



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE AMILASES PRODUZIDO POR *Aspergillus* sp. FSDE16  
EM BAGAÇO DE MALTE

LUCAS ALBUQUERQUE ARAÚJO

João Pessoa – PB  
2018

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE AMILASES PRODUZIDO POR *Aspergillus* sp. FSDE16  
EM BAGAÇO DE MALTE

Lucas Albuquerque Araújo

Orientadora: Sharline Florentino de Melo Santos

Trabalho Final de Curso, apresentado como exigência do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de bacharel em **Engenharia Química.**

João Pessoa – PB

2018

A663c Araujo, Lucas Albuquerque.

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE AMILASES PRODUZIDO POR  
Aspergillus sp. FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE / Lucas  
Albuquerque Araujo. - João Pessoa, 2018.

34 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.  
Monografia (Graduação) - UFPB/Tecnologia.

1. Aspergillus sp. 2. Enzimas. 3. Amilase. I. Santos,  
Sharline Florentino de Melo. II. Título. |

UFPB/BC

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE AMILASES PRODUZIDO POR *Aspergillus* sp. FSDE16  
EM BAGAÇO DE MALTE

Lucas Albuquerque Araújo

Orientadora: Sharline Florentino de Melo Santos

Trabalho Final de Curso, apresentado como exigência do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de bacharel em **Engenharia Química.**

Data da aprovação: 05/11/2018

BANCA EXAMINADORA

---

**Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB**  
(Orientadora)

---

**Profa. Dra. Ana Flávia Santos Coelho– DEQ/CT/UFPB**  
(Avaliadora)

---

**Felipe Augusto Santos– DEQ/CT/UFPB**  
(Avaliador)

*Só se enxerga o bem com o coração, o essencial é invisível para os olhos.*

*Antoine de Saint-Exupéry*

**Agradecimentos**

Aos meus pais Simone e Arnaldo por todo o suporte desde sempre, sendo a base para eu ter me tornado o que sou hoje.

Ao meu avô Everaldo por ser o meu maior exemplo de vida

À Sharline por ser uma excelente professora e orientadora.

À minha namorada Bruna Marinho pela presença e amor em todos os momentos de alegrias e tristezas durante o curso.

Aos meus irmãos Fillipe e Jonas por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos Thiago, Thialle, Danilo e Victor que fizeram parte dessa jornada que se chama Engenharia Química.

Aos meus amigos de longa data Kaio e Rafael.

Aos estudantes e pesquisadores do Laboratório de Bioengenharia, em particular a Bruno Carvalho por todo o auxílio nos procedimentos experimentais.

## RESUMO

O Brasil possui grande quantidade de bagaço de malte disponível no mercado com baixo custo, o bagaço de malte pode ser utilizado como suporte e fonte de nutrientes para microrganismos que produzem enzimas em processos de cultivo em estado sólido. Enzimas são componentes orgânicos capazes de catalisar reações químicas. A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, quando comparadas a catalisadores químicos, apresentam uma característica importante que é a especificidade pelo substrato e em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato. Espécies do gênero *Aspergillus* tem sido utilizados para a produção de enzimas. Diante disso, este trabalho realizou o cultivo do *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte com umidade de 70% utilizando dois tipos de solução de umidificação: solução de sais (sulfato de amônio a 3,3 g/L, fosfato de potássio a 1,5 g/L) e apenas água. Os melhores resultados de atividade foram obtidos com solução de umidificação com sais, as 120h de cultivo com valores de CMCase 13,786 U/g, FPase 0,761 U/g e Amilase 18,336 U/g. A melhor faixa de pH para a atividade de amilase foi entre 4,5 e 5 e a melhor temperatura para atividade de amilase foi de 70°C. Dessa forma o fungo *Aspergillus* sp. FSDE16 apresentou capacidade de produção de enzimas em bagaço de malte.

**Palavras Chave:** *Aspergillus* sp, Enzimas, Amilase

## ABSTRACT

Brazil has a large quantity of malt bagasse available in the market with low cost, malt bagasse can be used as support and source of nutrients for microorganisms that produce enzymes in solid state cultivation processes. Enzymes are organic components capable of catalyzing chemical reactions. Enzymatic technology is today one of the most promising fields within the new technologies for the synthesis of high added value compounds, when compared to chemical catalysts they have an important characteristic that is the substrate specificity and to promote only a biochemical reaction with its substrate. Species of the genus *Aspergillus* have been used for the production of enzymes. Therefore, this work carried out the cultivation of *Aspergillus* sp. FSDE16 in 70% moisture malt bagasse using two types of humidification solution: (3.3 g/L ammonium sulfate, 1.5 g/L potassium phosphate) and water only. The best activity results were obtained with humidification solution with salts, the 120h culture with CMC<sub>case</sub> values 13.786 U/g, FPase 0.761 U/g and Amylase 18.336 U/g. The best pH range for amylase activity was between 4.5 and 5 and the best temperature for amylase activity was 70 °C. In this way the fungus *Aspergillus* sp. FSDE16 presented malt bag enzyme production capacity.

**Key words:** *Aspergillus* sp, Enzymes, Amylase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16 em placa de Petri.....	18
Figura 2-Bagaço de malte usado nos cultivos.....	20
Figura 3 - Bagaço de malte esterilizado pronto para inoculação.....	21
Figura 4 - Atividade enzimática para cultivos com e sem sais.....	25
Figura 5 - Atividade enzimática durante 240h de cultivo.....	26
Figura 6 - Crescimento do cultivo em 48h.....	27
Figura 7 - Crescimento do cultivo em 72h.....	27
Figura 8 - Crescimento do cultivo em 96h.....	27
Figura 9 - Crescimento do cultivo em 120h.....	27
Figura 10 - Crescimento do cultivo em 240h.....	27
Figura 11 - Atividade enzimática com diferentes pH.....	28
Figura 12 - Atividade enzimática com diferentes temperaturas.....	29

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	11
2- OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral .....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Cultivo em estado sólido (CES).....	14
3.1.1 Umidade .....	14
3.1.2 Temperatura .....	15
3.1.3 pH.....	15
3.1.4 Aeração.....	15
3.2 Produção de enzimas a partir de fungos .....	15
3.3 Amilases.....	16
4- METODOLOGIA .....	18
4.1 Microrganismo.....	18
4.2 Cultivo .....	19
4.3 Atividade enzimática .....	22
4.3.1 Atividade de Amilase .....	22
4.3.2 Atividade CMC <sub>ase</sub> e FP <sub>ase</sub> .....	23
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1 Avaliação da solução de umidificação do bagaço de malte.....	25
5.2 Cinética de produção de amilases .....	26
5.3 Caracterização da amilase produzida em relação ao pH.....	28
5.4 Caracterização da amilase produzida em relação a temperatura .....	29
6- CONCLUSÃO .....	30
7- REFERÊNCIAS .....	31

## 1- INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da Kirin Beer University (2015), o consumo de cerveja no mundo em 2014 chegou a aproximadamente 189,06 bilhões de litros, o Brasil foi o terceiro país que mais consumiu cerveja no ano, tendo 7% na quota de mercado global e apresentando valor total de consumo de 13,146 bilhões de litros de cerveja, os países que mais consumiram cerveja foram a China e os Estados Unidos com um consumo de 44,853 e 24,172 bilhões de litros de cerveja respectivamente.

O processo inicial da fabricação de cervejas gera o resíduo bagaço de malte (CORDEIRO, EL-AOUAR e GUSMÃO,2012). O bagaço do malte é um dos principais subprodutos da indústria cervejeira e pode ser encontrado disponível durante o ano todo em grandes quantidades e a um baixo custo (MUSSATTO, DRAGONE e ROBERTO,2006). Este bagaço é obtido a partir do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído e dos adjuntos, os quais após a filtração resultam num resíduo que é destinado para ração animal (AQUARONE,E. et al. 2001).

O bagaço de malte é o principal subproduto do processo cervejeiro, a cada 100 litros de cerveja produzida são gerados em média entre 14 a 20 kg de bagaço (CORDEIRO, EL-AOUAR e GUSMÃO, 2012). Devido ao grande consumo e produção de cerveja no Brasil o bagaço de malte pode ser encontrado facilmente no mercado com baixos custos e tanto em pequenas quanto em grandes quantidades, podendo ser comprado a cerca de R\$ 0,20 centavos o quilograma ou comprado a cerca de R\$ 175 reais a tonelada encontrados na MFRURAL.

O bagaço de malte pode ter diversas aplicações como alimentação e nutrição animal, produção de energia por queima direta ou por produção de biogás via fermentação anaeróbia, produção de carvão vegetal, cultivo de microrganismos e obtenção de bioprodutos entre outras aplicações (MATHIAS, MELLO e SERVULO, 2014).

Pelas características o bagaço do malte pode ser utilizado como suporte e fonte de nutrientes para microrganismos que produzem enzimas em processos de cultivo em estado sólido (ALEIXO JÚNIOR, 2018). A utilização desse meio de cultivo é uma alternativa de aproveitamento do bagaço do malte e pode reduzir o custo de produção enzimática (WANG, SAKODA e SUZUKI, 2001)

A obtenção de enzimas, na maioria dos processos, ocorre a partir de microrganismos devido à facilidade e o controle operacional via cultivo tendo os fungos como principais microrganismos para a produção de enzimas (ORLANDELLI et al., 2012). No setor industrial

as enzimas mais utilizadas são as proteases as quais ocupam 40% do mercado, seguidas das amilases e celulasas (SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C, 2001). As amilases englobam entre 25% a 33% do mercado com diversas aplicações industriais (RAVINDAR e ELANGO VAN, 2013).

O presente estudo tem o intuito de avaliar a produção de enzimas com foco na amilase em um sistema de cultivo sólido utilizando o *Aspergillus* sp. FSDE16 e o bagaço de malte como meio de cultivo.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a cinética de produção da amilase por *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de amilases utilizando bagaço de malte como meio de cultivo com diferentes soluções de umidificação.
- Determinar a melhor hora de cultivo para a produção de amilase pelo por *Aspergillus* sp. FSDE16 ao longo de 240 horas.
- Fazer a caracterização da amilase produzida em relação ao pH e temperatura de maior atividade enzimática.

### **3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Cultivo em estado sólido (CES)**

O cultivo em estado sólido (CES) é o processo de crescimento de microrganismos em substratos sólidos com baixa quantidade de água livre, essa água encontra-se ligada a fase sólida dessa maneira formando uma fina camada na superfície das partículas (ROCHA, 2010).

Dos parâmetros existentes que influenciam o processo a água tem destaque no CES devido ao seu acentuado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS E MOLIN, 2003).

Desde 3000 a.C na China e em 1000 a.C no Japão e sudoeste da Ásia já eram reportados o uso do molho de soja (ARAÚJO, 2004). Podendo concluir que o cultivo em estado sólido já é utilizado há muito tempo.

O CES é um processo vantajoso para a produção de enzimas por fungos filamentosos (ALEIXO JÚNIOR, 2018). Esse tipo de processo apresenta condições de crescimento que se aproximam as do habitat natural de fungos, dessa forma facilitando o crescimento dos mesmos no substrato sólido e conseqüentemente uma produção de grandes quantidades de enzimas (ROCHA, 2010).

Os processos de cultivo em estado sólido necessitam das etapas de seleção da matéria-prima ou substrato, escolha de um microrganismo específico, controle dos parâmetros de cultivo e separação e/ou purificação dos produtos (GUTIERREZ-ROJAS et al, 1998). Os fatores considerados mais importantes no processo são: umidade do meio de cultivo, temperatura, pH e aeração.

**3.1.1 Umidade:** O papel da água no CES é primordial devido ao seu encargo da difusão de solutos, metabólitos inibitórios, gases e absorção celular. Rocha (2010) afirma que a umidade do substrato é um dos fatores que tem maior influência no processo e é variável de acordo com a natureza do substrato. Níveis de umidade muito elevados resultam em diminuição da porosidade, elevação do risco de contaminação, baixa difusão de gases como oxigênio, redução do volume de gás e de trocas gasosas, já níveis de umidade reduzidos podem levar a um crescimento menor em comparação ao ótimo crescimento possível para aquele substrato específico (LOSANE et al., 1985).

**3.1.2 Temperatura:** O cultivo em estado sólido é caracteristicamente exotérmico apresentando grandes quantidades de calor liberadas as quais são diretamente proporcionais a atividade metabólica do microrganismo (ROCHA, 2010).

**3.1.3 pH:** Devido a heterogeneidade do CES o pH não é facilmente controlado mesmo sendo um fator relevante ( PANDEY, 2003). Dessa forma como uma tentativa de evitar variações bruscas do pH é interessante a utilização de substratos que apresentem uma elevada capacidade tamponante ou uma adição na etapa de umidificação de soluções-tampão ao substrato (DEL BIANCHI, MORAES, CAPALBO, 2001).

**3.1.4 Aeração:** A aeração tem como funções básicas: eliminar dióxido de carbono formado, regulação da temperatura do substrato, ajuste do nível de umidade e manter condições aeróbicas (CORREIA, 2004). Existem diferentes maneiras de promover aeração do substrato proporcionando uma melhor transferência de oxigênio, dentre elas: utilização de material poroso, utilização de bandejas perfuradas, agitação do substrato, adição de ar forçado dentro do reator, entre outros (DEL BIANCHI, MORAES, CAPALBO, 2001).

## **3.2 Produção de enzimas a partir de fungos**

Industrialmente enzimas de origem microbiana tem um grande potencial devido a possibilidade de serem produzidas em ampla escala (SENA et al. 2006).

O reino *Fungi* apresenta um potencial elevado de aplicação em pesquisas, os fungos são microrganismos heterotróficos, podem existir como saprófitos, como parasitas ou simbiontes, para sobreviver absorvem nutrientes a partir de substratos (ALEIXO JÚNIOR, 2018). Por serem um dos principais decompositores de matéria orgânica os fungos estão sendo usados como fonte preferencial para a produção de enzimas (CORRÊA et al. 2014).

Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* tem sido utilizados para a produção de enzimas (GAUTAM, KUMAR e DUTT, 2016). Normalmente enzimas produzidas pelos microrganismos citados estão associadas à degradação de polissacarídeos de plantas como celulose, hemicelulose, amido e outros carboidratos (SAINI, SAINI e TEWARI, 2015).

O gênero *Aspergillus* é um dos mais comuns entre os fungos filamentosos e também um dos mais estudados, as espécies desse gênero podem ser encontradas na superfície, no ar e na água tanto em animais quanto em vegetais e associados a deterioração de materiais orgânicos principalmente em regiões de clima tropical (ROCHA, 2010).

Rosa, Campos e Baroni. (2002) declarou que a taxonomia reconhece 150 espécie do gênero todavia apenas 30 são bem definidas e facilmente distinguíveis. As colônias

inicialmente são brancas, amarelas e passam para uma coloração marrom ou negra (ROCHA, 2010).

É possível classificar *Aspergillus* sp a partir da classificação de Couri, (1993) dessa forma temos: Reino Fungi; Divisão Eumycota; subdivisão Deuteromycotina; Classe Hyphomycetes; Ordem Moniliales; Família Moniliaceae; Gênero *Aspergillus*; Espécie sp.

Rocha (2010), cita diversas classes de enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* com relevância comercial como celulase, lactase, protease, amilase e diversas outras enzimas.

### 3.3 Amilases

Enzimas são componentes orgânicos capazes de catalisar reações químicas. A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Comparadas a catalisadores químicos convencionais apresentam uma característica que é a especificidade pelo substrato e também promovendo somente uma reação bioquímica com seu substrato (ROCHA, 2010).

Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis, além disso podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem e provocam o desgaste de materiais (ROCHA, 2010).

As amilases começaram a ser produzidas no começo do século XX em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos (ROCHA, 2010).

O amido é o principal polissacarídeo de reserva do reino vegetal, com destaque para as produções mais importantes economicamente, como o trigo, o arroz, milho, mandioca e batata (ALEIXO JÚNIOR, 2018).

Em relação ao seu modo de ação as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases, as quais catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 de maneira aleatória no interior da molécula de amido gerando oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias, e as exoamilases, as quais hidrolisam sucessivamente ligações glicosídicas e partir da extremidade não redutora das mesmas, resultado em produtos finais pequenos (ROCHA,2010; GUPTA et al, 2003).

No setor industrial as mais utilizadas são as proteases, que ocupam 40% do mercado de enzimas, seguidas das carboidrases (amilases e celulasas) e lipases (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001). As amilases podem atuar em diversos setores industriais como na indústria de produção de detergentes na etapa de remoção de manchas de amido, na panificação para o aumento da acidez e volume do pão e na indústria de bebidas (GUPTA et al. 2008).

## 4- METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Aspergillus* sp. FSDE16 isolado durante a realização do trabalho de Carvalho-Gonçalves (2017). A cultura foi mantida em placas de Petri com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) incubadas durante 7 dias à 30°C e posteriormente mantidas sob refrigeração. A Figura 1 mostra o crescimento do fungo em uma placa de Petri.

Figura 1: *Aspergillus* sp. FSDE16 em placa de petri.



Fonte: Autor

Para obtenção dos esporos foi utilizada água destilada esterilizada com quantidade suficiente para cobrir a placa. Após raspagem dos esporos, foi retirado 1mL da suspensão e diluído com 6mL de água destilada esterilizada. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, contando um total de 5 quadrantes (4 extremidades e o central), utilizando a equação 1 abaixo é possível encontrar a concentração de esporos por mL .

$$Ce \text{ (esporos/mL)} = \sum_1^5 n \times 5 \times 10^4 \times fd \quad (eq1)$$

Em que:

$C_e$  = Concentração de esporos (esporos/mL);

$\Sigma n$  = soma algébrica do número de esporos contados na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro);

5 = fator para expandir para os 25 quadrantes da câmara;

$10^4$  = constante para a conversão de  $\text{mm}^3$  para  $\text{cm}^3$  número total de quadriculos na câmara;

fd = fator de diluição utilizado.

Para inocular o meio de cultura foi calculado o volume necessário para ter uma concentração de  $10^5$  esporos por grama de meio de cultivo, a equação 2 é apresentada abaixo.

$$V_i = \frac{C_d \left( \frac{\text{esporo}}{\text{grama}} \right) \times m \text{ (g)}}{C_e \left( \frac{\text{esporo}}{\text{mL}} \right)} \quad (\text{eq2})$$

Em que:

$V_i$  = volume de inóculo (mL);

$C_d$  = concentração de inóculo desejada (esporos/g) =  $10^5$ ;

$m$  = massa de meio de cultivo usada (g) = 100 gramas;

$C_e$  = concentração de esporos da suspensão (esporos/mL).

## 4.2 Cultivo

O meio de cultura utilizado para a produção de enzimas a partir do *Aspergillus* sp FSDE16 foi o bagaço de malte. O bagaço de malte foi o mesmo utilizado no trabalho Aleixo (2018) sendo resíduo da produção de cerveja artesanal do tipo Blond Ale, que foi seco em estufa com circulação de ar a  $55^\circ\text{C}$ , posteriormente armazenado a temperatura ambiente. A Figura 2 mostra o bagaço de malte utilizado.

Figura 2: Bagaço de malte usado nos cultivos.



Fonte: Autor

Para avaliar a solução de umidificação do bagaço de malte foram realizados cultivos usando como solução de umidificação água destilada e cultivos usando solução de sais ( sulfato de amônia 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L). Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

A umidade do bagaço de malte foi ajustada para 70%. O ajuste da umidade seguiu a equação 3 abaixo:

$$M_{SU} = \frac{M_s * (U_d - U_s)}{1 - U_d} \quad (eq3)$$

Em que:

$M_{SU}$  = massa da solução de umidificação adicionada (g);

$M_s$  = massa do substrato (g);

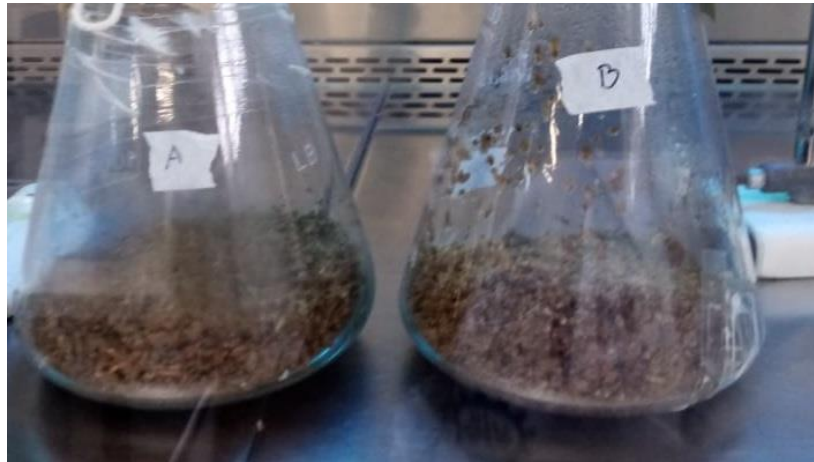
$U_d$  = umidade desejada (%);

$U_s$  = umidade do substrato (%).

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL com 100 gramas de bagaço de malte umidificado. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C e

1 atm durante 15 minutos. A Figura 3 abaixo apresenta o bagaço de malte umidificado após esterilização.

Figura 3: Bagaço de malte esterilizado pronto para inoculação.



Fonte: Autor

O volume de inóculo encontrado usando a equação (2) foi adicionado ao frasco de Erlenmeyer de 1L com meio já esterilizado e foi realizada uma agitação manual a fim de espalhar os esporos na maior parte possível dos 100g de meio de cultivo. O cultivo ocorreu durante 5 dias à pressão atmosférica e temperatura média de 30°C.

Nos cultivos para verificar a influência da solução de umidificação após o quinto dia de cultivo foi realizada extração das enzimas produzidas. Escolhida a solução de umidificação foram realizados cultivos com a solução escolhida, nas mesmas condições, agora retirando amostra a cada 24 horas de cultivo durante 10 dias.

A extração foi realizada com a incubação do meio cultivado com água destilada seguindo uma proporção substrato solvente de 1g de substrato para 30mL água destilada, a extração ocorreu durante 30 minutos sob agitação manual. Por fim foi filtrado com papel de filtro qualitativo e congelado para futura análise da atividade enzimática.

### 4.3 Atividade enzimática

#### 4.3.1 Atividade de Amilase

A determinação da atividade enzimática seguiu a equação 4, apresentada abaixo, foi utilizado o método de Aiyer(2004) com modificações. Em banho termostático a 50°C foi adicionado um tubo de ensaio contendo 0,25mL de amido solúvel 1% em tampão citrato de sódio pH 5,0 e 0,25mL da amostra proveniente da extração enzimática. A reação ocorreu por 30 minutos, os açúcares redutores foram determinados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). Foram preparados ensaios controle contendo 0,25mL de extrato enzimático e 0,25mL de tampão citrato de sódio pH 5,0. O branco do espectrofotômetro foi preparado com 0,5 mL de tampão citrato de sódio pH 5,0 e 0,5mL de DNS. As leituras foram realizadas em 540nm, a conversão das leituras de absorbância em concentração foi realizada utilizando solução de glicose como padrão (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de glicose por minuto nas condições do método proposto (ALVA et al., 2007).

$$\text{Amilase} \left( \frac{\text{u}}{\text{g}} \right) = \frac{((A - B) \cdot f \cdot d \cdot v \cdot R)}{0,18 \cdot t \cdot Ve} \quad (\text{eq4})$$

Em que:

A = absorbância da amostra;

B = absorbância do branco da amostra;

f = fator de conversão da curva;

d = diluição da amostra;

V = volume total do meio de reação (mL);

0,18 = fator de conversão de miligramas para μmol de glicose;

t = tempo de reação (min);

Ve = volume da enzima no meio de reação (mL);

R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

Foram também realizadas atividades de amilase, para determinar a melhor condição de pH, variando o pH de 3 a 6,5 com um passo de 0,5 na solução de amido 1% mantendo a temperatura a 50°C. Na melhor condição de pH encontrado foi determinada a temperatura de maior atividade de amilases variando a temperatura de 30 a 70°C com um passo de 20°C, mantendo o pH a 5,0.

#### 4.3.2 Atividade CMCCase e FPase

As atividades enzimáticas CMCCase e FPase foram realizadas de acordo com a metodologia de Ghose (1987). Para CMCCase foi utilizado solução a 4% de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato de sódio (pH = 5,0) durante 10 minutos e para FPase foi utilizado uma tira (1x6 cm) de papel de filtro e tampão citrato de sódio (pH = 5,0) durante 1 hora de reação. A quantificação dos açúcares redutores liberados foi realizado pela análise de DNS .

Para a determinação dos valores de CMCCase foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{CMCase (U/g)} = \frac{(A - B) \cdot f \cdot d \cdot V}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad (\text{eq5})$$

Em que:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = Diluição da amostra (mL/g);

V = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para μmol de glicose;

t = Tempo de reação (min);

V<sub>e</sub> = Volume da enzima no meio de reação (mL).

Para a determinação dos valores de FPase foi utilizada a seguinte equação:

$$FPase \text{ (U/g)} = \frac{(A - B) \cdot f \cdot d \cdot V}{0,18 \cdot t \cdot Ve} \quad (eq6)$$

Em que:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = Diluição da amostra (mL/g);

V = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para  $\mu\text{mol}$  de glicose;

t = Tempo de reação (min);

Ve = Volume da enzima no meio de reação (mL).

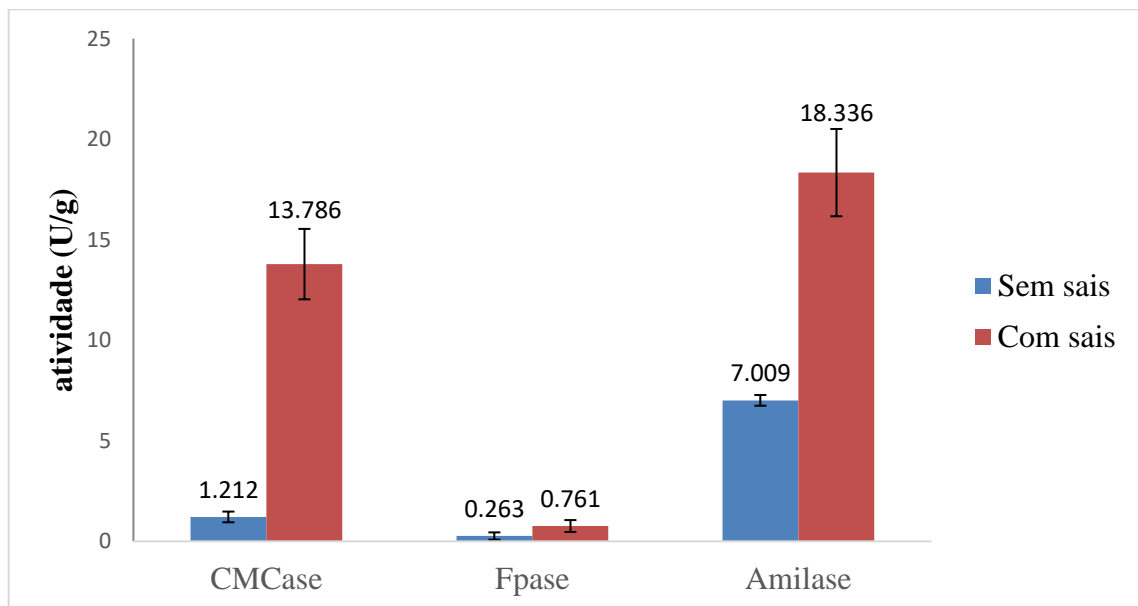
## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da solução de umidificação do bagaço de malte

Como solução de umidificação foram avaliadas a utilização de água destilada (sem sais) e uma solução com sulfato de amônia e fosfato de potássio (com sais). O bagaço de malte foi umedecido com as respectivas soluções e após inoculação foi incubado durante 5 dias.

A atividade enzimática foi maior no meio de cultivo umidificado com sais (sulfato de amônio a 3,3 g/L, fosfato de potássio a 1,5 g/L). A Figura 4 apresenta os valores de CMCase, FPase e amilase para o cultivo de 120h.

Figura 4: Atividade enzimática para cultivos com e sem sais.



Fonte: Autor

Os sais adicionados ao bagaço de malte são fontes de nitrogênio e fósforo para o microrganismos, sendo estes componentes essenciais para o desenvolvimento do mesmo, a adição dos sais trouxe benefícios a síntese das amilases.

Cunha et al. (2012) obteve em sua melhor produção de CMCase 0,432 U/mL utilizando *Aspergillus niger* A12 em 30h de cultivo em estado submerso onde a melhor atividade de CMCase do *Aspergillus* sp. FSDE16 foi de 0,919 U/mL . Já Rocha (2010) obteve

maior atividade celulásica igual a 7,20 U/g a partir do *Aspergillus niger* ATCC 16404 com fermentação em estado sólido utilizando resíduo de arroz e maracujá como meio de cultivo.

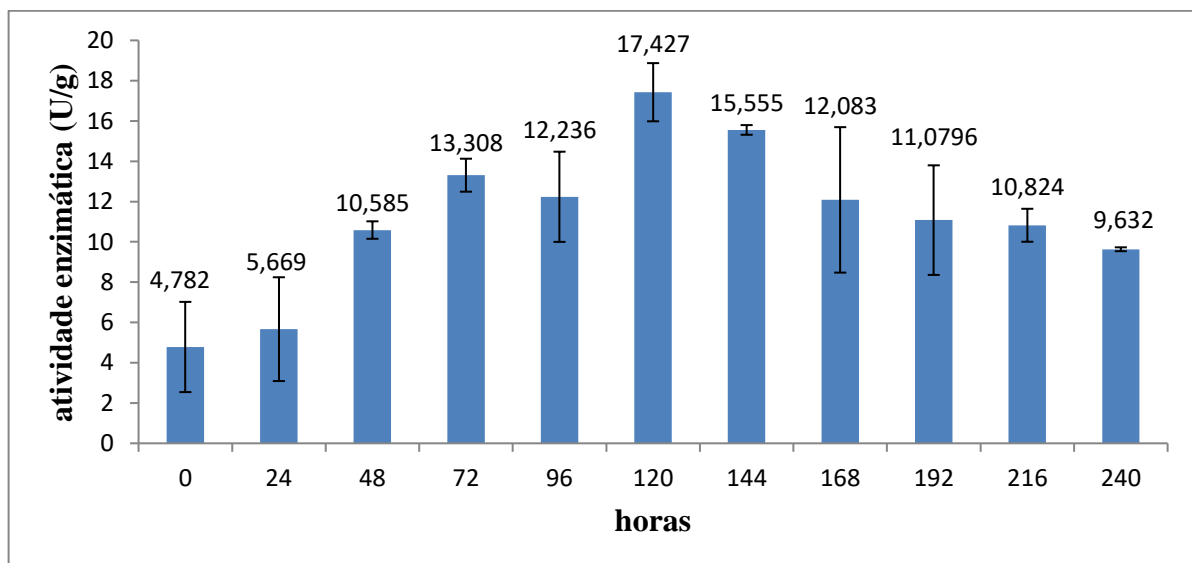
Aleixo Júnior (2018) utilizou *Penicillium* sp. FSDE 15, bagaço de malte com 70% de umidade como substrato com  $10^5$  esporos/g para produção de enzimas, obteve maiores resultados as 120h de cultivo com CMCase de 12,4 U/gms, FPase 11,02 U/gms e amilase de 30,6 U/gms.

## 5.2 Cinética de produção de amilases

Com os resultados obtidos do ajuste da umidade do meio de cultivo, foi escolhido o ajuste utilizando sais para a realização de uma curva de produção de amilase durante 240h (10 dias) com o intuito de encontrar o dia em que ocorre o pico de produção de enzimas.

A Figura 5 apresenta os valores da atividade enzimática da amilase de 0 a 240h com um passo de 24h.

Figura 5 :Atividade de amilase durante 240h de cultivo.



Fonte: Autor

Constatou-se que a maior produção de amilase ocorreu as 120h (5º dia) 17,427 U/g e após esse período ocorreu uma redução da atividade de amilases até às 240h. Este fato é comum de ocorrer na produção de enzimas e pode estar associado as transformações ocorridas no meio de cultivo, com o acúmulo de outros metabólicos que podem degrada a amilases

produzidas. Rocha (2010) realizou um estudo cinético da atividade amilásica durante 12 dias utilizando *Aspergillus niger* ATCC 16404 com cultivo em estado sólido utilizando resíduo de arroz e maracujá como meio de cultivo a 28°C, obteve ao quinto dia 12,10 U/g de atividade amilásica.

As Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 ilustram o crescimento do microrganismo no meio de cultivo em dias específicos, sendo 48h, 72h, 96h, 120h e 240h respectivamente.

Figura 6, 7 e 8 :Crescimento do cultivo em 48h, 72h e 96h.



Fonte: Autor

Figura 9 e 10 :Crescimento do cultivo em 120h, 240h.

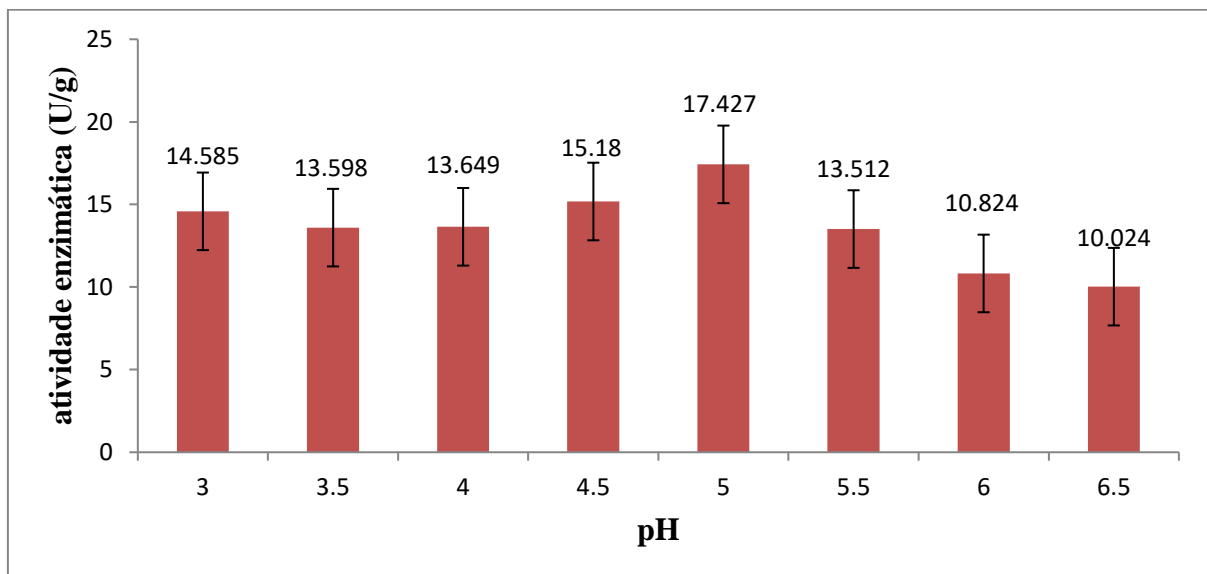


Fonte: Autor

### 5.3 Caracterização da amilase produzida em relação ao pH

Na caracterização da amilase em relação ao pH, foram realizadas atividades enzimáticas a 50°C e com o pH variando de 3 a 6,5. A Figura 11 apresenta os valores da atividade enzimática para as soluções de amido 1% com diferentes pH.

Figura 11 :Atividade amilase com diferentes pH



Fonte: Autor

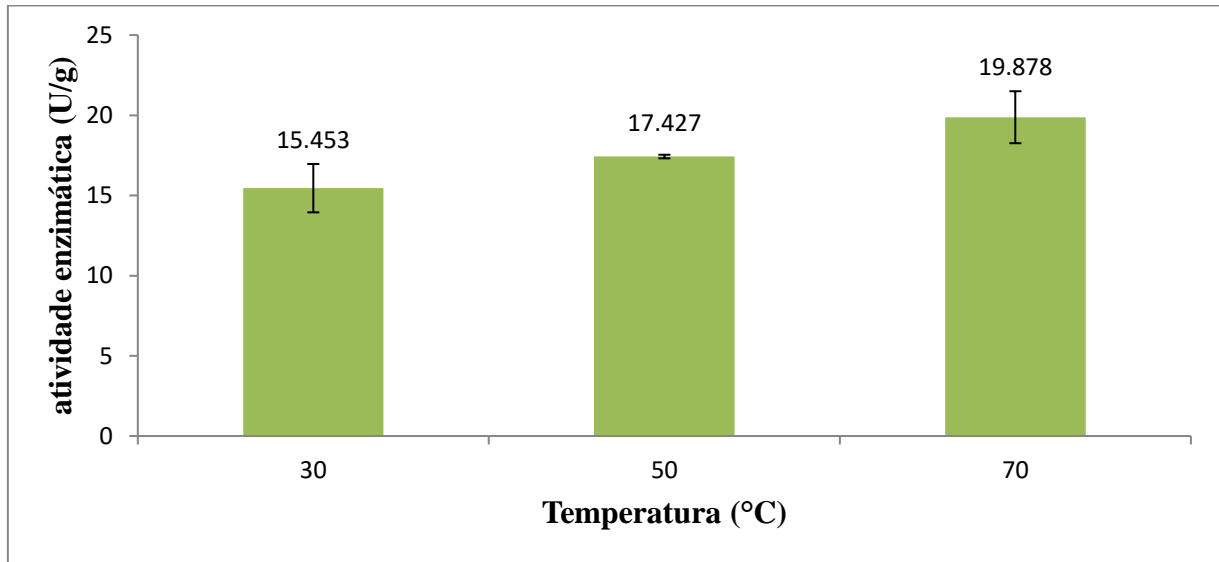
Foi observado que a faixa de pH que apresenta maior atividade amilásica (U/g) é entre 4,5 e 5 com valores de atividade enzimática de 15,180 (U/g) e 17,427 (U/g) respectivamente. No entanto observando os dados pode-se ver que entre o pH 3 a 5,5 a variação da atividade de amilase é pequena, ou seja, podemos considerar que a enzima produzida atua bem na faixa de pH ácido de 3 a 5,5.

No trabalho de Aleixo Júnior (2018) que utilizou *Penicillium* sp. FSDE 15 e o bagaço de malte a atividade de amilase ótima também foi em pH 5, mas a atividade reduziu a aproximadamente 20% do valor inicial para pH entre 3 e 4. Como o pH é uma variável que sofre alteração ao longo do processo, trabalhar com uma enzima que apresente uma faixa maior de pH pode ser interessante.

#### 5.4 Caracterização da amilase produzida em relação a temperatura

Foram realizadas atividade enzimática da amilase nas temperaturas, 30°C, 50°C e 70°C a um pH constante de 5. A Figura 12 apresenta os valores da atividade amilásica (U/g).

Figura 12 :Atividade amilase com diferentes temperaturas.



Fonte: Autor

A atividade realizada a 70°C apresentou maior atividade enzimática com 19,878 U/g quando comparado com 30°C e 50°C os quais apresentaram atividade de 15,453 U/g e 17,427 U/g respectivamente. Aleixo Júnior (2018) encontrou resultados semelhantes quando utilizou *Penicillium* sp. FSDE 15 e bagaço de malte, ou seja, maior atividade de amilase a 70°C, mas com redução de atividade de 80% quando utiliza temperatura de 30°C. A depender do processo em que a enzima será utilizada pode ser interessante ter uma condição de trabalho ótima em temperatura mais baixas, próximas a temperatura ambiente.

Este é um estudo inicial da produção de amilases usando o bagaço de malte por fungos que foram isolado da região. Neste trabalho foi percebido o potencial do *Aspegillus* sp FSDE 16 na produção de amilases, e a enzima produzida possui características de atuação em condições de pH e temperatura em ampla faixa. É necessário estudos que avaliem a estabilidade da enzima nestas condições de operação bem como realizar a hidrólise de matéria-prima que contenha amido.

## 6- CONCLUSÃO

É possível a produção de enzimas a partir do cultivo do *Aspergillus sp.* FSDE16 utilizando como substrato o bagaço de malte. O trabalho apresentou resultados de produção de amilase satisfatório com base na produção de outros pesquisadores.

A fermentação apresentou vantagens pelas condições de crescimento do microrganismo se apresentaram viáveis em temperatura média de 30°C, dessa forma sendo uma produção vantajosa na região, além disso a melhor produção de enzimas necessitou de uma solução de umidificação simples composta apenas com uma solução de sulfato de amônio e fosfato de potássio.

O bagaço de malte se apresentou como um meio de cultivo bastante viável e promissor por ser um resíduo industrial com disponibilidade o ano todo no mercado brasileiro, por apresentar baixo custo e ter facilidade em encontrar no mercado tanto em pequenas quanto em grandes quantidades.

Os valores de pH e temperatura para melhor atividade de amilase mostrou que a enzima produzida trabalha bem em amplas faixa, podendo assim ser utilizada em diferentes aplicações.

## 7- REFERÊNCIAS

- ALEIXO JÚNIOR, M. E. Produção e caracterização de enzimas produzidas por *Penicillium* sp FSDE 15 usando bagaço de malte. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2018.
- ALVA, S. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 576, 2007.
- AMORIM, B. C. Estudo da produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando o microorganismo *Trichoderma* sp. Campina Grande, 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UFCG, Campina Grande, 2010.
- AQUARONE, E. et al. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Editora Blücher Ltda, 2001. v. 4.
- ARAÚJO, L. F. Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida. Tese – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2004.
- AIYER, P. V. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *Afr. J. Biotechnol.*, 3(10): 519-522.
- CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do Bagaço de Malte Oriundo de Cervejarias. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.
- CORRÊA, R. C. G., et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.41, p.1467– 1478, 2014.
- CORREIA, R.T.P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.
- COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 198f. Tese (Doutorado em Ciências). Pósgraduação em

Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 1993.

CUNHA, F. M., Esperança M. N., Zangirolami T. C., Badino A. C., e Farina C. S.. “Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus* on sugarcane bagasse for the production of cellulase.” *Bioresource Technology* (ElsevierLtd.) 112 (February 2012): 270-274.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. *Biotechnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido*. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol.2, 2001.

FERNANDES, M. L. M. *Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise*. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GAUTAM, A.; KUMAR, A.; DUTT, D. Co-Cultivation of *Penicillium* sp. AKB-24 and *Aspergillus nidulans* AKB-25 as a cost-effective method to produce cellulases for the hydrolysis of pearl millet stover. *Fermentation*, v.2, n.2, 2016.

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

GHOSE, T. K. *Measurement of cellulase activities*. *Pure and Applied Chemistry*, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GUPTA, A ., GUPTA, V.K., MODI, V.R., YADAVA, L.P.. Production and characterization of  $\alpha$ - Amilase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology* 7 v.3, p. 551-556, 2008.

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

GUTIERREZ-ROJAS, M., FAVELA-TORRES, E., CORDOVA-LOPES, J., GARCIA-RIVERO, M., Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerg, agar surface and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.33, n.2, p.103-103, 1998.

KIRIN HOLDINGS. Global Beer Consumption by Country in 2014. Disponível em: [https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.html). Acesso em: 09/10/2018.

LONSANE, B.K., GHIDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V..Engineering aspects of solid state fermentation. *Enz. And Microbial Technol.*, v. 7, p. 258-265, 1985.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P.; SERVULO, E. F. C. Caracterização de Resíduos Cervejeiros. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina, outubro de 2014.

Mendes, A. A.; de Castro, H. F.; Rodrigues, D. S.; Adriano, W. S.; Tardioli, P. W.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2010), doi:10.1007/s10295-010-0880-9.

MENDES, Adriano A. et al . Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quím.Nova*, São Paulo , v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011 .

Bagaço de Malte / Cevada Processada / Polpa de Cevada. Disponível em: <[mfrural.com.br/detalhe/bagaco-de-malte-cevada-processada-polpa-de-cevada-atendemos-rs-pr-mg-ba-go-106819.aspx](http://mfrural.com.br/detalhe/bagaco-de-malte-cevada-processada-polpa-de-cevada-atendemos-rs-pr-mg-ba-go-106819.aspx)> acessado 03 de novembro de 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

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

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.81-84, 2003.

RAVINDAR, D. J.; ELANGO VAN, N. Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. *Journal of Pharmacy Research*, v.6, p. 426-430, 2013.

REINOLD, M.R. A Cervejaria e o meio ambiente. In: REINOLD, M.R. Manual Prático de Cervejaria, 1. ed. São Paulo: ADEN – Editora e Comunicações Ltda. 163-197, 1997.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillusniger* em fermentação em estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomycescerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, 2001.

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

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech*, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção defungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitentibus*, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, 2006.

Sharma, R.; Chisti, Y.;Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* 2001, 19, 627.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkalistableamylase from *Chryseobacteriumtaeanense* TKU001, and application in antioxidant andprebiotic.*Process Biochemistry*, v. 46, p. 745–750, 2011.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, v.78, p.293-300, 2001..