidade térmica da enzima amilase nas temperaturas de incubação de 30°C, 50°C, 70°C e 90°C.....	51
Figura 17 - Gráfico de Pareto para a determinação da influência do tempo e agitação na extração enzimática.....	55

Figura 18 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para determinar a influência da interação tempo vs agitação na extração..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de substratos sólidos e suas aplicações.....	7
Tabela 2: Classificação e principais características do fungo <i>Aspergillus niger</i>	13
Tabela 3- Níveis das variáveis utilizadas no planejamento experimental fatorial completo 3^3 para obtenção do extrato enzimático da enzima amilase por fermentação no estado sólido do resíduo úmido cervejeiro utilizando-se o fungo <i>A. niger</i>	28
Tabela 4- Matriz do planejamento experimental fatorial 3^3 para a fermentação no estado sólido com os valores reais.....	29
Tabela 5 - Planejamento experimental fatorial 2^3 para determinação do melhor tempo e agitação de extração enzimática.....	32
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental fatorial 3^3 para a determinação do tempo e velocidade de agitação.....	33
Tabela 7 - Composição físico-química do resíduo úmido cervejeiro.....	34
Tabela 8 - Valores médios da atividade amilolítica obtidos segundo o planejamento experimental fatorial 3^3 completo.....	37
Tabela 9 - Coeficiente de regressão e significância do modelo de regressão para a resposta da atividade amilolítica.....	39
Tabela 10 – ANOVA do planejamento experimental fatorial 3^3 para o modelo de segunda ordem da atividade amilolítica.....	41
Tabela 11 - Análise de variância obtida para o planejamento completo 3^3 para a atividade amilolítica.....	42
Tabela 12- Atividade relativa da enzima amilase durante a determinação da estabilidade térmica (em %)......	51
Tabela 13 - Valores médios da determinação da influência do tempo e agitação na extração enzimática.....	52
Tabela 14 - ANOVA do planejamento experimental fatorial 2^3 para o modelo de primeira ordem da determinação da influência do tempo e agitação da extração enzimática.....	53

Tabela 15 - Análise de variância obtida para o planejamento completo 2^3 para a determinação da influência do tempo e agitação sobre a atividade amilolítica..... 54

Tabela 16 - Coeficiente de regressão e significância do modelo de regressão para a determinação do melhor tempo e agitação na resposta da atividade amilolítica..... 54

LISTA DE ABREVIações

FES	Fermentação no Estado Sólido
<i>A niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
RUC	Resíduo Úmido Cervejeiro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
DNS	Ácido 3,5 - Dinitrosalicílico
Min	Minutos
Rpm	Rotações por minuto
h	horas

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivos Gerais	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Fermentação No Estado Sólido	4
3.2	Matérias Primas Empregadas na FES	6
3.2.1	Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)	7
3.3	Microrganismo empregados na FES	11
3.3.1	<i>Aspergillus niger</i>	12
3.4	Enzimas Microbianas	14
3.4.1	Enzimas Amilolíticas	16
3.5	Planejamento Experimental Fatorial	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Microrganismo	21
4.2	Contagem de Esporos	21
4.3	Preparo do Substrato	22
4.4	Caracterização do Bagaço de Malte de Cevada	22
4.4.1	pH.....	22
4.4.2	Umidade.....	22
4.4.3	Teor de Cinzas	23
4.4.4	Proteína Bruta	23
4.4.5	Lipídios.....	24
4.4.6	Carboidratos.....	24
4.4.7	Determinação de Lignina Solúvel.....	25
4.5	Preparo da solução nutriente para a fermentação	26
4.6	Cultivo em Estado Sólido	27
4.6.1	Determinação da influência granulométrica do RUC na FES.....	27
4.6.2	Planejamento Experimental Fatorial.....	28
4.7	Análise do Substrato Fermentado	30
4.7.1	Umidade.....	30
4.7.2	Extração Enzimática.....	30

4.7.3	Determinação da atividade amilolítica.....	30
4.8	Efeito do pH na extração enzimática e avaliação da termoestabilidade .	31
4.9	Efeito do tempo e agitação na extração enzimática	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1	Caracterização do Bagaço de Malte de Cevada.....	34
5.2	Fermentação No Estado Sólido.....	36
5.2.1	Influência da granulometria na FES	36
5.2.2	Otimização da Produção de Amilase por <i>Aspergillus niger</i>	37
5.3	Cinética de obtenção enzimática nas condições otimizadas	48
5.4	Caracterização parcial da enzima amilase	49
5.4.1	Efeito do pH na extração enzimática e avaliação da termoestabilidade	49
5.4.2	Efeito do tempo e agitação na extração enzimática	52
6	CONCLUSÃO	58
7	REFERENCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem utiliza as enzimas para catalisar uma série de reações e obter diversos produtos, embora ainda não possuísse conhecimento acerca do mecanismo e das reações envolvidas. Dentre as enzimas mais conhecidas, encontram-se as amilases, as quais possuem ampla aplicação industrial, como em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil e em produção de detergentes (LEADLAY, 1993).

As enzimas que integram o grupo das amilases são responsáveis por 25% da produção mundial de enzimas, sendo a α -amilase a mais importante dentre elas, desempenhando papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixo peso molecular, os quais podem ser utilizados por enzimas do mesmo grupo (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

A obtenção dessas enzimas ocorre por vias fermentativas, principalmente através da fermentação submersa, porém a fermentação no estado sólido (FES) demonstra-se como uma alternativa viável de obtenção, uma vez que requer baixa tecnologia, sendo economicamente viável, além de apresentar aumento da concentração enzimática no produto final (SPIER, 2006; PANDEY, 2003).

A fermentação no estado sólido (FES) consiste em uma técnica de crescimento de microrganismo sobre ou dentro do interior de partículas porosas úmidas, no qual a atividade de água mantida na matriz sólida deve ser mantidos de forma que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular (PALMA, 2003).

Na FES, os fungos representam-se como os microrganismos mais promissores, pela variedade dos produtos provenientes de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento de hifas que permitem aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matériaprima, sendo a espécie de *Aspergillus niger* de grande destaque (RODRIGUES *et al*, 2009).

O fungo *A. niger* pode ser encontrado no solo possuindo importante função na decomposição da matéria orgânica no meio ambiente. Este fungo é capaz de sintetizar ampla faixa de enzimas lignocelulíticas a partir de grande variedade de matérias-primas de baixo custo (SLIVINSKI, 2007).

Dentre os substratos mais utilizados na FES para a obtenção de enzimas microbianas, estão os resíduos industriais e os subprodutos agrícolas. Estes, são de fácil obtenção e possuem baixo custo, apresentando-se como uma forma viável para a obtenção de enzimas (SANTOS, 2015).

Neste aspecto vale ressaltar o resíduo úmido cervejeiro (RUC) ou bagaço úmido de cervejaria. O RUC é um material lignocelulósico, sendo o mais abundante do processo produtivo cervejeiro, responsável por cerca de 85% dos subprodutos gerados. Este resíduo possui a vantagem em não apresentar problemas de sazonalidade, uma vez que é gerado o ano todo, sendo de fácil obtenção (MUSSATO *et al*, 2008).

Partindo desse princípio, o objetivo do presente estudo é obter o extrato enzimático para a enzima amilase a partir da fermentação no estado sólido utilizando o RUC como substrato por meio do fungo *Aspergillus niger*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho possui como objetivo obter o extrato enzimático para a produção de amilase a partir da fermentação no estado sólido do resíduo úmido cervejeiro (RUC) utilizando o fungo *Aspergillus niger*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o resíduo úmido cervejeiro (RUC) obtendo a sua composição físico-química;
- Determinar a melhor granulometria do RUC através da cinética de fermentação;
- Otimizar as condições fermentativas através do planejamento experimental fatorial completo 3^3 ;
- Realizar a cinética de fermentação da enzima amilase a partir condição ótima de fermentação;
- Determinar o pH ótimo de extração e a termoestabilidade enzimática;
- Determinar o melhor tempo e agitação de extração enzimática através do planejamento experimental fatorial 2^3 .

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fermentação No Estado Sólido

A fermentação no estado sólido (FES) é um bioprocesso geralmente definida como a fermentação que ocorre em uma superfície ou dentro de partículas de uma matriz sólida na ausência total ou parcial de água livre (PANDEY, 2003). A quantidade de água presente é suficiente para simular o habitat natural do microrganismo, proporcionando seu crescimento e metabolismo, encontrando-se adsorvida ou complexada no interior da matriz sólida (SOCCOL, MARIN, RAIMBAULT, & LEBEAULT, 1994).

Segundo Pinto *et al.* (2005) a fermentação no estado sólido apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbiana;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

O processo fermentativo no estado sólido possui diversas vantagens, como a simplicidade do meio de cultivo, podendo ser empregados substratos baratos e acessíveis (geralmente resíduos agrícolas), o crescimento microbiano ocorre o mais próximo do habitat natural, devido à baixa umidade do meio o risco de contaminações é menor, obtenção de produtos concentrados, baixa demanda de energia e menor desprendimento de águas residuais (SINDHU, 2015; SPIER, 2005).

Apesar de ser um processo versátil, a FES também possui desvantagens como o risco de elevação na temperatura, pré-tratamento dos suportes ocasionando possíveis modificações na estrutura da fase sólida, difícil estimativa da biomassa produzida, limitação do microrganismo devido à baixa ou ausência de água, difícil controle de parâmetros fermentativos como temperatura e pH (SINDHU, 2015; SPIER, 2005).

Diversos fatores são capazes de influenciar a FES. Dentre os mais comuns estão o pH, temperatura, teor e atividade de água e aeração.

O pH do meio pode influenciar a resposta metabólica do microrganismo, induzindo a mudanças morfológicas e a secreção enzimática, afetando o transporte dos componentes na membrana das células. Isso ocorre devido a secreção de ácidos orgânicos para o meio, causando a diminuição do pH (AFONSO, 2012).

A temperatura pode ser considerada um dos fatores mais importantes no crescimento de microrganismos durante o processo de FES, pois o crescimento e a produção de enzimas são bastante sensíveis a esse fator, estando diretamente relacionada ao transporte de massa e a transferência de oxigênio (SOUZA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

O teor de água contido no meio é outro fator determinante para o rendimento do processo fermentativo, pois ela é responsável pela difusão dos solutos, gases e metabólitos inibitórios, além da absorção celular (PANDEY, 2003).

A água presente pode estar relacionada a umidade, que é a porcentagem total de água no meio fermentativo ou a atividade de água, que está relacionada a quantidade de moléculas de água disponível na vizinhança imediata as partículas do substrato, afetando diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO *et al.*, 2005).

Níveis de umidade elevadas podem diminuir a porosidade, aumentar o risco de contaminação, reduzir o volume de gás e a troca gasosa. Por outro lado, níveis baixos de água presentes no meio, podem ocasionar menor esporulação, germinação e formação de metabólitos (AFONSO, 2012).

Outra variável a ser monitorada durante a FES é a aeração. Segundo Correia (2004) a aeração possui as funções de manter condições aeróbicas, eliminar o dióxido de carbono formado, ajustar o nível de umidade e regular a temperatura.

O crescimento de microrganismos e a produção de enzimas são fortemente influenciados pela composição do meio de cultura, assim, a otimização dos meios de cultivo deve ser considerada. Os fungos utilizam nitrogênio fundamentalmente na forma de amônio, podendo-se ainda utilizar nitratos como forma de nutriente. Outras fontes de nitrogênio incluem uréia,

hidroxilamina e peptídeos. Outros nutrientes minerais que podem ser fontes de nutrientes são fósforo, enxofre, potássio e magnésio (WAINWRIGHT, 1995).

3.2 Matérias Primas Empregadas na FES

O Brasil é um dos maiores produtores agroindustriais do mundo. Projeções indicam que em 2025 serão produzidos cerca de 260 milhões de toneladas de grãos no país (MAPA, 2015).

O número de produção elevado, se por um lado traz riqueza para o país, por outro lado faz aumentar a preocupação com a destinação dos resíduos gerados, uma vez que a taxa de geração desses resíduos é maior que a sua taxa de degradação.

Inúmeros resíduos tem sido utilizados em diversos processos para a produção de bioprodutos, devido a sua facilidade de obtenção, pois encontram-se disponíveis em grande quantidade e por serem recursos renováveis, apresentando-se como uma alternativa de baixo valor comercial (MANERA *et al.*, 2011).

As matérias primas comumente utilizados na FES são resíduos ou subprodutos da agroindústria. Dentre as mais utilizadas encontram-se os resíduos de mandioca, milho, café, bagaço de cana-de-açúcar, casca e farelo de arroz e de trigo (EICHLER, 2015).

Os substratos utilizados são materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de material polimérico, ricos em lignina, celulose, hemicelulose, amido e proteína, caracterizando-se pela sua insolubilidade em água e por favorecer o crescimento microbiano, mesmo sem a suplementação do meio (PANDEY, 2003).

A escolha da matéria-prima é de suma importância para que a FES ocorra de maneira eficiente, possibilitando o maior rendimento do processo. Em alguns casos, pode-se fazer necessário o uso de tratamentos físicos ou químicos para fornecer novas características ao substratos, como o aumento da porosidade e a capacidade de retenção de água

Segundo Del Bianchi *et al* (2001) quanto menor a granulometria do meio maior a área superficial, favorecendo o ataque do microrganismo, por outro lado, manter a granulometria própria é importante devido a circulação de ar e liberação dos gases e do calor produzido durante a fermentação.

A porosidade é outra característica a ser observada, uma vez que a mesma é capaz de absorver água, facilitando o transporte das enzimas e de seus metabólitos (DEL BIACHI *et al*, 2001).

Devido a suas características os substratos de origem agroindustrial são os melhores materiais a serem utilizados em FES, não havendo exceções para a produção de enzimas (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009). A Tabela 1 apresenta exemplos de substratos sólidos e suas aplicações.

Tabela 1 - Exemplos de substratos sólidos e suas aplicações.

Substrato	Aplicações	Referência
Farelo de Soja e Milho	Produção de amilase e protease	SANTOS, 2015
Borra de Café	Produção de Frutotransferase	SANTOS, 2018
Resíduo de Acerola	Produção de Celulase	MÉLO <i>et al.</i> , 2014
Bagaço de Malte	Produção de α -amilase	DE LIMA, 2019
Bagaço de Malte	Produção de Lipases	EICHLER, 2018

Fonte: O autor, 2021.

3.2.1 Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)

A indústria cervejeira é uma das mais populares no Brasil, sendo fundamental para a economia do País. Segundo dados da CervBrasill (2019), a mesma movimenta cerca de 1,6% do PIB nacional e 14% da indústria de transformação, produzindo 14,1 bilhões de litros por ano.

Segundo o Decreto N°6.871, de 4 de junho de 2009, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (MAPA, 2009).

Segundo a mesma legislação, são considerados adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira não maltada e os demais cereais maltados ou não maltados aptos para o consumo humano como alimento (MAPA, 2019).

A inserção dos adjuntos no processo produtivo da cerveja, ocorre principalmente devido ao menor custo que possuem em relação ao malte, uma vez que segundo a Embrapa (2009), 85% da cevada destinada ao consumo

brasileiro é proveniente de importação, sendo Argentina e Uruguai os principais fornecedores.

Dentre os adjuntos mais empregados para a produção da cerveja estão o milho, arroz, cevada não maltada, açúcares e xaropes. A cevada é produzida mundialmente em larga escala, sendo os maiores produtores, Estados Unidos, China, Rússia, Alemanha e o Brasil. A utilização da cevada não maltada em quantidades maiores que 20% pode acarretar no menor rendimento na extração, em mosto mais viscoso, problemas na fermentação e na cerveja final.

Em relação ao milho, o Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho, perdendo apenas para Estados Unidos e China. O grão é majoritariamente composto por carboidratos, proteínas e uma pequena quantidade de óleo que pode conferir a espuma da cerveja efeitos negativos. Portanto, para ser utilizado como adjunto, ele deve ser desgerminado a fim de diminuir a concentração do óleo. Enquanto o uso do arroz moído resulta em cervejas mais suaves, devido as suas características neutras (BAMFORTH, 2006).

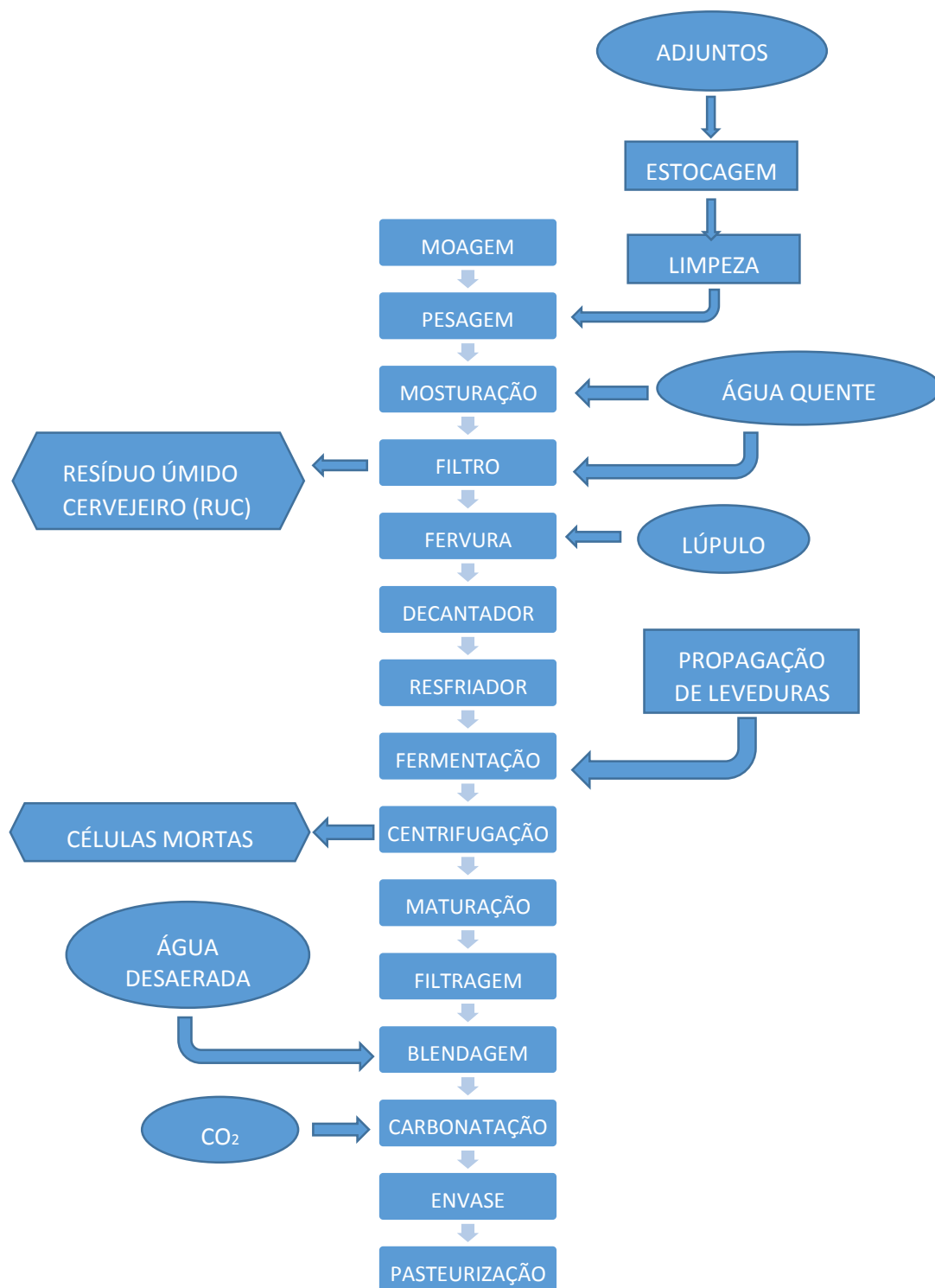
O sorgo, assim como o milho, é amplamente utilizado como adjunto cervejeiro, porém apresenta menor custo, podendo ser encontrado maltado ou não maltado.

O trigo é outro cereal amplamente utilizado como adjunto, podendo ser encontrado maltado ou não. Sua utilização pode aumentar a turvação da cerveja, aumentar a viscosidade do mosto e diminuir a velocidade de fermentação.

A produção da cerveja ocorre a partir da fermentação da cevada, seguindo as seguintes etapas: brassagem, moagem do malte, mosturação ou tratamento enzimático do mosto, filtração, fervura, tratamento do mosto, fermentação, maturação e clarificação (KUNZE, 2014; KEMPKA *et al*, 2018).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, produzindo cerca de 14,1 bilhões de litros por ano, gerando grande quantidade de resíduos. O bagaço de malte, ou resíduo úmido cervejeiro (RUC), é o subproduto mais abundante de todo o processo produtivo da cerveja. Para cada 1000 litros de cerveja produzido, estima-se que sejam gerados cerca de 300kg de resíduo úmido cervejeiro (MELLO, 2014). A Figura 1 apresenta o fluxograma referente ao processo produtivo da cerveja.

Figura 1 - Fluxograma referente ao processo de fabricação da cerveja



Fonte: Adaptado de KUNZE (2007)

No processo produtivo de obtenção do malte, os grãos de cevada são imersos em água morna, a fim de promover a germinação dos grãos e a hidrólise

do amido em maltose e dextrose, os quais são extraídos posteriormente. Em seguida, a atividade enzimática é interrompida por aquecimento, sendo parte da água evaporada. O grão maltado é prensado e embebido em água para formar o mosto cervejeiro. Após o processo de brasagem (filtração), a parte sólida constitui o RUC (GERON *et al*, 2007).

Sua composição química está ligada diretamente com a variedade da cevada, o tipo de cerveja produzido, o processo produtivo utilizado, além dos adjuntos inseridos no processo (MELLO, 2014; MUSSATTO, 2014). Segundo Debiagi *et al*, (2012), a composição do RUC em base úmida apresenta entre 60 e 80% de água, 10 a 15% de carboidratos, entre 2,5 e 5% de proteína bruta e 0,5 a 2,5% de gorduras totais.

O RUC é um material lignocelulósico, fibroso e proteico, composto de aproximadamente 17% celulose, 28% lignina, 28% hemicelulose, 20% proteína e 70% de fibras (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

Em estudos realizados por Mello, Vergílio e Mali (2013) ao realizar a caracterização do bagaço de malte, os autores obtiveram teor de fibras do tipo insolúvel (61,83%), 12,29% de celulose, 26,13% de lignina e 23,41% de hemicelulose.

Maione (2019) caracterizou o resíduo úmido cervejeiro e sem processamento quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e proteína, obtendo teor de lignina insolúvel de 15% e lignina solúvel de 4%, de celulose (25,1%), hemicelulose (20,9%) e proteína (27,9%).

Devido as suas características nutricionais, o RUC pode ser utilizado para os mais diversos fins, como a alimentação humana, alimentação animal, geração de energia, produção de papel, material adsorvente e em processos biotecnológicos como substrato para a produção de enzimas (OLAJIRE, 2012).

Canedo (2015) realizou o enriquecimento proteico do bagaço de malte, adicionando-o na dieta de tilápias, obtendo resultados significantes quanto ao desempenho produtivo e parâmetros bioquímicos dos mesmos.

Ferreira (2017) elaborou biscoito integral utilizando diferentes proporções de bagaço de malte na formulação. Todas as formulações testadas apresentaram bons valores nutricionais e foram sensorialmente aceitas.

Em estudo realizado por Da Silva (2019), a autora avaliou a aplicação do bagaço de malte como biossorvente em coluna de leito fixo, obtendo resultados satisfatórios para a biossorção de efluentes contendo o corante amarelo reativo.

Para a produção de enzimas, De Lima (2019) obteve resultados promissores quando produzida a enzima α -amilase a partir da fermentação sólida do bagaço de malte. Rocha (2019) obteve a enzima amilase utilizando o RUC como substrato, sendo possível obter a enzima com alta estabilidade térmica. Eichler (2018) produziu lipases a partir do bagaço de malte, conseguindo obter a enzima com alta atividade lipolítica.

3.3 Microrganismo empregados na FES

Diversos grupos microbianos podem ser utilizados em processos fermentativos em meio sólido, como por exemplo, bactérias e leveduras. Contudo, os fungos filamentosos são os que possuem características mais adaptáveis a esse tipo de processo, devido as suas condições fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL *et al*, 1994, PINTO, 2003).

De acordo com Moreira e Siqueira (2006) os fungos são heterotróficos, com nutrição por absorção, ou seja, liberam enzimas sobre diversos substratos e absorvem os nutrientes resultantes da digestão desses compostos. Apresentam parede celular constituída de quitina, reservam glicogênio e podem ser unicelulares (leveduras) ou constituir hifas (filamentosos).

Os fungos filamentosos se reproduzem de forma assexuada pela fragmentação da hifas, e tanto a forma assexuada quanto a sexuada ocorrem pela formação de esporos, sendo sua identificação feita pelo tipo de esporo. Logo após um fungo filamentoso formar um esporo, o mesmo se separa da célula parental e germina formando um novo fungo filamentoso (TORTORA *et al*, 2005).

De acordo com as características do meio onde os fungos estão inseridos, seu crescimento, variabilidade e flexibilidade metabólica podem variar. Esses fungos apresentam a capacidade de modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes, como fonte de energia e como elementos básicos para seu crescimento e reprodução. Sua nutrição ocorre por absorção, dessa forma necessitam explorar seu ambiente na busca por nutrientes que, uma vez digeridos a moléculas com menor peso molecular, possam ser absorvidas e

utilizadas internamente como fonte de energia para o seu crescimento (LOPES, 2011; NAGY *et al.*, 2016).

Os fungos apresentam capacidade de adaptação à inúmeros tipos de substratos sólidos, uma vez que este tipo de meio possui semelhança com seu ambiente natural. Os componentes dos materiais lignocelulósicos durante a decomposição fúngica são progressivamente despolimerizados por complexos enzimáticos. As células alargadas de crescimento apical permitem que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e penetrem dentro do mesmo, em busca de nutrientes, facilitando a utilização desses substratos para obter substâncias de interesse, como as enzimas (PEREIRA, 2016).

Por serem microrganismos biologicamente ativos, diversos fungos filamentosos originam compostos bioativos. Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp.* são bastante utilizados em processos biotecnológicos para a obtenção de enzimas. Eichler (2018) produziu a enzima lipase utilizando o fungo *Aspergillus brasiliensis* através da fermentação no estado sólido, obtendo no tempo de 96 h a maior atividade lipolítica.

A produção e purificação da enzima frutossiltransferase foi realizada por Santos (2018). O autor utilizou o fungo *Aspergillus flavus* utilizando a borra de café como substrato para o processo fermentativo, obtendo após 72 h de fermentação a produção máxima da enzima, com atividade de 31,5 U/mg.

3.3.1 *Aspergillus niger*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são os fungos filamentosos mais populares e comumente estudados, podendo ser encontrados nos mais diversos habitats como o ar e a água, sendo conhecidas mais de 185 espécies.

Pertencentes ao reino Fungi, ao filo *Ascomycota*, e à família *Thichonomaceae*, o grupo é caracterizado por serem seres filamentosos, podendo apresentar inicialmente coloração branca e amarela, passando para o marrom e preto (SANTOS, 2007).

A colônia é composta por hifas septadas, micélio aéreo com conidióforos eretos, e farta produção de conídios negros. Os conídios, por sua vez, são esféricos e medem de 4 a 5 μm e podem se dividir ao atingir a maturação (PRADO, 2002).

O fungo *Aspergillus niger* é um fungo filamentosso aeróbio que pode se desenvolver em meio líquido e sólido. O fungo é um ascomiceto imperfeito, o qual apresenta quatro etapas fisiológicas importantes: dormência, a germinação, a multiplicação vegetativa e a conidiogênese (RODRIGUES, 2006).

Os esporos de *A. niger* passam do estado de dormência para a germinação, o qual através de sua morfologia e processo metabólico é possível germinar formando hifas e o micélio. Para que a germinação ocorra de modo favorável, é preciso que a umidade do ambiente seja suficiente, além de possuir todos os nutrientes necessários para o crescimento da hifa (RODRIGUES, 2006). As classificações e as principais características do fungo *Aspergillus niger* são descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Classificações e principais características do fungo *Aspergillus niger*.

Classificações		Principais Características
Reino	Fungi	
Divisão	Eumycota	Tipicamente Micelial, algumas vezes unicelular
Subdivisão	Deuteromycotina	Talo micelial e septado ou unicelular, reprodução sexual ausente, mas a parassexual pode ocorrer
Classe	Hyphomycetes	Formas miceliais estéreis ou produzindo conídios em hifas separadas ou agregadas na ausência de conidiomata
Ordem	Moniliales	Micélio hialina, contendo conidióforos livres, que se projetam do micélio de forma irregular.
Família	Moniliaceae	Os conidióforos são solitários livres, que se projetam do micélio de forma irregular
Gênero	<i>Aspergillus</i>	Micélio septado. Conidióforo ereto com terminais globosos dos quais emergem fiálides com conídios arredondados unicelulares e de coloração negra, esverdeada ou amarela.
Espécie	<i>Niger</i>	Conídios globulosos de aspecto rugoso, com equinulações verdadeiras, coloração negra.

Fonte: (COURI, 1993)

A utilização de *A. niger* em processos fermentativos apresentam algumas vantagens em relação a outros microrganismo, como por exemplo, a facilidade de manipulação, habilidade em fermentar diversos tipos de substratos de baixo custo apresentando elevado rendimento em bioprodutos (SPIER, 2005).

Esses fungos apresentam capacidade de desenvolver-se em ambientes com temperaturas entre 6°C a 47°C, apresentando crescimento ótimo na faixa de 35°C a 37°C. Além da ampla faixa de temperatura, o *A. niger*, apresenta capacidade de crescimento em ampla faixa de pH, entre 1,4 e 9,8. Diante disso, esse microrganismo é capaz de crescer em ambientes quentes e úmidos (SCHUSTER *et al.*, 2002; PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005).

Devido a suas características, é um fungo utilizado para obtenção de diversos bioprodutos, dentre elas a formação de enzimas através da FES. Spier (2005) obteve enzimas amilolíticas (α -amilase e amiloglucosidade) através da FES da fécula de mandioca, obtendo a máxima produção enzimática nas condições de temperatura entre 30 e 32°C fermentação; proporção fécula/bagaço (2/1); 90% umidade inicial; 10% fonte de nitrogênio inorgânico (KNO_3); 30% solução salina, $\leq 5\%$ $CaCO_3$; 5% fécula e $1,0-5,5 \times 10^7$ esporos/g MS; 60 horas de fermentação e pH inicial=4,0.

Enzimas amilolíticas também foram obtidas através da FES utilizando-se bagaço de malte como substrato, por TORRES e DA SILVA (2016). Os autores testaram a quantidade de substrato, pH e temperatura, obtendo-se os melhores resultados em 48 h de fermentação ao utilizar 10 gramas de substrato, temperatura de 25°C e pH 4,0.

Outras enzimas microbianas foram obtidas através da utilização do fungo *A. niger*, como por exemplo, a enzima glucoamilase foi obtida por Slivinski (2007), β -glucosidase por Salihu *et al.*, (2015), lipases por Costa *et al.*, (2017) e (DOS SANTOS *et al.*, 2017), celulase por (CAVALCANTE *et al.*, 2018), α -amilase por (DE LIMA, 2019) e pectinase por Santos (2007).

3.4 Enzimas Microbianas

Enzimas são polímeros que apresentam atividade catalítica. Em sua maioria são proteínas, de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados

uns aos outros por ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente, apresentando atividade catalítica (NELSON; COX, 2014; SANT'ANNA JR, 2001).

Segundo Nelson e Cox (2014) as enzimas são obtidas através de vegetais inferiores, animais superiores e microrganismos. Todavia, as enzimas obtidas a partir de vegetais requerem grande quantidade de planta para se obter pequena quantidade de enzimas. As enzimas provenientes de animais são subprodutos de indústrias alimentícias, o qual pode ser fonte escassa caso seja necessário um elevado número dessas enzimas.

As células microbianas são importantes para a obtenção de enzimas, apresentando uma série de vantagens: a produção pode ser aumentada sempre que necessário, são fáceis de serem cultivadas em condições controladas, são suscetíveis a variações genéticas permitindo o melhoramento gênico, possibilidade de obtenção de grande variedade de enzimas devido a diversidade de sua natureza, além de possuir alta produtividade com baixo custo (SANTOS, 2007).

Segundo Laider (1954), as enzimas podem ser classificadas de acordo com o substrato com o qual reagem, adicionando a terminação *ase* ao final do nome do substrato. Dessa forma, enzimas que decompõem a ureia recebem o nome de urease, as que hidrolisam proteínas chamam-se proteases, as que hidrolisam o amido, denominam-se amilases.

Em relação a origem, as enzimas podem ser divididas em 2 grupos: as intracelulares, que são produzidas e mantidas dentro das células e as extracelulares, que são produzidas e após são secretadas para o meio externo (COELHO *et al*, 2008).

As enzimas podem ainda ser classificadas de acordo com seu modo de ação: endoenzimas e exoenzimas. As endoenzimas atuam em regiões internas da molécula ou do polímero ativo, clivando suas ligações químicas, enquanto as exoenzimas, atuam nas extremidades da molécula ou polímero alvo clivando suas ligações, formando assim dímeros ou trímeros (ROCHA, 2010).

A obtenção de enzimas microbianas são realizadas a partir de processos fermentativos, os quais são realizados utilizando-se substratos que sejam fonte de nutrientes e carbono. Os microrganismos utilizados nesses processos são

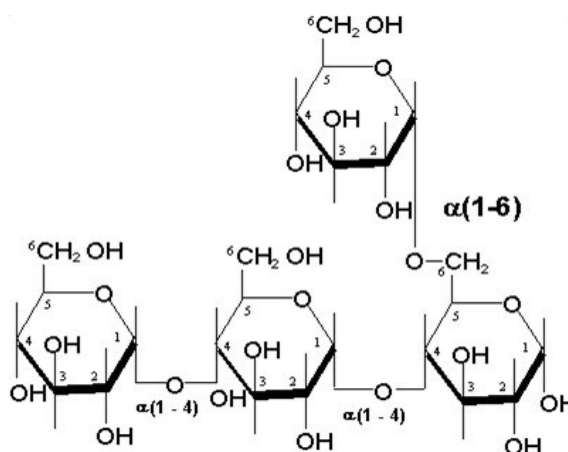
obtidos de fontes naturais, adquiridos em coleções de culturas, a partir de mutantes naturais ou através da engenharia genética (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para que a produção de enzimas microbianas seja efetiva e possua alto rendimento, o microrganismo utilizado deve possuir características compatíveis com o substrato. Segundo FELLOWS (1994) o substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitem a proliferação celular, em alguns casos pode haver a necessidade de nutrientes específicos para o crescimento e de determinados minerais para a produção da enzima de interesse.

3.4.1 Enzimas Amilolíticas

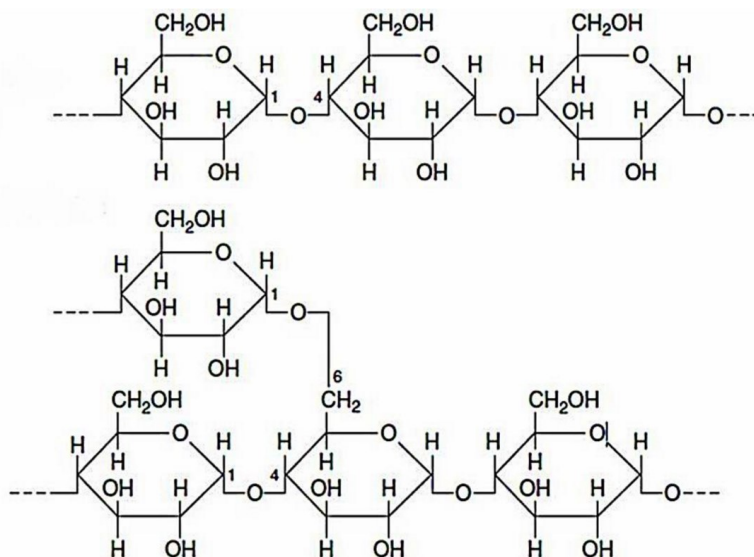
As amilases, também chamadas de enzimas amilolíticas, integram a classe das hidrolases e são amplamente distribuídas na natureza. São enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas do amido, principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, que contém dois tipos de polissacarídeos, dependendo do seu ponto de atuação: amilose e amilopectina (GOMMA, 2013). A Figura 2 apresenta a estrutura química do amido, enquanto a Figura 3 apresenta a forma estrutural da amilose e amilopectina.

Figura 2 - Estrutura química do amido



Fonte: SBQ, 2021

Figura 3 - (a) Estrutura química da amilose; (b) Estrutura química da amilopectina

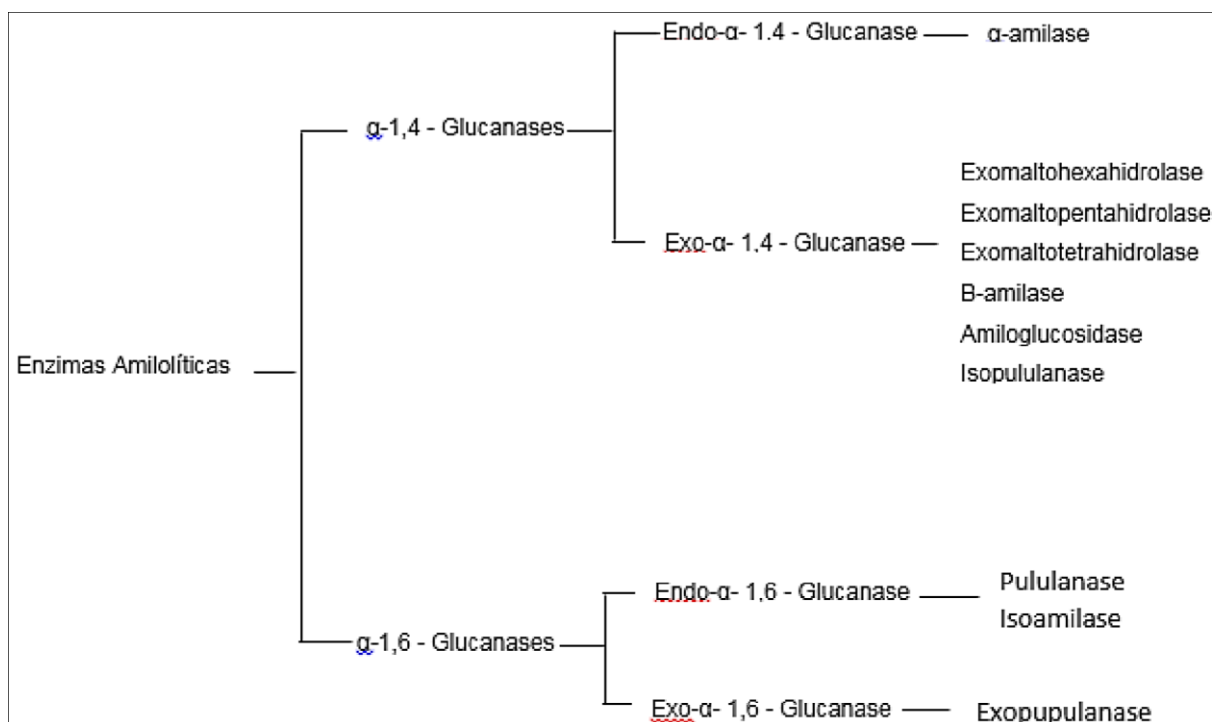


Fonte: Adaptado de Bewley *et al.*, 2013

Sua obtenção ocorre por meio de microrganismos, animais ou vegetais, sendo amplamente utilizadas em indústrias alimentícias, têxteis e farmacêuticas. Sua produção corresponde à cerca de 30% da produção enzimática, ficando atrás apenas da produção de proteases (BIAZUS *et al*, 2010).

As enzimas envolvidas na despolimerização do amido estão classificadas em: endoamilases (α -amilases), β -amilase e exoamilases (α glucosidases, isoamilases e as pulalanases (enzimas de desramificação) e, por fim, as transferases que tem como exemplo as amilomaltases e as ciclodextrina glicosil transferase (PANDEY *et al*, 2000). A Figura 4 apresenta a identificação e classificação das enzimas amilolíticas.

Figura 4 - Classificação e identificação das enzimas amilolíticas.



Fonte: Luft (2016)

Dentre as enzimas amilolíticas, a α -amilase é considerada a mais importante, devido a sua conversão do amido em produtos menores, que podem ser utilizados por outras enzimas. As α -amilases são enzimas que atuam ao longo da cadeia de amilose e amilopectina, quebrando as ligações α (1,4) e liberando oligossacarídeos, além de maltose e glicose. A ação da α -amilase sobre a amilose consiste no ataque rápido e aleatório ao substrato, resultando em maltose e maltotriose e em seguida uma etapa mais lenta permite a formação de glicose e maltose (GUANDALINI, 2007).

Essas enzimas são subdivididas em dois grupos: α -amilases sacarificantes, que hidrolisam entre 50% e 60% do substrato e as liqueficientes, que quebram 30% a 40% do substrato (DECLERCK *et al.*, 2000).

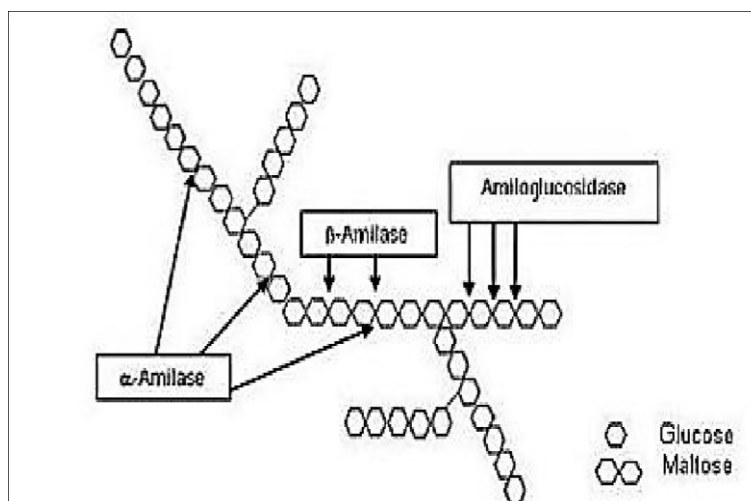
Segundo (SPIER, 2005), as α -amilases podem atuar de forma isoladas ou simultaneamente com outras enzimas amilolíticas, tornando possível uma eficiência da conversão do amido.

A β -amilase trata-se de uma exoenzima que hidrolisa ligações β (1,4), a partir da extremidade não redutora sobre a penúltima ligação óxido, produzindo somente maltose ou glucose, não sendo capaz de hidrolisar as ligações α (1,6) dos substratos ramificados (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000)

As α -glucosidase é uma enzima extracelular que rompe as ligações α (1,4) e α (1,6) do amido da extremidade não redutora até a glicose. Também chamada de amiloglucosidade, ela é uma enzima de indução, desta forma, é necessária a presença de amido ou maltose no meio para que ocorra alta produção (PANDEY *et al*, 2005; REGULY, 1991).

A amiloglucosidade é uma enzima de origem fúngica, a qual produz duas ezoenzimas, a amiloglucosidade I e II, obtidas por *Aspergillus niger*. A variar de sua fonte, essa enzima apresenta pH ótimo entre 3,0 e 5,0, encontrando-se a maior estabilidade entre 4,0 e 5,0, enquanto a temperatura ótima encontra-se entre 50°C e 60°C. A Figura 5 apresenta de modo geral a hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas.

Figura 5 - Representação geral da hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas



Fonte: VAN DER MAAREI *et al*, 2002

Segundo Gupta (2003), as α -amilase são as enzimas amilolíticas mais utilizadas pela indústria, porém na maioria das vezes as condições industriais para sua utilização não são favoráveis, apresentando pH ácido, temperaturas elevadas, alta viscosidade, entre outros aspectos.

A faixa ótima de temperatura para a atividade enzimática encontra-se entre 55 a 70°C. Com relação a estabilidade, para as amilases bacterianas aumenta de forma considerável em temperaturas superiores a 40°C apesar da atividade aumentar nas temperaturas entre 0°C e 40°C (GUPTA, 2003).

3.5 Planejamento Experimental Fatorial

A obtenção de dados confiáveis durante a condução de qualquer procedimento experimental é de suma importância e requer a elaboração de um delineamento bem definido, cujos parâmetros são determinados pela finalidade do experimento, e para auxiliar na obtenção e confiabilidade desses dados, um planejamento experimental se faz necessário.

O planejamento experimental é uma série de ensaios com base científica para determinar a influência de determinadas variáveis no processo (BUTTON, 2012).

Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis, encontra-se o planejamento fatorial. Este tipo de planejamento é o mais indicado quando se deseja estudar dois ou mais parâmetros, sendo que todos os fatores são combinados e investigados entre si (BARROS NETO *et al*, 1996).

De maneira geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^k , onde k é o número de fatores e b é o número de níveis escolhidos, sendo o caso mais simples quando k é representado por apenas 2 fatores (NEVES *et al*, 2002).

O planejamento fatorial é amplamente utilizado nos estudos de obtenção enzimática. Fischborn (2013) utilizou o planejamento experimental fatorial 2^{5-1} para obtenção de enzimas fúngicas. A autora conseguiu avaliar através do planejamento experimental a influência das variáveis umidade, temperatura, tempo e adição de nutrientes.

Dresch *et al* (2019) estudaram a hidrólise enzimática da biomassa proveniente do milho e para avaliar seus resultados, os autores realizaram o planejamento fatorial completo, obtendo resultados promissores para a produção de biotanol a partir do milho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de química orgânica, processos químicos e microbiologia da UTFPR- Campus Toledo. O bagaço de malte de cevada utilizado como substrato, foi gentilmente cedido pela INAB- Industria Nacional de Bebidas, localizada em Toledo-PR. O fungo *Aspergillus niger* NCQS 40371 foi adquirido no banco de Cepas da FIOCRUZ.

4.1 Microrganismo

O fungo filamento *Aspergillus niger* NCQS 40371 utilizado neste trabalho, foi adquirido no banco de cepas da FIOCRUZ e inoculado em placas de Petri com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantido sob refrigeração de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ com repiques trimestrais.

Os esporos obtidos foram recuperados das placas através de raspagem, utilizando-se água destilada estéril contendo 0,2 mL de Tween 80. A solução obtida foi armazenada sob refrigeração pelo período de 30 dias.

4.2 Contagem de Esporos

Para a determinação da concentração de esporos, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, nos quais foram contados 16 dos 25 quadrículos na região central da câmara. As dimensões dos quadrículos da câmara de Neubauer são de uma área de $0,0025\text{ mm}^2$ e profundidade de 0,1 mm para cada quadrículo.

Para a contagem, uma porção do inóculo foi diluída em 200 mL de água, promovendo-se sua homogeneização através de agitação em agitador magnético por 5 minutos. Esta solução foi colocada em câmara de Neubauer com auxílio de micropipeta previamente esterilizada e por uma lamínula de vidro. A contagem dos esporos ocorreu utilizando-se microscópio óptico (BIOVAL) com objetiva de 40 x.

O cálculo para a concentração de esporos na suspensão foi realizada conforme Equação (1), sendo NE é a média de esporos obtido na suspensão e FD é o fator de diluição.

$$\left[\frac{\text{Esporos}}{\text{mL}} \right] = \frac{NE \times FD}{10^{-4}} \quad (1)$$

4.3 Preparo do Substrato

O substrato utilizado foi o bagaço de malte de cevada, cedido pela Industria de Bebidas – INAB, localizada na cidade de Toledo-PR. Ao chegar ao laboratório, o bagaço de malte foi embalado a vácuo, congelado e armazenado a -18°C para a preservação de suas características.

Uma fração do material foi seco em estufa à 60°C e outra fração foi utilizada em sua forma *in natura*, ou seja, sem realizar secagem prévia.

4.4 Caracterização do Bagaço de Malte de Cevada

4.4.1 pH

A análise de pH foi realizada segundo a metodologia analítica do Instituto Adolf Lutz (LUTZ, 2008). Foram pesadas 10g de amostra, em triplicata, adicionou-se 100 mL de água destilada. Após a homogeneização, o eletrodo do pHmetro (TECNOPON), previamente calibrado, foi inserido na amostra e o pH aferido.

4.4.2 Umidade

A análise de umidade foi realizada através de secagem direta em estufa a 105°C (LUTZ, 2008). Pesou-se 10g de amostra em cápsula de porcelana, as quais foram levadas a secagem em estufa por 3 horas. Após, as amostras foram retiradas e deixadas em dessecador até alcançar temperatura ambiente para posterior pesagem. O procedimento foi realizado até a obtenção de 3 pesagens consecutivas com peso constante. A umidade em base úmida foi determinada através da Equação 2.

$$umidade (x.b.u) = \frac{massa\ inicial - massa\ final\ da\ amostra}{Massa\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (2)$$

x.b.u= base úmida

4.4.3 Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado através de incineração em mufla, segundo metodologia analítica do Instituto Adolf Lutz (LUTZ, 2008). Foram pesadas 10g de amostra em cápsulas de porcelana, previamente aquecida em mufla e resfriada a temperatura ambiente. As amostras foram carbonizadas em mufla a 550°C até massa constante e após resfriadas em dessecador. O teor de cinzas foi determinado através da Equação 3.

$$Teor\ de\ cinzas\ (\%) = \frac{massa\ final\ da\ amostra}{massa\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (3)$$

4.4.4 Proteína Bruta

O teor de proteína bruta foi realizado através do método de Kjeldahl (MAPA, 2014). O método compreende as etapas de digestão, destilação e titulação.

Foram pesadas 0,5g de amostra, em triplicata e inseridas no tubo de digestão. A solução catalítica foi adicionada ($K_2SO_4 + CuSO_4 + 5H_2O + 10mL H_2SO_4$). Os tubos foram aquecidos no bloco digestor gradativamente até alcançarem a temperatura de 380°C, sendo que a digestão ocorreu por 90 minutos.

Após a digestão, procedeu-se a etapa de destilação. No destilador de nitrogênio, colocou-se os tubos e adicionou-se 25 mL da solução de NaOH 50% e 25 mL de água deionizada. Na saída do destilador, colocou-se um erlenmeyer contendo 25 mL de H_2SO_4 0,1N + 50 mL de água deionizada. A amostra foi fervida até a completa destilação da amônia e 75 mL do destilado foram recolhidos.

O destilado foi submetido a titulação, utilizando solução de NaOH 0,1 N e vermelho de metila como indicador. O teor de proteína foi determinado através da

Equação 4 e o teor de proteína em base seca foi calculado através da Equação 5.

$$Proteína (\%) = \frac{(VB-VL) \times N \times 1,4007 \times f}{PA (g)} \quad (4)$$

$$Proteína em Base Seca (\%) = \frac{\% Proteína \times 100}{100 - umidade \%} \quad (5)$$

Onde:

VB: mL gastos de NaOH 0,1N na titulação da prova branco;

VL: mL gastos de NaOH 0,1N na titulação da amostra

N: normalidade da solução de NaOH usado na titulação;

1,4007: peso molecular do Nitrogênio em miligramas;

PA: peso da amostra.

F: 6,25, fator de conversão de nitrogênio para alimentos em geral

4.4.5 Lipídios

O teor de lipídeos foi determinado através de extração em aparelho Soxhlet. Procedeu-se a pesagem de 5g da amostra em papel filtro. A amostra foi adicionada ao extrator em balão de fundo chato, utilizando-se éter de petróleo. A extração foi realizada por 8 horas. Após a extração, o éter foi destilado e o balão contendo o resíduo, foi seco em estufa por 1 hora a 105°C até peso constante (LUTZ, 2008). O teor de lipídios foi determinado pela Equação 6.

$$Lipídeos (\%) = \frac{(massa do balão + gordura) - massa do balão}{massa da amostra} \quad (6)$$

4.4.6 Carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada através do método da diferença, no qual é subtraído de 100 as porcentagens de proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas (BRASIL, 2003).

A Equação 7 foi utilizada para determinar a % de carboidratos presente no bagaço de malte de cevada.

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - \% (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{gordura}) \quad (7)$$

4.4.7 Determinação de Lignina Solúvel

O teor de lignina foi realizado através do método Klason, o qual utilizase extrato livre da parede celular obtido por meio de extração com solvente orgânico (GOUVEIA et al., 2009).

Foram pesadas 2 g de bagaço de malte e transferido para béquer de 100 mL. As amostras foram tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72% v/v, sob vigorosa agitação por 2 horas. Após, foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL e adicionado 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados e autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após a retirada da autoclave, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida utilizando-se papel filtro qualitativo.

A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e avolumada, sendo utilizada para a determinação de lignina solúvel. A fração sólida foi utilizada para a determinação de lignina insolúvel.

O teor de lignina solúvel foi determinada através de leitura em espectrofotômetro, utilizando absorvância de 215 e 280 nm. A Equação 8 foi utilizada na determinação do teor de lignina solúvel.

$$Cl_s = \left(\frac{(4,53 * A_{215}) - A_{280}}{300} \right) \quad (8)$$

Onde:

Cl_s - concentração de lignina solúvel, em g/L;

A₂₁₅- absorvância da solução de lignina em 215 nm;

A₂₈₀ – absorvância da solução de lignina em 280 nm;

Determinou-se o teor de lignina Klason solúvel (%) de acordo com a equação 9.

$$\% \text{ lignina} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

% lignina solúvel = teor de lignina solúvel presente na amostra em %

m_1 = massa (g) de lignina Klason solúvel a partir da concentração;

m_2 = massa (g) da amostra seca inicial;

O material retido no papel filtro qualitativo foi lavado com água destilada e posteriormente seco em estufa a 100°C até peso constante. O teor de lignina foi calculado utilizando-se a Equação 10.

$$\text{lignina kl insolúvel} = \frac{M_k - M_c}{M_a} \times 100 \quad (10)$$

LKi – Lignina Klason insolúvel;

Mk – massa de lignina insolúvel seca;

MC – massa de cinzas;

MA – massa da amostra seca

4.5 Preparo da solução nutriente para a fermentação

Utilizou-se solução nutriente nos meios de fermentação, como suplementação mineral para o fungo *A. niger*, o qual foi adicionada até atingir a umidade desejada para o meio, conforme planejamento. A solução nutriente foi preparada com a seguinte composição: 5 g/L⁻¹ (KH₂PO₄), 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L (MgSO₄.7H₂O), 1 g/L (NaCl), 5 mg/L (FeSO₄.7H₂O), 1,6 mg.L (MnSO₄), 3,45 mg/L (ZnSO₄.7H₂O), 2 mg/L (CoCl₂. 6H₂O). Após o preparo a solução salina foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 min (DE LIMA, 2019).

4.6 Cultivo em Estado Sólido

4.6.1 Determinação da influência granulométrica do RUC na FES

Realizou-se a separação granulométrica do RUC a fim de determinar sua influência durante o processo fermentativo. A cinética de fermentação foi realizada utilizando-se o RUC retino na peneira de 16 mesh Tyler e sem a separação granulométrica pelo período de 120h. As amostras foram analisadas nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 100, 108 e 120 horas. As Figuras 6 (A) e 6 (B) apresentam o RUC nas granulometrias de 20 e 16 mesh respectivamente.

Figura 6 - RUC com granulometria de 20 (A) e 16 mesh (B)

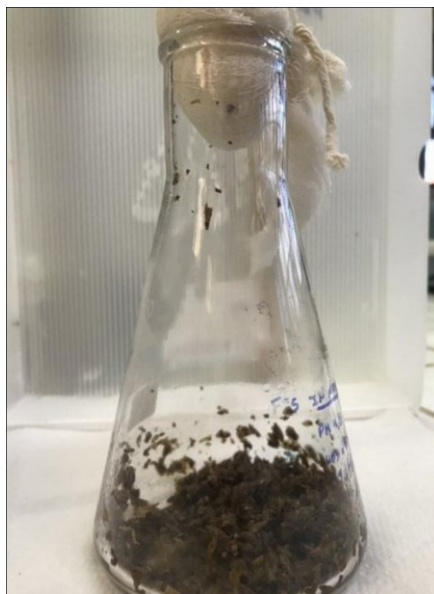


Fonte: Autoria Própria (2021).

Inicialmente procedeu-se a pesagem do substrato totalizando 10 gramas. Adicionou-se a solução nutriente de modo a obter-se umidade 80% e ajustou-se o pH para 5,0. Todo o material foi esterilizado em autoclave por 20 min à 120°C e 120 psi.

Para a inoculação com o fungo *A. niger*, foram adicionados 200 μ L de suspensão de células, de forma a se obter 10^{-7} esporos. As FES foram realizadas em triplicata e conduzidos em Shaker com agitação de 100 rpm (Figura 7).

Figura 7- Fermentação no estado sólido do resíduo úmido cervejeiro



Fonte: O próprio autor (2021)

4.6.2 Planejamento Experimental Fatorial

Com base nos dados obtidos na literatura, realizou-se um planejamento experimental fatorial completo 3^3 para avaliar a influência do pH, umidade e da temperatura durante a FES. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o item 4.6.1 utilizando-se o resíduo que apresentou o melhor resultado para a influência granulométrica, ajustando-se os parâmetros conforme planejamento experimental descrito na Tabela 3. Para a extração e determinação da atividade amilolítica, procedeu-se conforme item 4.7.2 e 4.7.3, respectivamente.

Tabela 3- Níveis das variáveis utilizadas no planejamento experimental fatorial completo 3^3 para obtenção do extrato enzimático da enzima amilase por fermentação no estado sólido do resíduo úmido cervejeiro utilizando-se o fungo

A. niger.

Variáveis	Níveis codificados e decodificados das variáveis independentes		
	-1	0	1
pH	4,0	5,0	6,0
Umidade (% b.u)	60	70	80
Temperatura (°C)	25	28	32

A Tabela 4 apresenta o planejamento experimental fatorial completo 3^3 com as faixas entre o limite inferior e superior de cada variável independente e 3 repetições no ponto central.

Tabela 4- Matriz do planejamento experimental fatorial 3^3 para a fermentação no estado sólido com os valores reais.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	4	25	60
2	4	25	70
3	4	25	80
4	4	28	60
5	4	28	70
6	4	28	80
7	4	32	60
8	4	32	70
9	4	32	80
10	5	25	60
11	5	25	70
12	5	25	80
13	5	28	60
14	5	28	70
15	5	28	80
16	5	32	60
17	5	32	70
18	5	32	80
19©	5	28	70
20©	5	28	70
21©	5	28	70
22	6	25	60
23	6	25	70
24	6	25	80
25	6	28	60
26	6	28	70
27	6	28	80
28	6	32	60
29	6	32	70
30	6	32	80

© repetições no ponto central

Fonte: Autoria Própria (2021).

O planejamento experimental fatorial foi analisado utilizando-se o software Statistica StatSoft 10.0 para a obtenção da regressão dos dados experimentais, do

modelo experimental, testes de normalidade, testes estatísticos para regressão e diagrama de Pareto além da análise de superfície de resposta, com o objetivo de avaliar a influência dos fatores.

4.7 Análise do Substrato Fermentado

4.7.1 Umidade

A análise de umidade para o substrato fermentado foi realizada através de secagem em balança determinadora de umidade marca Bel, Modelo I-Thermo 163L.

4.7.2 Extração Enzimática

Após a fermentação foi realizada a etapa de extração enzimática. Retirou-se 2 gramas de amostra e adicionou-se 40 mL de tampão acetato de sódio 0,1M e pH 5,0 na proporção de 1:20. A suspensão formada ficou em agitação em incubadora de agitação orbital, marca THOTH, por 60 minutos a 25°C. Em seguida foi filtrada com gaze para remoção das partes sólidas, obtendo-se o extrato, o qual foi centrifugado a 3500 rpm por 30 minutos, utilizando centrifuga digital, marca DAIK. O sobrenadante obtido foi utilizado para a análise de atividade enzimática (DE LIMA, 2019).

4.7.3 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada através da liberação de açúcar redutores totais, dosados pelo método DNS (Miller 1959).

A determinação foi realizada em tubos de ensaio adicionando-se 0,5 mL de amido solúvel à 1% e 0,5 mL do extrato enzimático. A mistura foi aquecida em banho termostático por 30 minutos a 60°C para garantir completa hidrólise. Após esta etapa, 1 mL da solução de DNS foi adicionada e aquecida a 100°C por 5 minutos. Ao fim deste tempo, a reação de hidrólise foi sessada através de banho

de gelo. Ao tubo, adicionou-se 2,5 mL de água e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro, marca/modelo Genesys 10uv, a 540 nm.

Um branco foi preparado contendo 0,250 mL de DNS e 0,125 mL de amido solúvel 1% e 5 mL de água. O branco foi incubado nas mesmas condições que as amostras descritas anteriormente.

Para a conversão das absorvâncias obtidas através da leitura em espectrofotômetro em glicose e calcular a atividade enzimática, uma curva padrão de glicose foi preparada.

As soluções de glicose foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L. Em tubos de ensaio, adicionou-se 1,0 mL das soluções e 1,0 mL de DNS. Após, os tubos foram mantidos sob fervura por 5 minutos e em seguida foram submetidos a banho de gelo. As soluções foram aferidas para 10 mL, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro (AFONSO, 2012).

Uma unidade de enzima (U/g) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições da reação, calculadas pela Equação 11:

$$U/g = [(Ct - R) / Ct] \times (Qs/10) \times (fd/Ve) \quad (11)$$

onde:

U/g = unidade de enzima por grama de substrato;

Ct = controle da enzima somado ao controle do substrato;

Qs = quantidade de substrato utilizado na reação (em mg);

10 = fator de referência de hidrólise de amido (10 mg); fd =

fator de diluição;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

4.8 Efeito do pH na extração enzimática e avaliação da termoestabilidade

O efeito do pH no processo de extração e a estabilidade enzimática foi realizada segundo DE LIMA (2019) e a determinação da termoestabilidade segundo SANTANA (2012).

O efeito do pH na extração enzimática foi realizado compreendendo a faixa entre 3,0 e 9,0 com intervalos de 0,5 unidades. As soluções tampões utilizadas foram 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 determinação do pH ótimo na extração enzimática foi realizada conforme descrito no item 4.8.2 e a atividade enzimática determinada pelo método DNS, de acordo com o descrito no item 4.8.3.

A estabilidade enzimática foi determinada utilizando-se o extrato obtido para o pH ótimo previamente determinado. A temperatura ótima foi determinada incubando-se 1 mL do extrato enzimático em 1 mL de solução de amido 1% em tampão fosfato 0,5 M. A atividade amilolítica foi realizada incubando as amostras nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90°C. Em seguida, a atividade enzimática foi determinada pelo método DNS.

4.9 Efeito do tempo e agitação na extração enzimática

Realizou-se a determinação do efeito do tempo e da agitação durante o processo de extração enzimática através de um planejamento experimental fatorial 2^3 (Tabela 5) para a melhor condição de fermentação obtida previamente.

Tabela 5 - Planejamento experimental fatorial 2^3 para determinação do melhor tempo e agitação de extração enzimática

Variáveis	Níveis codificados e decodificados das variáveis independentes		
	-1	0	1
Tempo (min)	20	40	60
Agitação (rpm)	50	100	150

Fonte: Autoria Própria (2021).

Realizou-se a análise estatística para o planejamento utilizando-se o software Statistica StatSoft 10.0 para a obtenção da regressão dos dados experimentais, do modelo experimental, testes estatísticos para regressão e diagrama de Pareto além da análise de superfície de resposta, com o objetivo de avaliar a influência dos fatores.

A Tabela 6 apresenta o planejamento experimental fatorial completo 2^3 com as faixas entre o limite inferior e superior de cada variável independente e 3 repetições no ponto central.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental fatorial 3^3 para a determinação do tempo e velocidade de agitação

Experimento	Tempo (min)	Velocidade de Agitação (rpm)
1	20,00	100,00
2	40,00	150,00
3	20,00	50,00
4	40,00	50,00
5	20,00	150,00
6	60,00	150,00
7	40,00©	100,00
8	40,00©	100,00
9	40,00©	100,00
10	60,00	50,00
11	60,00	100,00

© repetições no ponto central

Fonte: Autoria Própria (2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do Bagaço de Malte de Cevada

A caracterização físico-química do bagaço de malte de cevada foi realizada com o objetivo de se determinar as características do substrato e verificar se o mesmo encontrava-se adequado para ser utilizado no processo de fermentação no estado sólido.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos encontram-se expressos na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição físico-química do resíduo úmido cervejeiro

Constituinte	Resultados Obtidos (%)
pH	5,01 ± 0,06
Umidade	76,00 ± 0,86
Carboidratos	67,62 ± 0,59
Proteínas	18,66 ± 0,43
Lipídios	4,29 ± 0,25
Cinzas	2,43 ± 0,61
Fibras	7,19 ± 0,12
Lignina	18,78 ± 0,96

Fonte: Aatoria Própria (2021).

Através Tabela 7 pode-se perceber que o teor de umidade *in natura* foi de 76,00%. O resultado obtido é bastante semelhante ao encontrado por Mathias; Mello; Servulo (2014) que realizaram a composição centesimal do bagaço de malte de cevada e obtiveram teor de umidade de 82,60%. Cordeiro (2012) obteve umidade de 75,45% e Mello (2014) obteve teor de umidade de 77,61%.

De acordo com Ascheri et al, (2007), o bagaço de malte caracteriza-se pelo alto teor de umidade, limitando seu tempo de uso *in natura*, dificultando o seu transporte e armazenamento, além de facilitar o ataque de microrganismos causando a degradação do material.

O teor de carboidratos obtido foi de 74,62%. De Lima e Pinheiro (2018) caracterizaram o bagaço de malte de cevada e obtiveram teor de carboidratos de 65,78%, enquanto De Lima (2019) encontrou 70,58% e Canedo (2015) e de 60%.

Neste estudo, o RUC apresentou 18,66% de proteínas, resultados inferior ao encontrado por Mathias; Mello; Servulo (2014) que obtiveram resultados de 26,89%, porém foram obtidos resultados semelhantes quando comparados aos valores encontrados por De Lima e Pinheiro (2018) e por Canedo (2015) que obtiveram teor de proteína de 16,13% e 17,96%, respectivamente. De maneira geral, o RUC é considerado um material rico em proteínas, sendo possível aplicá-lo em diversos processos biotecnológicos.

O teor de lipídios obtido foi de 4,29%, resultado superior ao obtido por Cassela et al., ([s.d.]) que encontraram teor de lipídeos de 2,06% e coerentes com os resultados obtidos por De Lima (2019) que obteve teor de lipídeos de 4,37%.

Quanto ao teor de cinzas, o valor obtido foi de 2,43%. Cordeiro (2012) obteve teor de cinzas de 1,29% e Canedo (2015) obteve teor de 3,41%.

O teor de fibra bruta obtido neste estudo foi de 7,19%. Diversos autores estudaram o bagaço de malte e obtiveram resultados similares. Canedo (2015) obteve de 9,77%, De Lima e Pinheiro (2018) obtiveram 4,79% e Cordeiro (2012) 3,98%.

O teor de lignina encontrado neste estudo foi de 18,78%. Resultados semelhante (16,50%) foram encontrado por Mendoza (2021) ao caracterizar o RUC para obtenção de inulinase por FES e por Massardi, Massini e Silva (2020) que obtiveram teor 20,80 % de lignina ao realizar a caracterização química do RUC.

Resultados divergentes relacionados a composição do resíduo úmido cervejeiro é bastante compreensível, uma vez que suas características dependerão do solo em que o malte foi cultivado, a época do ano da colheita, além do tipo de cerveja, do processo utilizado em sua produção e dos adjuntos adicionados. O armazenamento incorreto também pode provocar alterações químicas no resíduo, uma vez que pode favorecer o ataque de microrganismos, provocando degradações do produto.

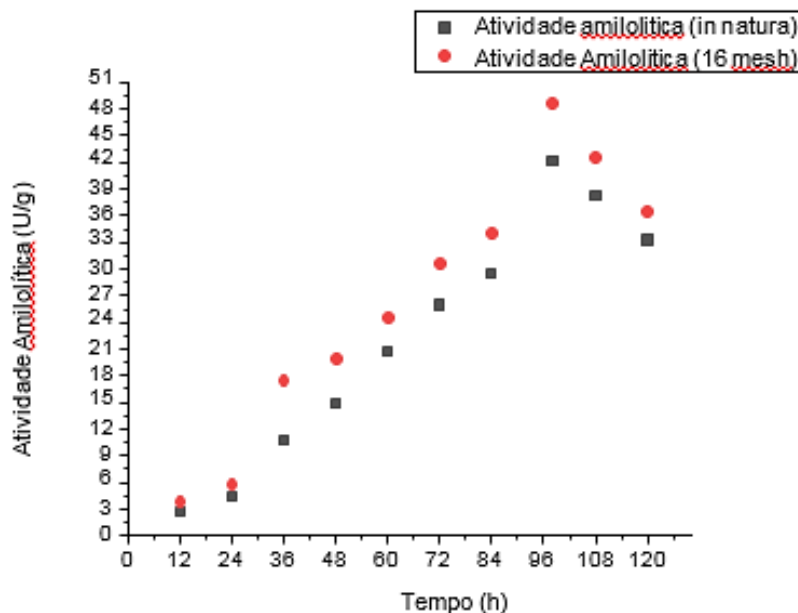
5.2 Fermentação No Estado Sólido

5.2.1 Influência da granulometria na FES

A influência da granulometria foi avaliada através da cinética de fermentação no estado sólido utilizando-se o RUC retido na peneira de 16 mesh Tyler e o RUC sem a separação granulométrica de acordo com o item 4.6.1.

Pela Figura 8 é possível perceber que para ambas as condições testadas, o comportamento foi semelhante, porém a atividade amilolítica (48,56 U/g) apresentou-se cerca de 10% superior para o RUC com granulometria de 16 mesh Tyler, obtendo-se a maior produção em 100 horas de fermentação, sendo este o ponto máximo.

Figura 8 - Influência Granulométrica sobre a Cinética de Fermentação no Estado Sólido



Fonte: Autoria Própria (2021).

A granulometria do meio é um dos fatores mais importantes para o crescimento e atividade antimicrobiana do substrato. O tamanho de partícula visa facilitar a circulação do ar entre a massa e dissipar os gases e calor produzidos,

sendo que a transferência de oxigênio entre as partículas do meio podem tornar-se um problema, quando utiliza-se material com a granulometria elevada (BAKKER, 2017; ISRAEL, 2005).

Normalmente partículas menores fornecem grande superfície de contato com o microrganismo, mas resulta em baixo crescimento do fungo. Em contrapartida, partículas maiores fornecem melhor aeração, troca gasosa e dissipação do calor, mas limitam a superfície de contato para o microrganismo, devendo a melhor condição ser avaliada a cada caso (PANDEY *et al.*, 1999).

Durante a produção de lipase em FES pelo fungo *Penicillium sumatrense*, KRUGER (2017) estudou a influência do substrato Torta de Crambe, em três diferentes granulometrias, 10, 20 e 28 mesh, obtendo a condição ótima com a granulometria de 28 mesh (243,00 U/g) enquanto o menor resultado foi obtido com a granulometria de 10 mesh (101,75 U/g).

5.2.2 Otimização da Produção de Amilase por *Aspergillus niger*

A partir do melhor resultado obtido durante a cinética de fermentação para a análise granulométrica, optou-se por utilizar o RUC com a separação granulométrica de 16 mesh e então realizou-se um planejamento experimental fatorial 3^3 completo com três repetições no ponto central. Os valores obtidos para a atividade enzimática nas diferentes condições de ensaio, encontram-se expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores médios da atividade amilolítica obtidos segundo o planejamento experimental fatorial 3^3 completo.

(contínua)

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Atividade Amilolítica (U/g)
1	4	25	60	35,83 ± 1,32
2	4	28	60	50,94 ± 2,24
3	4	32	60	59,27 ± 1,21
4	4	25	70	103,29 ± 0,68
5	4	28	70	146,04 ± 0,83
6	4	32	70	159,66 ± 0,87
7	4	25	80	91,54 ± 0,61

Tabela 8 - Valores médios da atividade amilolítica obtidos segundo o planejamento experimental fatorial 3³ completo

(Conclusão)

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Atividade Amilolítica (U/g)
8	4	28	80	92,17± 0,80
9	4	32	80	119,62 ± 0,78
10	5	25	60	54,04 ± 2,27
11	5	28	60	59,73± 1,78
12	5	32	60	77,54 ± 1,20
13	5	25	70	162,64 ± 0,96
14 (c)	5	28	70	161,48 ± 0,56
15 (c)	5	28	70	163,03 ± 0,87
16 (c)	5	28	70	165,24± 0,97
17	5	32	70	215,26 ± 0,67
18	5	25	80	100,84 ± 0,72
19	5	28	80	137,97 ± 0,29
20	5	32	80	132,62 ± 0,61
22	6	25	60	57,76 ± 0,70
22	6	28	60	64,11 ± 1,08
23	6	32	60	82,27 ± 0,77
24	6	25	70	178,87 ± 1,33
25	6	28	70	186,36 ± 1,09
26	6	32	70	198,92 ± 0,97
27	6	25	80	121,93 ± 0,57
28	6	28	80	131,56 ± 1,01
29	6	32	80	137,75 ± 1,06

(c) = experimento realizado no ponto central

Fonte: Autoria Própria (2021).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para o planejamento experimental fatorial, com destaque para o melhor resultado obtido no ensaio 17, apresentando atividade amilolítica de 215,26 U/g e a menor atividade amilolítica foi de 35,83 ± 1,32 (U/g) obtida para o experimento 1.

Na literatura, existem diversos estudos sobre a obtenção de enzimas amilolíticas. De Lima (2019), estudou a obtenção de amilase através do bagaço de

malte por *A. niger*, avaliando a influência da umidade e do tempo com a utilização de bagaço de cana como suporte, obtendo melhores resultados (790,75 U/gMs) em 108 horas de fermentação ao utilizar a umidade em seu extremo superior (85%) e 30% de suporte. Em contrapartida, o menor resultado foi de 286,90 U/gMs quando utilizado o resíduo com umidade de 65% e 42% de suporte.

Rodrigues (2021), estudou as variáveis tempo, umidade e agitação para a obtenção da enzima amilase através da FES do RUC utilizando o fungo *A. niger*. O autor estudou a umidade de 50% e 70% obtendo o melhor resultado (15,8 U/mL) com a umidade em 50% em 120 horas de fermentação, sem utilizar agitação.

Determinou-se a significância dos coeficientes das variáveis pelos valores de p e t de Student. A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis e demais cálculos estatísticos para o planejamento estão apresentados na Tabela 9, onde os termos lineares estão indicados pela letra L, os termos quadráticos pela letra Q e os efeitos significativos destacados em vermelho.

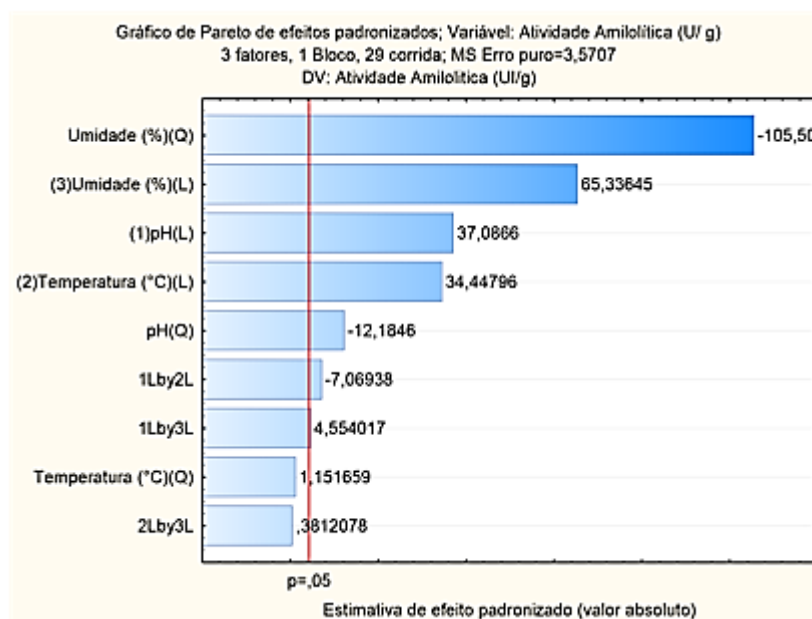
Tabela 9 - Coeficiente de regressão e significância do modelo de regressão para a resposta da atividade amilolítica

	Efeito	Erro Padrão	t(19)	p	Coeficiente	Erro Padrão
Interação	172,727	0,790550	218,490	0,000021	172,7271	0,790550
(1) pH (L)	33,092	0,892283	37,087	0,000726	16,5459	0,446142
pH (Q)	-17,859	1,465683	-12,185	0,006668	-8,9293	0,732841
(2) Temperatura (°C) (L)	30,686	0,890780	34,448	0,000842	15,3428	0,445390
Temperatura (°C) (Q)	1,730	1,501847	1,152	0,368546	0,8648	0,750923
(3) Umidade (%) (L)	58,299	0,892283	65,336	0,000234	29,1493	0,446142
Umidade (%) (Q)	-154,642	1,465683	-105,509	0,000090	-77,3210	0,732841
1L by 2L	-7,686	1,087286	-7,069	0,019428	-3,8432	0,543643
1L by 3L	4,968	1,090978	4,554	0,044989	2,4842	0,545489
2L by 3L	0,414	1,087286	0,381	0,739735	0,2072	0,543643

Fonte: Autoria Própria (2021).

Com o intuito de avaliar o efeito das condições estudadas, utilizou-se o gráfico de Pareto (Figura 9) no qual é possível identificar que os efeitos umidade, pH, Temperatura e as interações entre eles (pH x umidade e Temperatura x Umidade) foram significativos ao nível de 95% de confiança sobre a atividade da enzima amilase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* NCQS 40371.

Figura 9- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados na atividade amilolítica do fungo *A. niger*



Fonte: Autoria própria (2021)

Através da Tabela 9 e Figura 9 observa-se que os fatores lineares pH, temperatura e umidade apresentaram influência de forma positiva, sendo a umidade o fator que mais influenciou no processo fermentativo.

Resultado semelhante foi encontrado por Santana (2012) ao avaliar a obtenção de amilase em farelo de cacau por *A. niger*. O autor avaliou a influência do tempo, temperatura e umidade, indicando que as variáveis temperatura (35°C) e umidade (65%) foram significativas para a FES.

Por meio da análise de variância ANOVA para o planejamento experimental (Tabela 10), foi realizada a validação do modelo polinomial, o qual explica o comportamento da enzima amilase através do coeficiente de regressão a um nível de significância de 5%, a partir do teste F e do coeficiente de correlação (R^2).

O modelo obtido apresentou coeficiente de correlação de R^2 96,00 % e R^2 ajustado de 94,11%, indicando uma correlação adequada para o modelo. Pode-se então descrever empiricamente o modelo matemático para a atividade amilolítica em função das variáveis significativas (Equação 12).

$$\text{Atividade Amilolítica (U/g)} = 172,727 = 16,54 x^1 + 15,34 x^2 + 29,15 x^3 + 2,48 x^1x^3 - 8,93 x^1 - 77,32 x^1x^2 - 3,84x^1x^2 \quad (12)$$

Tabela 10 – ANOVA do planejamento experimental fatorial 3^3 para o modelo de segunda ordem da atividade amilolítica

	SS	df	MS	F	p
(1) pH (L)	4911,20	1	4911,20	1375,42	0,000726
pH (Q)	530,12	1	530,12	148,46	0,006668
(2) Temperatura (°C) (L)	4237,21	1	4237,21	1186,66	0,000842
Temperatura (°C) (Q)	4,74	1	4,74	1,33	0,368546
(3) Umidade (%) (L)	15242,79	1	15242,79	4268,85	0,000234
Umidade (%) (Q)	39749,21	1	39749,21	11132,05	0,000090
1L by 2L	178,45	1	178,45	49,98	0,019428
1L by 3L	74,05	1	74,05	20,74	0,044989
2L by 3L	0,52	1	0,52	0,15	0,739735
Falta de Ajuste	2779,31	17	163,49	45,79	0,021576
Error	7,14	2	3,57		
Total SS	69733,39	28			

Fonte: Autoria Própria (2021).

Através da Tabela 10, verifica-se que as variáveis do efeito linear foram significativas, com exceção da interação umidade x Temperatura, sendo o maior valor de p (0,045) dos efeitos significativos correspondente ao efeito da interação pH x Umidade. No entanto, dentre as variáveis quadráticas, apenas a temperatura não apresentou significância ($p= 0,37$), as demais variáveis quadráticas foram estatisticamente significativas para o modelo, podendo afetar a produção enzimática. A falta de ajuste do modelo foi testada e mostrou-se significativa, todavia, optou-se por escolher o modelo para a representação da FES pois o mesmo obteve bom ajuste aos dados (94,11%).

A significância estatística da equação polinomial foi verificada através da análise de variância (ANOVA), a qual gerou o resultado para o teste F (Tabela 11), sendo o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade (3;25) de 2,99 enquanto o F calculado é de 4,46.

De acordo com Box & Wetz (1973) para uma regressão ser considerada significativa é sugerido que o valor de F_{cal} seja maior que o valor de F_{tab} , portanto, o modelo linear proposto pelo tipo de planejamento utilizado é válido.

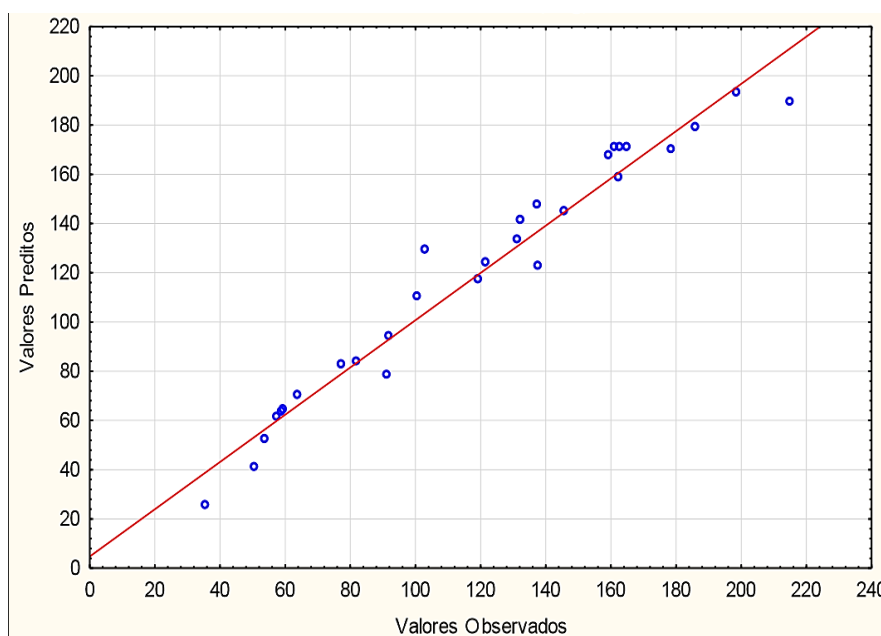
Tabela 11 - Análise de variância obtida para o planejamento completo 3^3 para a atividade amilolítica.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	p- value
Tratamentos	24308,64	3	8102,880	4,459507	0,012174
Resíduo	45424,75	25	1816,990		
Total	69733,39				

Fonte: Autoria Própria (2021).

A Figura 10 representa os valores preditos vs observados, sendo possível verificar que os pontos próximos à reta contínua mostram proximidade entre os dados experimentais e preditos, podendo-se afirmar que o modelo segue uma distribuição normal indicando que há um bom ajuste.

Figura 10 - Valores preditos vs valores observados da atividade amilolítica para o planejamento fatorial 3^3

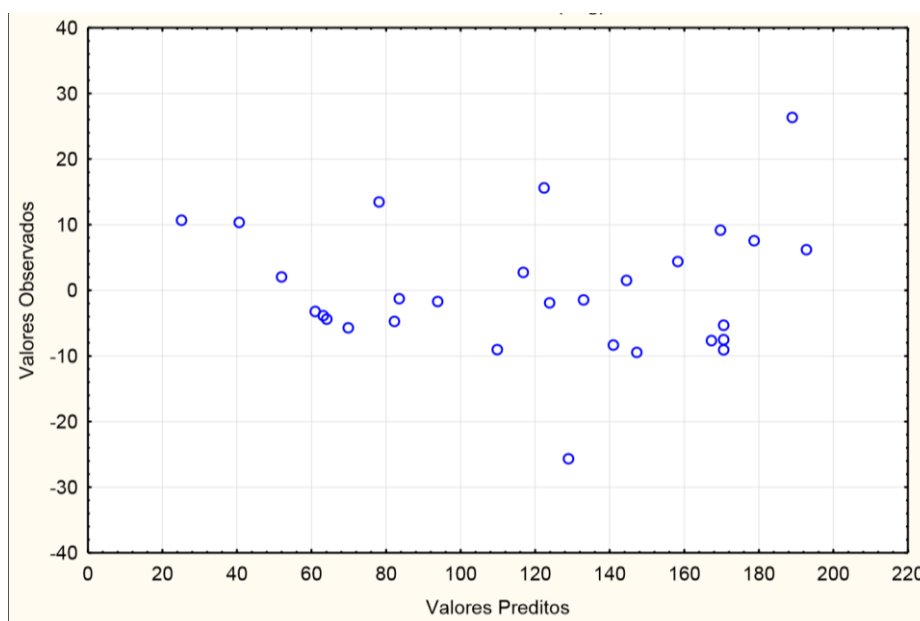


Fonte: Autoria própria (2021)

De acordo com a análise gráfica dos resíduos vs valores preditos (Figura 11) é possível observar a aleatoriedade da distribuição dos pontos, indicando variância constante dos erros. A aleatoriedade na distribuição dos resíduos em torno de zero é esperada, assim como uma relação próxima entre os valores obtidos experimentalmente e os valores teóricos previstos, uma vez que o modelo

apresentou alto valor de R^2 ajustado, indicando que o modelo explica pouco mais de 94% dos resultados.

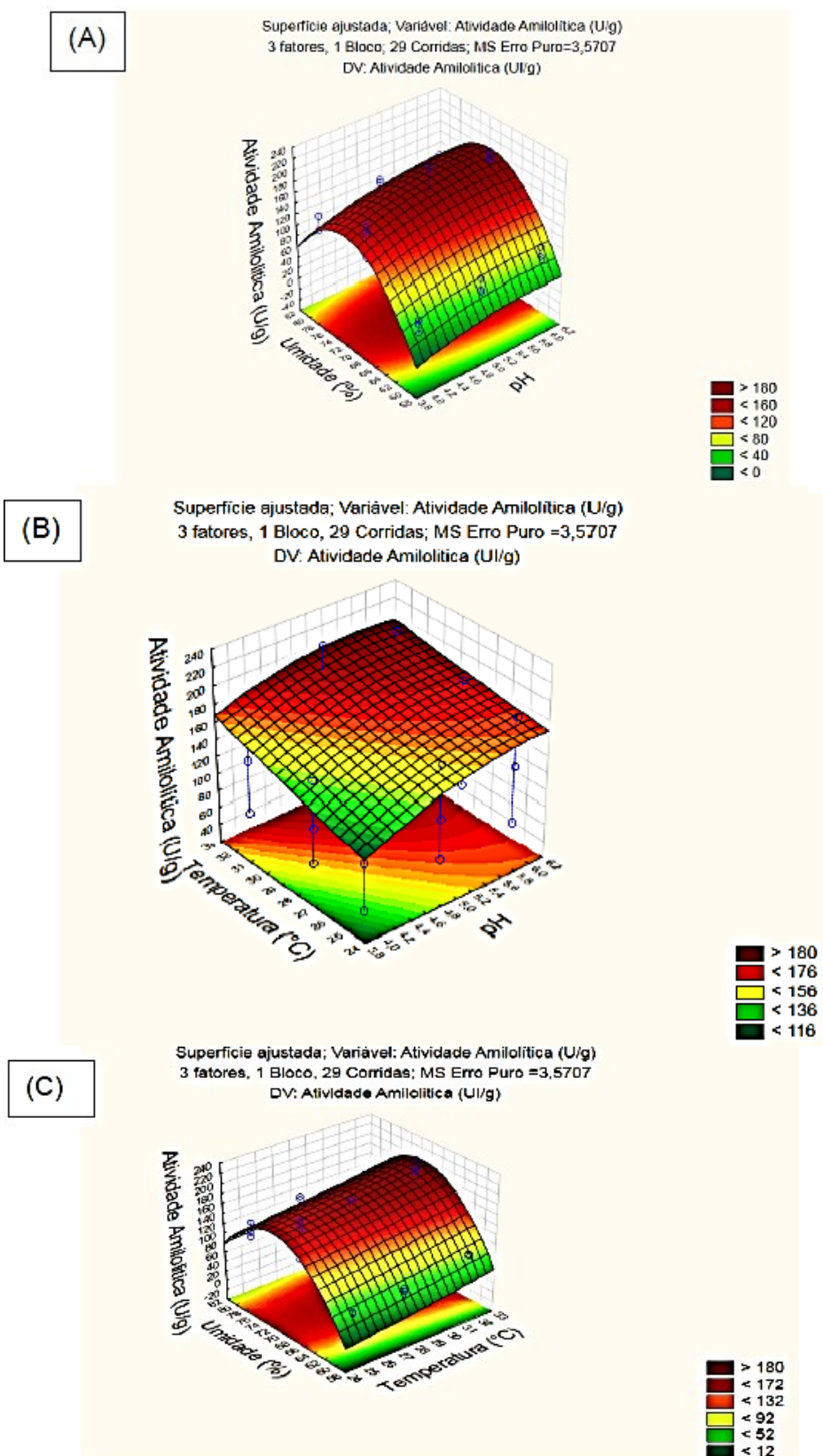
Figura 11 – Gráfico dos resíduos vs. Valores preditos da atividade amilolítica para o planejamento fatorial 3^3



Fonte: Autoria própria (2021)

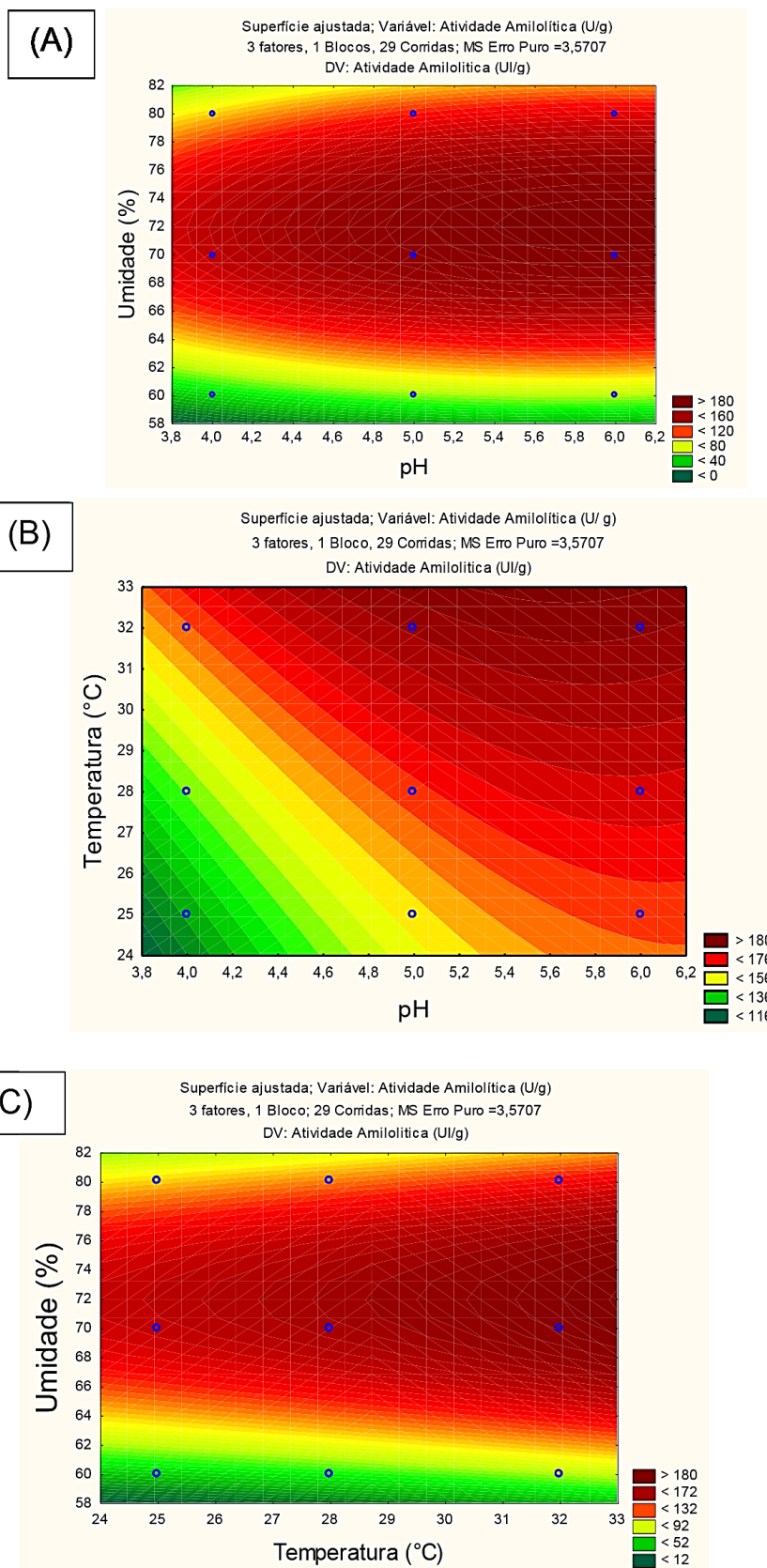
A ferramenta de planejamento experimental e a análise de superfície de resposta permitem a análise da influência das variáveis em determinado processo, a forma de interação entre estas variáveis e a obtenção do valor das variáveis que otimizem os resultados, portanto, realizou-se a análise de superfície de resposta. Os gráficos gerados encontram-se nas Figura 12 (A), (B) e (C) e as curvas de contorno nas Figuras 13 (A), (B) e (C) para as variáveis estudadas pH, temperatura e umidade, assim como suas interações.

Figura 12 - Superfície de resposta para a atividade amilolítica em função: (A) pH e umidade; (B) pH e temperatura; (C) Umidade e temperatura.



Fonte: Autoria Própria (2021).

Figura 13 - Curvas de contorno para a obtenção da enzima amilase em função de:
 (A) pH e umidade; (B) pH e temperatura; (C) umidade e temperatura



Fonte: Autoria Própria (2021).

De acordo com os gráficos de superfície de resposta (Figura 12.A) e as curvas de contorno (Figura 13.A), a atividade amilolítica em função da umidade e do pH é maximizada quando ambos os parâmetros encontram-se no ponto central.

A interação entre temperatura e umidade (Figura 12.B e 13.A), demonstram que a atividade enzimática é maximizada quando a umidade está próxima a 70% e a temperatura encontram-se entre 29 e 32°C. Por fim, a interação entre a temperatura e o pH (Figura 12.C e 13.C) demonstra que a atividade amilolítica alcança seu ponto máximo quando as duas variáveis tendem ao seu ponto extremo superior.

Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES em virtude do elevado grau de interação com componentes da matriz sólida, não havendo água livre no sistema (PANDEY, 2003).

O teor de umidade pode influenciar o rendimento da FES uma vez que o elevado teor de umidade inicial pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também pode ser reduzida, pois o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte afetando seu metabolismo (KRUGER, 2017).

Rodrigues (2021) utilizou o RUC para obter a enzima amilase por FES através do fungo *A. niger* testando através de planejamento experimental a umidade (50 e 70%), tempo de fermentação (72 e 120h) e agitação (100 e 0 rpm), obtendo a melhor atividade enzimática (15,8 U/mL) em 50% de umidade, sem agitação e 120 h.

Em estudo realizado por DE LIMA (2019) ao obter a enzima amilase por FES através do fungo *A. niger* através da metodologia de superfície de resposta, o autor obteve a melhor condição (618,20 U/gMs) com umidade de 80% em 102 horas de fermentação do bagaço de malte por *A. niger* com R² de 82%.

A umidade ótima a ser utilizada em FES tende a variar de acordo com o substrato utilizado, podendo variar de 30 a 85%. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em umidades muito baixas, da ordem de 12%, porém os níveis de umidade relativa variam de 12 a aproximadamente 80%.

A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE et al., 1985),

No presente estudo, a fermentação alcançou valores ótimos utilizando-se o pH em nível intermediário (pH 5,0). De acordo com Djekrif-Dakhmouche et al., (2006), fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, apresentam pH ideal entre 5,0 e 6,0.

O pH pode influenciar no transporte de componentes na membrana celular, sendo um fator crítico para a estabilidade enzimática, apresentando papel importante para a indução morfológica no organismo e na secreção enzimática, sendo o pH ótimo para a enzima amilase, compreendido entre 2 e 12 (KAPOOR et al., 2008; Saranraj e Stella, 2013).

Torres e Da Silva, (2016) obtiveram amilase a partir do bagaço de malte através do fungo *A. niger*. Os autores estudaram a influência do pH na FES e obtiveram melhor atividade enzimática (1,054 g/dL) em pH 5 e 48 horas de fermentação.

Em estudo realizado por Santana (2012) o autor utilizou o fungo *A. niger* para a obtenção de amilase utilizando-se o farelo de cacau, a casca de mandioca e a palma forrageira como substratos. Ao utilizar o farelo de cacau, o autor obteve pH ótimo igual a 7,0. Ao utilizar casca de mandioca e a palma forrageira, o pH ótimo foi igual a 6,0, demonstrando a versatilidade do fungo utilizado.

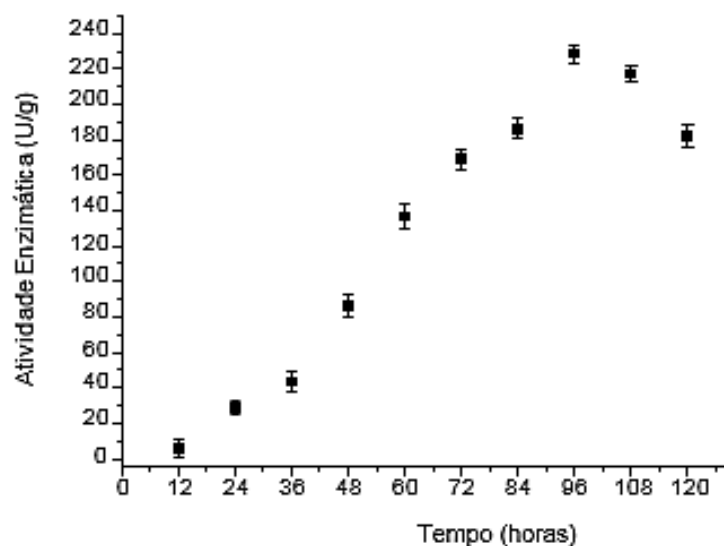
A temperatura foi outro fator que afetou a fermentação no presente estudo. É possível observar pelos gráficos de superfície de respostas e curvas de contorno (Figuras 12 e 13), que ao aumentar a temperatura, a atividade enzimática é maximizada.

A temperatura está relacionada com o transporte de massa e com a transferência de oxigênio, sendo que para crescimento da maioria dos fungos, a temperatura ótima compreende a faixa de 25 a 35°C. Altas temperaturas impõe um efeito adverso na produção das enzimas, visto que as mesmas podem ser desnaturadas, logo, é desejável que a temperatura da fermentação esteja na mesma faixa ótima tanto para o crescimento do fungo como para a produção enzimática (YOON et al., 2014).

5.3 Cinética de obtenção enzimática nas condições otimizadas

A cinética de fermentação no estado sólido foi realizada utilizando-se as condições ótimas encontradas para a obtenção da enzima amilase através do fungo *Aspergillus niger* por meio do planejamento experimental fatorial 3^3 , sendo eles pH 5,0; umidade 70% e 32°C. Os tempos avaliados foram 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas e o resultado obtido encontra-se na Figura 14.

Figura 14 - Cinética da FES para obtenção de amilase por *A. niger* em condições ótimas de fermentação: 70 % de umidade, pH 5,0 e temperatura de 32°C durante 110 horas



Fonte: Autoria Própria (2021).

Pela Figura 14 é possível perceber que a maior produção de amilase foi no tempo de 96 horas, sendo a atividade enzimática de 226,91 U/g. A partir das primeiras 12 horas de fermentação o fungo *A. niger* foi capaz de produzir a enzima amilase, porém iniciou a produção de forma mais expressiva da enzima próximo as 48 horas, tendo seu pico máximo de produção em 96 horas, sugerindo que este é o tempo ótimo de fermentação para obtenção da amilase. Após o tempo de 96 horas é possível observar redução dos valores de atividade amilolítica.

A inibição da produção da enzima amilase pode ocorrer devido a diminuição da fonte de carbono, variações de temperatura, pH, aumento da concentração de açúcares redutores, além da interação com outros compostos que podem ser formados (Gonçalves *et al.* 2011).

Biazus *et al.* (2006) e Santana *et al.* (2012) observaram que a produção de amilase a princípio é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo, apresentando a melhor atividade enzimática também no terceiro dia de fermentação, seguido pela redução da atividade enzimática.

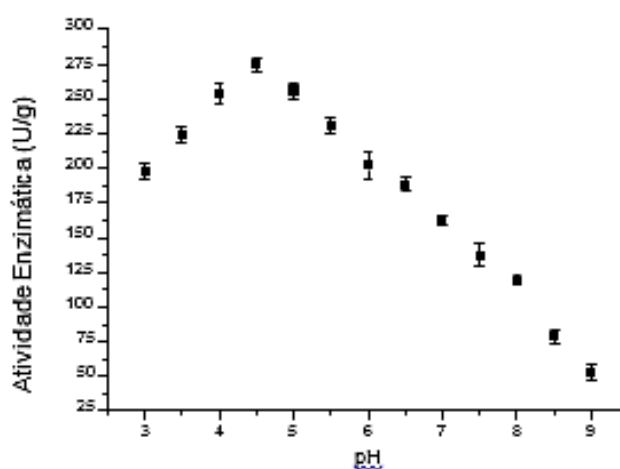
As enzimas são produtos do metabolismo microbiano obtidas em diferentes etapas do crescimento celular, sendo adquiridas durante a fase de crescimento exponencial ou durante a fase estacionária (SANTOS, 2015).

5.4 Caracterização parcial da enzima amilase

5.4.1 Efeito do pH na extração enzimática e avaliação da termoestabilidade

O efeito do pH sobre a extração enzimática e a termoestabilidade do extrato enzimático foram avaliados de acordo com o item 4.8 e os resultados encontram-se expressos nas Figuras 15 e 16 respectivamente, além da Tabela 12.

Figura 15 - Efeito do pH sobre a extração da enzima amilase



Fonte: Autoria Própria (2021).

Através Figura 15 é possível perceber que o pH ótimo obtido foi de 4,5 e atividade enzimática de 274,73 U/g, mostrando que a enzima amilase possui características mais ácidas, sendo este pH bastante próximo ao pH do meio fermentativo (pH 5,0).

A atividade enzimática diminui consideravelmente ao aumentar o pH de extração. Como consequência disso, o menor resultado foi o pH 9,0, o qual obteve-se atividade enzimática de 52,79 U/g.

Mahmood *et al.*, (2018) durante a obtenção da enzima amilase por *A. niger* utilizando como substrato resíduo da casca de frutas, caracterizaram parcialmente a enzima amilase quanto ao seu melhor pH de extração. Os autores avaliaram a extração entre os pH's 4 e 9, obtendo máxima atividade enzimática em pH 6 (2895,02 U/g) havendo redução de atividade enzimática em pH mais básicos.

De Lima (2019) estudou a obtenção da amilase por FES utilizando o bagaço de malte de cevada como substrato através do fungo *A. niger*. Ao caracterizar parcialmente a enzima, o autor obteve o melhor pH de extração de 4,5 (1421 U/gMs) e em pH 9 obteve-se o menor valor de atividade enzimática (31,06 U/gMs).

É possível perceber que na literatura são apresentados para a enzima amilase pH's ótimos na faixa entre 4,5 e 6,5. Pode-se verificar que o pH influencia de duas formas distintas sobre a atividade enzimática. Quando se usam valores de pH próximos do ótimo, podem levar a uma diminuição na atividade da enzima, no entanto estes efeitos são normalmente reversíveis. O uso de valores extremos de pH podem resultar numa perda total de atividade enzimática, tendo como consequência o desenrolamento irreversível da proteína e portanto a sua desnaturação (SILVA, 2012).

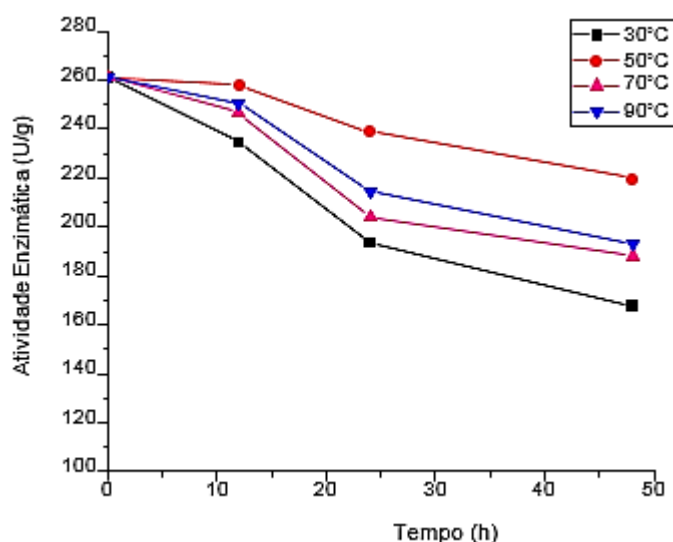
Avaliou-se a estabilidade térmica da enzima amilase utilizando-se o melhor pH de extração obtido previamente, estando os resultados apresentados na Tabela 12 assim como a Figura 16.

Tabela 12- Atividade relativa da enzima amilase durante a determinação da estabilidade térmica (em %)

Tempo (horas)	30°C	50°C	70°C	90°C
12	89,80	97,95	94,36	95,96
24	74,13	87,59	78,02	82,13
48	64,23	80,27	71,95	74,02

Fonte: Autoria Própria (2021).

Figura 16 - Estabilidade térmica da enzima amilase nas temperaturas de incubação de 30°C, 50°C, 70°C e 90°C.



Fonte: Autoria Própria (2021).

A enzima amilase apresentou alta estabilidade térmica nas primeiras 12 horas apresentando entre 89,80% e 97,95% de atividade relativa. A menor atividade relativa (64,23%) foi obtida para a temperatura de 30°C após 48 horas de incubação e a maior atividade observada para a temperatura de 50°C (80,27%).

A termoestabilidade é uma característica desejável para amilases em processos industriais, visto que a hidrólise do amido deve ocorrer em altas temperaturas para obtenção de açúcares simples (GONÇALVES, 2006). Uma possível termoestabilidade limitada afeta o uso dessas enzimas em processos

industriais que necessitem de incubação prolongada a altas temperaturas (LEMOS *et al.*, 2003).

A termoestabilidade das enzimas determina a velocidade do processo, uma vez que condições de temperaturas elevadas aumentam a taxa da reação (LEMOS *et al.*, 2003). A temperatura ótima é aquela na qual são atingidos os máximos níveis enzimáticos e a molécula apresenta uma conformação ideal para sua máxima eficiência catalítica. Uma fração considerável dos processos industriais ocorre em temperaturas elevadas, o que faz da termoestabilidade uma propriedade de grande interesse para aplicação de enzimas em processos industriais (GONÇALVES, 2006).

5.4.2 Efeito do tempo e agitação na extração enzimática

A determinação da agitação e tempo de extração enzimática foi realizada utilizando-se o extrato enzimático obtido nas condições ótimas de fermentação (pH 4,5; 32°C e 80% de umidade). O teste foi conduzido em shaker nas velocidades de 50, 100 e 150 rpm nos tempos de 20, 40 e 60 min, conforme planejamento experimental fatorial 2³ descrito no item 4.10. Os resultados obtidos encontram-se expressos na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios da determinação da influência do tempo e agitação na extração enzimática

Tempo (min)	Agitação (rpm)	Atividade Amilolítica (U/g)
40,00	100,00	110,06
40,00	150,00	94,83
20,00	50,00	42,94
40,00	50,00	53,95
20,00	150,00	63,73
60,00	150,00	199,84
40,00	100,00	106,82
20,00	100,00	75,16
60,00	50,00	147,41
60,00	100,00	208,83
40,00	100,00	109,42

Fonte: Autoria Própria (2021).

Para avaliar os efeitos entre as variáveis tempo e agitação sobre a atividade enzimática, realizou-se o teste estatístico ANOVA (Tabela 14) o qual demonstra que as variáveis tanto quadráticas quanto as lineares, assim como suas interações apresentaram-se significativas ($p < 0,05$). A falta de ajuste não apresentou significância, porém considera-se o teste válido uma vez que o ajuste (R^2) explicou 99,69% do modelo e o R^2 ajustado 99,38%.

Tabela 14 - ANOVA do planejamento experimental fatorial 2^3 para o modelo de primeira ordem da determinação da influência do tempo e agitação da extração enzimática.

	SS	df	MS	F	p
(1) Tempo (min)(L)	23343,84	1	23343,84	7927,859	0,000126
Tempo (min) (Q)	3340,62	1	3340,62	1134,515	0,000880
(2) Agitação (rpm) (L)	2169,80	1	2169,80	736,892	0,001354
Agitação (rpm) (Q)	2480,55	1	2480,55	842,424	0,001185
1L by 2L	250,27	1	250,27	84,996	0,011562
Falta de Ajuste	87,45	3	29,15	9,900	0,093128
Erro Puro	5,89	2	2,94		
Total SS	30471,26	10			

Fonte: Autoria Própria (2021).

A significância estatística da equação polinomial foi verificada através da análise de variância (ANOVA), a qual gerou o resultado para o teste F (TABELA 15), sendo o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com graus de liberdade (2;8) de 4,26 enquanto o F calculado é de 20,59 resultando em modelos preditivos e significativos. Os valores de R e F mostraram que os modelos da Equação 13 é capaz de representar os dados experimentais das variáveis em análise.

$$\text{Atividade amilolítica} \left(\frac{u}{g} \right) = 107,53 + 124,75 t^2 + 72,63 t^2 + 38,03 a^2 + 15,82 a^2 - 62,58 t^2 a^2 \quad (13)$$

Tabela 15 - Análise de variância obtida para o planejamento completo 2³ para a determinação da influência do tempo e agitação sobre a atividade amilolítica.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	p- value
Tratamento	25513,65	2	12756,82	20,58544	0,000701
Resíduo	4957,61	8	619,70		
Total	30471,26				

Fonte: Autoria Própria (2021).

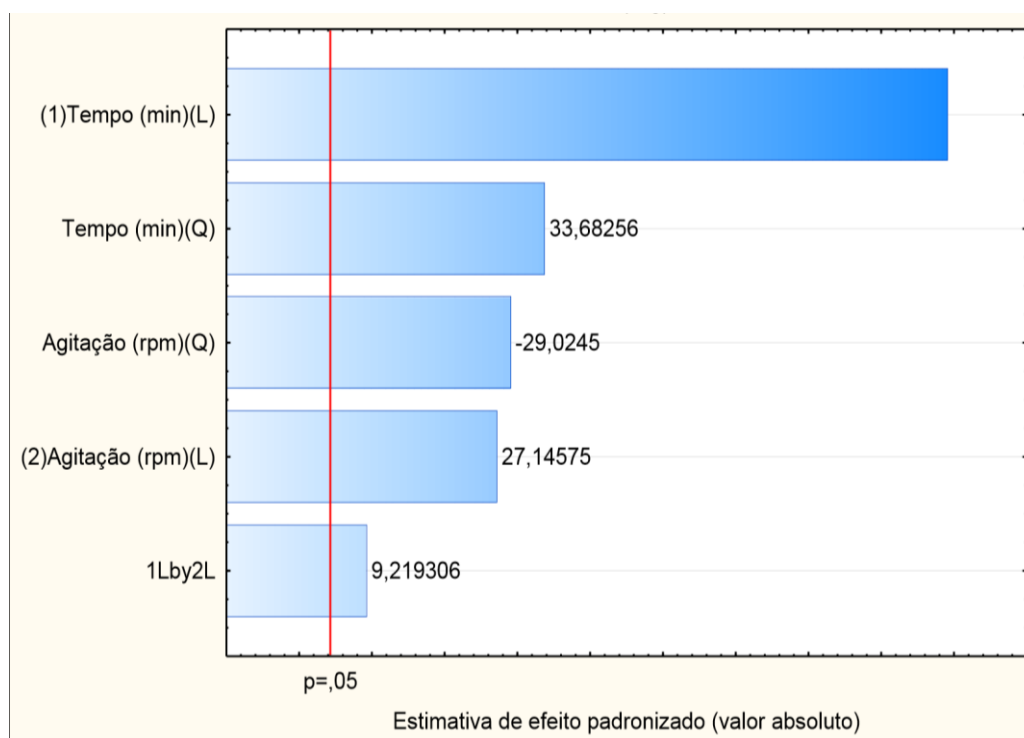
A significância dos coeficientes das variáveis estudadas foi determinada pelos valores de p e t de Student. A estimativa dos efeitos principais e das interações entre as variáveis para o planejamento, estão apresentados na Tabela 16. Com o intuito de avaliar o efeito das condições estudadas, utilizou-se o gráfico de Pareto (Figura 17) no qual é possível identificar que os efeitos tempo e agitação, assim como a interação entre as duas variáveis (agitação vs tempo) foram significativas ao nível de confiança de 95%, sendo que o tempo de agitação apresentou a maior significância.

Tabela 16 - Coeficiente de regressão e significância do modelo de regressão para a determinação do melhor tempo e agitação na resposta da atividade amilolítica

	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p	Coeficiente	Erro Padrão
Interação	107,5326	0,880271	122,1585	0,000067	107,5326	0,880271
(1) Tempo (min)(L)	124,7500	1,401079	89,0385	0,000126	62,3750	0,700539
Tempo (min)(Q)	72,6268	2,156215	33,6826	0,000880	36,3134	1,078108
(2) Agitação (rpm) (L)	38,0333	1,401079	27,1457	0,001354	19,0167	0,700539
Agitação (rpm)(Q)	-62,5832	2,156215	-29,0245	0,001185	-31,2916	1,078108
1L by 2L	15,8200	1,715964	9,2193	0,011562	7,9100	0,857982

Fonte: Autoria Própria (2021).

Figura 17 - Gráfico de Pareto para a determinação da influência do tempo e agitação na extração enzimática

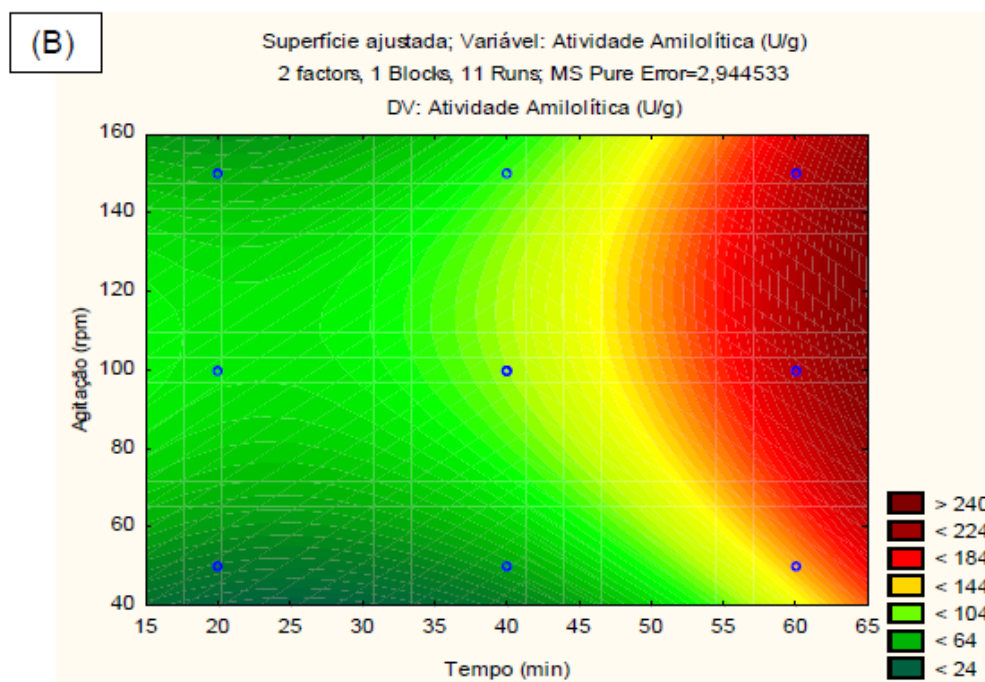
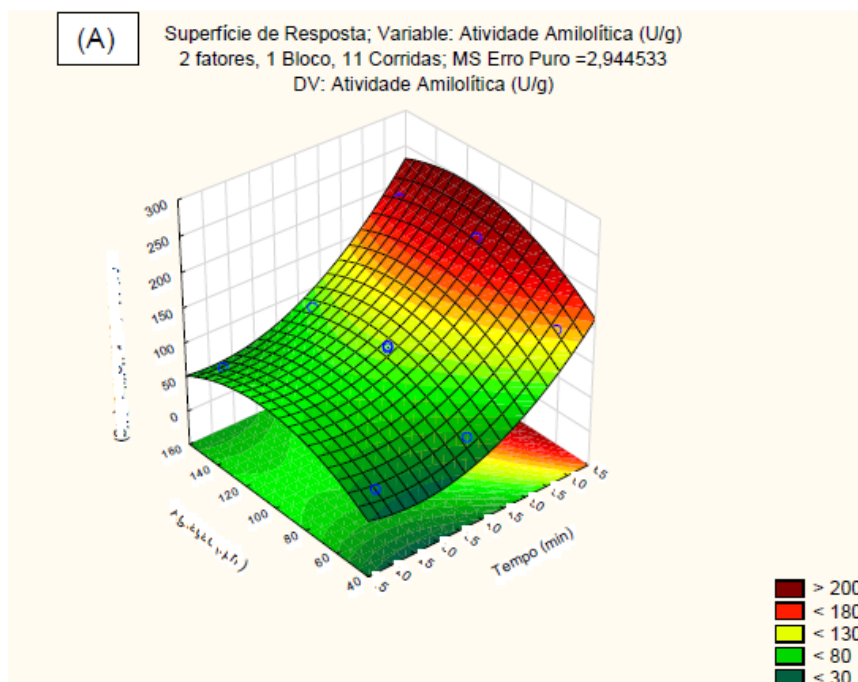


Fonte: Autoria própria (2021)

De acordo com o gráfico de Pareto é possível observar que o tempo e a agitação durante a extração enzimática exercem grande influência na atividade amilolítica. O tempo de extração apresentou efeito positivo, assim como a agitação, indicando que quanto maior o tempo e agitação, maior será a produção de amilase por esse fungo.

Através da análise de superfície de resposta (Figura 18. A) e curva de contorno (Figura 18. B) foi possível determinar a interação entre a agitação e o tempo de extração na atividade enzimática.

Figura 18 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para determinar a influência da interação tempo vs agitação na extração enzimática



Fonte: Autoria própria (2021)

Pelas Figuras 18 (A) e 18 (B) verificou-se que a região de maior atividade enzimática encontra-se em 100 rpm e 60 minutos. Este resultado demonstra que a metodologia utilizada para a extração enzimática durante o planejamento experimental apresenta-se adequada para o fim a que se propõe.

Segundo Castilho *et al* (2000), a eficiência de extração é um fator crítico determinante no balanço econômico para a obtenção de enzimas. O método de extração utilizado mais comumente empregado ocorre pela homogeneização do sólido fermentado em solução tamponada, sendo fatores como tempo de extração e o pH utilizado, os mais impactantes nessa extração, pois afetam a estabilidade enzimática e sua desnaturação (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

Freitas, Castro e Pinto (2010) estudaram a influência da agitação na extração enzimática da protease obtida através da fermentação da torta de canola pelo fungo *Aspergillus oryzae*, demonstrando que agitação (100 rpm) aumentou em 17% a obtenção enzimática em relação a amostra controle (0 rpm).

FELTRIN (2013), estudou a extração da enzima peroxidase extraída do farelo de arroz e de soja, através de um planejamento experimental DCCR 2³ estudando as variáveis tempo, volume e pH, fixando a agitação em 100 rpm. O autor obteve o melhor resultado (91,41 U/mg) em 100 rpm, 60 min e pH 4,7.

Contudo, é preciso ponderar a agitação a ser utilizada, uma vez que é um parâmetro que apresenta influência nos custos operacionais devido a demanda de energia, podendo, em grande escala não ser vantajoso para o processo.

6 CONCLUSÃO

O resíduo úmido cervejeiro (RUC) utilizado como substrato para a obtenção da enzima amilase pelo fungo *Aspergillus niger* NCQS 40371 apresentou-se com características físico-químicas adequadas para a produção enzimática por fermentação no estado sólido.

A análise granulométrica demonstrou que a separação adequada dos grânulos afeta positivamente o rendimento da fermentação, sendo que o substrato retido na peneira de 16 mesh apresentou melhores resultados quando comparados ao substrato sem separação granulométrica.

O planejamento experimental fatorial completo 3^3 foi realizado e através de análise estatística foi possível determinar que a maior obtenção da atividade enzimática (215,26 U/g) foi obtido para a umidade de 70%, pH 5,0 e 32°C, sendo que as variáveis testadas, temperatura, umidade e pH apresentaram influência significativa no processo fermentativo. Os valores preditos e experimentais encontram-se próximos, indicando bom ajuste do modelo.

O estudo cinético da condição ótima encontrada demonstrou que em 100 horas de fermentação obteve-se a atividade enzimática máxima (226,9 U/g) havendo decaimento logo após seu ponto máximo de fermentação.

Com relação ao pH ótimo, o extrato enzimático apresentou caráter ácido, sendo que 4,5 foi o melhor pH encontrado, apresentando atividade enzimática de 274,73 U/g. O pH que apresentou menor atividade (52,79 U/G) foi o pH 9,0.

Utilizando-se o melhor pH obtido, estudou-se a termoestabilidade do extrato enzimático, apresentando boa estabilidade térmica (50°C), característica desejável para enzimas fúngicas.

A interação entre o tempo de extração e a agitação apresentaram-se significativas. O melhor resultado (208,09 U/g) obtido foi de 100 rpm em 60 minutos.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, comparados com os disponíveis na literatura, pode-se concluir que o RUC apresenta-se como um bom substrato a ser utilizado em FES para obtenção enzimática.

7 REFERENCIAS

AFONSO, L. C. **Produção de Celulases Por Cultivo Em Estado Sólido E Aplicação Na Hidrólise De Bagaço de Cana-De-Açúcar**. 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo, 2012.

BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da Produção e Aplicação de Enzimas Utilizando Resíduo Farelo de Trigo Como Substrato por Fermentação em Estado Sólido**. 2017. 141f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

BEWLEY, J. D. et al. Structure and Composition. In: BEWLEY, J. D. et al. (Orgs.). **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York: Springer, 2013. p. 1-25.

BRASIL. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, p. 1–9, 2003.

BUTTON, S. T. **Metodologia Para Planejamento Experimental E Análise De Resultados**. Campinas, SP: 2012. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila2012.pdf>> Acesso em 20 nov 2020.

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*)**. 2015. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

CASELLA, G. S. et al. **Reaproveitamento Do Bagaço De Malte Na Industria Alimentícia**. 2020. Disponível em: < <http://docplayer.com.br/145544654-Reaproveitamento-do-bagaco-de-malte-na-industria-alimenticia.html>> Acesso em 18 nov 2020.

CAVALCANTE, P. A. W. et al. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, p. 1–9, 2018.

CORDEIRO, L. G. Caracterização Do Bagaço De Malte Oriundo De Cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1981–8203, p. 2–4, 2012.

COSTA, T. M. et al. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419–427, 1 abr. 2017.

DA SILVA, B. C. **Biossorção Do Corante Amarelo Reafix B8g A Partir Do Bagaço De Malte Em Batelada E Sistema Contínuo: Avaliação Experimental E Simulação**

Fluidodinâmica Computacional. 2019. 173f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa. 2019.

DE LIMA, R. C. F. **Produção Da Enzima A-Amilase Por *Aspergillus Niger* Em Fermentação No Estado Sólido Utilizando Bagaço De Malte De Cevada**. 2019. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, 2019.

DE LIMA, R. C. F.; PINHEIRO, I. R. **Production Of Amylolytic Enzymes By *Aspergillus Niger* In Solid- State Fermentation Using Barley Malt Bagasse** .,IN. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia CONTECC'. Maceió. 2018.

DOS SANTOS, E. A. L. et al. Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix. **Acta Scientiarum**, v. 39, p. 1–8, 2017.

EICHLER, P. **Cultivo Em Estado Sólido De *Aspergillus Brasiliensis* Em Bagaço De Malte Para Produção De Lipases**. 2018, 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da Peroxidase para a degradação de Deoxinivalenol**. 2013. 125f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2013.

FERREIRA, M. S. B. **Elaboração De Biscoito Integral Empregando Resíduo Da Indústria Cervejeira Na Formulação**. 2017. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

FREITAS, A. C. DE; CASTRO, R. J. S.; PINTO, G. A. Estudo das Condições de Extração de Protease em Processo Fermentativo Semi-Sólido. **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 6569–6574, 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GUANDALINI, N. C. **Estudo Da Produção De Enzimas Amilolíticas Pelo Fungo *Metarhizium anisopliae* Utilizando Resíduos Amiláceos Como Substrato**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ISRAEL, C. M. **Utilização Do Resíduo Do Processamento Do Palmitero Para A Produção De Enzimas Hidrolíticas Por Fungos Do Gênero *Polyporus***. 2005. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

KRUGER, C. **Síntese Enzimática de Éster do Biodiesel A Partir de Lipases Fúngicas de *Penicillium sumatrense* Produzidas por Fermentação No Estado Sólido**. 2017. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual Do Oeste do Paraná, Toledo, 2017.

LUTZ, I. A. (São Paulo-SP). **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**. IV ed. São Paulo, 2008.

MAHMOOD, S. et al. Partial Characterization of alfa-amylase Produced from *Aspergillus niger* using Potato Peel as Substrate. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 33, n. 1, p. 21–27, 2018.

MAIONE, N. R. **Pré-Tratamento Hidrotérmico Do Bagaço De Malte (Bsg) Visando A Produção De Etanol De Segunda Geração**. 2019. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

MANERA, A. P. et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, p. 155–161, 2011.

MASSARDI, M.M., MASSINI, R.M.M., SILVA, D.J. Caracterização Química do Bagaço de Malte e Avaliação do Seu Potencial para Obtenção de Produtos de Valor Agregado. **The Journal of Engineering and Exact Sciencies**. Vol 06, N.1 (2020).

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M. DE; SERVULO, E. F. C. Caracterização De Resíduos Cervejeiros. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Florianópolis, SC 2014, 8p.

MELLO, L. R. P. F.; VERGÍLIO, R. M.; MALI, S. Caracterização Química e Funcional do Resíduo Fibroso da Indústria Cervejeira. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 191–194, 2013.

MELLO, V. S. DE A. **Determinação da composição do bagaço do malte de cevada e estudo das suas potenciais aplicações**. 2014, 82f. Monografia (Graduação em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

MÉLO, B. C. A. DE et al. Avaliação Do Resíduo Agroindustrial De Acerola Para Produção De Celulases Por Fermentação Em Estado Sólido. **COBEQ**. p. 2041–2048, 2014.

MENDOZA, S.L.Y. **Estudo da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido utilizando como substrato o Resíduo Úmido Cervejeiro e o Melaço de cana-de-açúcar**. 116f. (Dissertação). Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2021.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação De Proteína Bruta-Método Kjeldahl Modificado**. Brasília, DF, 2014, 4p.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções Do Agronegócio. Brasil 2014/15 A 2024/25. Projeções De Longo Prazo**. p. 133, jul. 2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto N°6.871, De 4 De Junho DE 2009**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/decreto-no-6-871-de-4-de-junho-de2009.pdf>>.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264–1275, 2014.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Leninger**. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 1–21, 2012.

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

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Embrapa Comunicado Técnico**, v. 102, p. 1–5, 2005.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de Bioprocesso Em Escala Semipiloto Para Produção de Ácido Cítrico Por Fermentação No Estado Sólido A Partir D Bagaço de Mandioca**. 2002. 96f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento De Bioprocesso Para Produção De Ácido Cítrico Por Fermentação No Estado Sólido Utilizando Polpa Cítrica**. 2006. 107f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RODRIGUES, E. M. G. Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. **Bioenergia em Revista: Diálogo**, n. 11, p. 46–57, 2021.

SALIHU, A. et al. Agricultural residues for cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger*: effects of pretreatment. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 1101–1106, 1 dez. 2015.

SANT'ANNA JR, G. L. Produção de Enzimas Microbianas. In: EDGARD BLUCHER LTDA (Ed.). **Biotecnologia Industrial Vol. III**. [s.l: s.n.]. p. 125–154.

SANTANA, R. S. M. **Produção De Enzimas Amilolíticas Através Da Fermentação Em Estado Sólido**. 2012. 73f. Dissertação (Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SANTOS, L. M. **Farelo De Soja E Farelo De Milho Como Substratos Na Produção De Amilase E Protease Por *Bacillus Amyloliquefaciens* MO.04b**. 2015. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

SANTOS, S. F. DE M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148f. Tese

(Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANTOS, S. L. **Produção e Purificação de Frutossiltransferase por *Aspergillus flavus* Utilizando Borra de Café (*Coffea* sp.) Através da Fermentação em Estado Sólido**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica**. V.2 ed. Editora Edgard Blücher LTDA. 2001.

SILVA, T. A. DE L. **Estudo da Estabilidade da Enzima Bromelina Extraída do Curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith)**. 2012, 99f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of Poly (hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 173–181, 2015.

SINGH NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. **Springer Science Business Media B.V. 2009s**, n. July, p. 1–466, 2009.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, Purificação Parcial E Caracterização Bioquímica De Glucoamilase De *Aspergillus Niger* Obtida Por Fermentação Em Estado Sólido**. 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOCOL, C. R. et al. Breeding And Growth Of *Rhizopus* In Raw Cassava By Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 330–336, 1994.

DOS SANTOS, P.S et al. Fermentação Em Estado Sólido Em Resíduos Agroindustriais Para a Produção De Enzimas: Uma Revisão Sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181–0188, 10 jul. 2018.

SPIER, M. R. **Produção De Enzimas Amilolíticas Fúngicas A-Amilase E Amiloglicosidase Por Fermentação No Estado Sólido**. 2005. 178f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TORRES, B. H. C.; DA SILVA, M. A. B. Determinação da Atividade Enzimática de Extrato Bruto Obtido por Fermentação em Estado Sólido de Bagaço de Malte por *Aspergillus Niger*. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 15, p. 7–19, 2016.

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