



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

BRUNNO CARVALHO ROCHA

AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS
AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE

João Pessoa – PB

2019

BRUNNO CARVALHO ROCHA

AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS
AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE

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

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R672a Rocha, Brunno Carvalho.

AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E DAS CONDIÇÕES DE
EXTRAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp.
FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE / Brunno Carvalho Rocha. -
João Pessoa, 2019.

47 f. : il.

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

1. Amilases. 2. Termoestabilidade. 3. Extração. 4.
Aspergillus sp. FSDE16. 5. Bagaço de malte. I. Santos,
Sharline Florentino de Melo. II. Título.

UFPB/BC

BRUNNO CARVALHO ROCHA

AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS
AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE

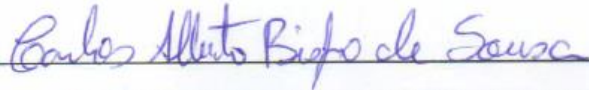
Trabalho Final de Curso, apresentado como exigência do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Data de aprovação: 30/04/2019

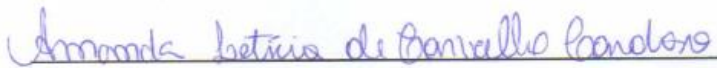
BANCA EXAMINADORA



Prof(a). Dr(a). Sharline Florentino de Melo Santos
(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa
(Avaliador)



Amanda Letícia de Carvalho Cardoso (Engenheira Química)
(Avaliadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Patrícia e Rosivaldo, por todo o apoio dado desde sempre e pelos esforços realizados para garantir que eu sempre tivesse acesso à melhor educação possível.

À minha avó, Rosicleide, por todo o carinho e suporte em todos os momentos da minha vida.

À minha namorada, Maddie, por seu amor, companheirismo e por ser minha grande incentivadora.

À professora Sharline, pelos anos de ensino e orientação em diversos projetos de pesquisa e por sempre ter acreditado em meu potencial.

Aos professores da Universidade Federal da Paraíba e da University of New Hampshire que tiveram um impacto positivo na minha formação acadêmica.

Aos colegas de curso da UFPB, por toda a ajuda que ofereceram ao longo da minha caminhada no curso de engenharia química.

Aos colegas de intercâmbio na UNH, por terem tornado o processo de adaptação em New Hampshire mais fácil e por todas as aventuras que tivemos juntos. Em especial a Matheus, cuja amizade sincera não se deixa abater por nossa rivalidade sadia nos esportes.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bioengenharia que me ajudaram ao longo dos meus projetos de pesquisa, em especial a Débora, Natane, Felipe e Lucas.

*“I didn’t come this far to only come this far,
so we’ve still got further to go.”*

Tom Brady

RESUMO

A produção agrícola brasileira gera uma grande quantidade de resíduos, o que faz da sua correta reutilização um grande desafio enfrentado atualmente pelas agroindústrias. Dentre os resíduos agroindustriais, está incluso o bagaço de malte, que é um subproduto gerado a partir do processo de produção de cerveja. Uma das alternativas para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais é sua utilização como substrato para cultivo de microrganismos em fermentação em estado sólido, visando a obtenção de bioprodutos de interesse econômico. Um destes produtos são as amilases, grupo de enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise de moléculas de amido e possuem ampla utilização em diversos tipos de indústria. Diante disso, este estudo teve como objetivo a avaliação da termoestabilidade e das condições de extração das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 em cultivo composto por bagaço de malte umidificado com solução de sais. Para avaliação da termoestabilidade das amilases, o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C, durante 8 horas, e sua atividade foi monitorada ao longo deste período. Já para o estudo das condições de extração, foi realizado um planejamento fatorial experimental 2^3 com 3 repetições nos pontos centrais, avaliando-se os parâmetros de velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm), tempo de extração (20, 40 e 60 minutos) e razão de solvente por massa de meio (10, 20 e 30 mL/g), e utilizando-se das atividades por massa de meio (U/g) e por volume de extrato (U/mL) como respostas de saída. Os resultados mostraram que a termoestabilidade das amilases produzidas é comprometida com o aumento da temperatura, sendo que, ao final das 8 horas de incubação, as atividades relativas para as temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C foram de 117,6%, 78,7% e 24,6%, respectivamente. Com relação às condições de extração, foi observado que os melhores experimentos, para a resposta de atividade em U/g, foram o 6 (100 rpm, 60 minutos e 30 mL/g) e o 5 (200 rpm, 60 minutos e 30 mL/g), cujas atividades foram iguais a $11,43 \pm 0,49$ U/g e $10,86 \pm 0,22$ U/g, respectivamente. Já para a resposta de atividade em U/mL, os melhores experimentos foram o 10 (150 rpm, 40 minutos e 20 mL/g), o 8 (200 rpm, 60 minutos e 10 mL/g) e o 2 (200 rpm, 20 minutos e 10 mL/g), que proporcionaram atividades enzimáticas iguais a $0,499 \pm 0,011$ U/mL, $0,497 \pm 0,055$ U/mL e $0,487 \pm 0,080$ U/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Amilases, termoestabilidade, extração, *Aspergillus* sp. FSDE16, bagaço de malte

ABSTRACT

The Brazilian agricultural production generates a large amount of waste, therefore its correct reutilization is a great challenge currently faced by agro-industries. Among the agro-industrial waste, it is included the malt bagasse, which is a by-product generated by beer brewing processes. One of the ways to reuse agro-industrial waste is by utilizing it as a substrate to grow microorganisms with the goal of producing bio-products of economic interest by solid-state fermentation. An example of these bio-products are the amylases, a group of enzymes that act synergistically to hydrolyze starch molecules and are utilized by several types of industries. In the face of this, this study has the goal of evaluating the thermostability and the conditions for extraction of amylases produced by *Aspergillus* sp. FSDE16 in a medium composed by malt bagasse humidified with a solution of salts. Thermostability evaluation was carried by incubating the enzyme extract at 30 °C, 50 °C and 70 °C during 8 hours, and by monitoring its activity during the process. While the optimum conditions of extraction were obtained from an experimental factorial design 2^3 with 3 center points. This design evaluated the effects of agitation speed (100, 150 and 200 rpm), extraction time (20, 40 and 60 minutes), and solvent/sample ratio (10, 20 and 30 mL/g) on the activity per mass of medium (U/g) and on the activity per volume of extract (U/mL). The results showed that the thermostability of the amylases is compromised by temperature increase, and that after 8 hours of incubation the relative activities at 30 °C, 50 °C and 70 °C were equal to 117.6%, 78.7% and 24.6%, respectively. In regard to the conditions of extraction, it was observed that the best experiments for activity in U/g unit were the numbers 6 (100 rpm, 60 minutes and 30 mL/g) and 5 (200 rpm, 60 minutes and 30 mL/g), whose activities were equal to 11.43 ± 0.49 U/g and 10.86 ± 0.22 U/g, respectively. While for the activity in U/mL unit, the best experiments were the numbers 10 (150 rpm, 40 minutes and 20 mL/g), 8 (200 rpm, 60 minutes and 10 mL/g) and 2 (200 rpm, 20 minutes and 10 mL/g), whose activities were equal to 0.499 ± 0.011 U/mL, 0.497 ± 0.055 U/mL and 0.487 ± 0.080 U/mL, respectively.

Keywords: Amylases, thermostability, extraction, *Aspergillus* sp. FSDE16, malt bagasse

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Representação do processo de obtenção do bagaço de malte	16
Figura 3.2 – Classificação das enzimas amilolíticas	18
Figura 3.3 – Representação da atuação sinérgica das enzimas amilolíticas	19
Figura 4.1 – Bagaço de malte utilizado	21
Figura 4.2 – Placa de Petri contendo <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	22
Figura 4.3 – Solução concentrada de inóculo	23
Figura 4.4 – Representação da câmara de Neubauer	23
Figura 4.5 – Meios de cultivo imediatamente após inoculação	25
Figura 5.1 – Termoestabilidade das amilases a diferentes temperaturas	30
Figura 5.2 – Atividade relativa das amilases a diferentes temperaturas	30
Figura 5.3 – Atividade de α -amilase por massa de meio para cada experimento	33
Figura 5.4 – Diagrama de Pareto para U/g como resposta de saída	35
Figura 5.5 – Superfície de resposta em função do tempo e velocidade	36
Figura 5.6 – Superfície de resposta em função do razão e velocidade	36
Figura 5.7 – Superfície de resposta em função do tempo e razão	37
Figura 5.8 – Atividade de α -amilase por volume de extrato para cada experimento	38
Figura 5.9 – Diagrama de Pareto para U/mL como resposta de saída	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Caracterização físico-química do bagaço de malte	21
Tabela 4.2 – Experimentos de estabilidade das amilases	26
Tabela 4.3 – Planejamento fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais para as condições de extração	28
Tabela 4.4 – Matriz do planejamento experimental fatorial das condições de extração	28
Tabela 5.1 – Resultados obtidos para os experimentos de extração das amilases	32
Tabela 5.2 – Parâmetros do modelo estatístico para U/g	34
Tabela 5.3 – Parâmetros do modelo estatístico para U/mL	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1. Resíduos agroindustriais	14
3.2. Bagaço de malte	15
3.3. Fermentação em estado sólido	16
3.4. Amilases	18
3.5. Extração de enzimas	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Materiais	21
4.1.1. Bagaço de malte	21
4.1.2. Microrganismo	22
4.2. Métodos	22
4.2.1. Preparação do inóculo	22
4.2.2. Cultivo para produção de amilases	24
4.2.3. Avaliação da estabilidade das amilases	26
4.2.4. Condições de extração das amilases	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Avaliação da termoestabilidade das amilases	30
5.2. Avaliação das condições de extração das amilases	32
5.2.1. Atividade por massa de meio como resposta de saída	33
5.2.2. Atividade por volume de extrato como resposta de saída	37
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais em produção agrícola, atividade que ocasiona uma grande geração de resíduos agroindustriais. A fermentação em estado sólido é uma técnica que apresenta alternativas de como lidar com esses resíduos gerados, diminuindo possíveis impactos ambientais e agregando valor econômico a esses subprodutos, através da produção de substâncias de interesse comercial (PINTO et al., 2005). Dentre esses produtos de interesse, destacam-se as enzimas.

A produção de cerveja no Brasil apresenta uma tendência crescente nos últimos 30 anos, e, em 2016, alcançou o patamar de 14 bilhões de litros, colocando o Brasil como terceiro maior produtor mundial de cerveja, atrás apenas da China e dos Estados Unidos (MARCUSO; MÜLLER, 2017). O setor cervejeiro é um dos mais relevantes para a economia brasileira e sua extensa cadeia produtiva é responsável por 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) e 14% da indústria de transformação nacional (CERVBRASIL, 2017).

Ao final de 2018, 210 novas fábricas de cerveja abriram as portas no Brasil, fazendo o número total de cervejarias instaladas no país chegar a 889 (MARCUSO; MÜLLER, 2019). O principal subproduto gerado pela produção de cervejas é o bagaço de malte, com sua produção estimada entre 14 e 20 kg para cada 100 litros de cerveja processada (OLIVEIRA et al., 2016). Portanto, é estimado que entre 1,96 milhões e 2,8 milhões de toneladas de bagaço de malte sejam produzidas anualmente no Brasil, tornando o bagaço de malte um bom candidato para ser utilizado como substrato para produção de enzimas.

A utilização de enzimas em processos industriais continua a crescer, impulsionada pelo desenvolvimento de novas tecnologias, produção através de engenharia genética e pelo surgimento de novas aplicações (REINHER et al., 2014). Enzimas, como celulases, amilases, proteases, lipases e pectinases, têm sido aplicadas amplamente pelas indústrias de tecidos, detergentes, de alimentos e bebidas, de couro e na dieta de animais para o aumento da digestão de fibras (GRIEBELER et al., 2015).

Amilases são enzimas classificadas como hidrolases, que hidrolisam, especificamente, moléculas de amido gerando maltose, dextrina e glicose. As enzimas amilolíticas possuem grande destaque em processos biotecnológicos da atualidade e podem ser obtidas a partir de diversas fontes, como animais, plantas e microrganismos (COELHO et al., 2018). Sua especificidade na hidrólise de substâncias amiláceas faz com que sejam bastante utilizadas nas

indústrias de bebidas e alimentos, têxteis, de papel, farmacêutica, de detergentes, entre outras (BENASSI, 2018).

De acordo com seu mecanismo de atuação, amilases podem ser divididas em α -amilases, β -amilases e glicoamilases, das quais as α -amilases são consideradas mais importantes (LUFT, 2016; CARVALHO et al., 2008). O pó concentrado de α -amilases produzidas por *Aspergillus oryzae*, com atividade enzimática de, aproximadamente, 30 U/mg, pode ser encontrado no mercado pelo valor de R\$ 29,80 por grama, para a embalagem de 50 gramas. Enquanto o pacote contendo 1 grama das α -amilases produzidas por *Bacillus subtilis*, com atividade aproximada de 380 U/mg, também sob forma de pó concentrado, é vendido por R\$ 1921,00 (SIGMA-ALDRICH, 2019).

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 de amilases em processos industriais que necessitem de incubação prolongada a altas temperaturas (LE MOS et al., 2003).

Para máxima produção de enzimas, é fundamental a otimização das condições de extração, de modo a se obter um processo que conduza ao extrato enzimático de máxima atividade (MENONCIN, 2007). A eficiência do processo de extração é um fator crítico para a análise econômica do processo geral e sua otimização pode reduzir ainda mais os custos totais do processo de produção de enzimas (CASTILHO et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as condições de extração e a estabilidade térmica das enzimas produzidas pelo *Aspergillus* sp. FSDE16 por fermentação em estado sólido com bagaço de malte como substrato.

2.2. Objetivos específicos

1. Produzir amilases através de cultivo do *Aspergillus* sp. FSDE16 em meio sólido umidificado com bagaço de malte como substrato.
2. Avaliar a estabilidade térmica das amilases produzidas anteriormente para as temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C, durante 8 horas de incubação.
3. Delinear um planejamento experimental fatorial para avaliar as condições de extração das amilases;
4. Verificar as melhores condições de extração das amilases, com relação às variáveis de velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm), tempo de extração (20, 40 e 60 minutos) e razão entre volume de solvente por massa de meio de cultivo (10, 20 e 30 mL/g).

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Resíduos agroindustriais

Resíduos agroindustriais são definidos como subprodutos obtidos a partir do processamento industrial de alimentos. Estima-se que perdas consideráveis de produtos agrícolas ocorram durante as diversas etapas do processo produtivo, o que acarreta uma elevada geração de resíduos no processamento de produtos agropecuários (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015). A minimização ou reaproveitamento de resíduos tem sido foco das agroindústrias, através do estabelecimento de novas utilizações para produtos e subprodutos agropecuários em substituição aos recursos não-renováveis (ROSA et al., 2011).

Os avanços significativos no desempenho do agronegócio provocaram o aumento do consumo de matérias-primas e da geração de resíduos pelas agroindústrias (ROSA et al., 2011). Esta geração de resíduos é um problema crescente, pois grande parte destes não possui destinação adequada, mesmo possuindo grande potencial de reaproveitamento em processos nos quais resíduos ricos em matéria orgânica podem ser usados como fonte de nutrientes (ORTENZIO et al., 2015). A produção de resíduos agroindustriais gera milhares de toneladas, sendo de interesse agregar valor econômico a estes subprodutos através da sua reutilização, uma vez que são materiais ricos em compostos bioativos (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

Diversos tipos de resíduos produzidos pela agroindústria têm sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, devido a sua alta disponibilidade e por representarem uma fonte alternativa com baixo valor comercial (MANERA et al., 2011). Entretanto, em muitos casos, os subprodutos são considerados custo operacional para as empresas, levando a seu descarte indevido, tornando-os fontes de contaminação (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

Dentre os processos biotecnológicos que fazem uso de resíduos agroindustriais, destaca-se a produção de enzimas. Estima-se que cerca de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas é atrelado ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos, portanto a reutilização de resíduos permite uma redução nos custos de produção (MANERA et al., 2011). Resíduos agroindustriais podem, ainda, ser utilizados para obtenção de produtos químicos e biológicos de maior valor agregado, como proteínas, álcoois, aminoácidos, ácidos

orgânicos, fertilizantes, metabólitos secundários biologicamente ativos, óleos essenciais e aditivos (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

3.2. Bagaço de malte

O grão de cevada é considerado o de quinta maior importância econômica entre os cereais no mundo e tem como seu principal uso a produção de cervejas. Entretanto, as enzimas presentes nos grãos *in natura* não são capacitadas para transformar o amido da cevada em açúcares fermentescíveis, necessários para a produção de cerveja (BELETI; DUARTE; GEORG-KRAEMER, 2012). Para serem utilizados pela indústria cervejeira, os grãos de cevada devem ser convertidos a malte. Dentre as diversas variedades de cevada, apenas a que apresenta características adequadas para a produção de cerveja é cultivada comercialmente no Brasil (SLEIMAN, 2006).

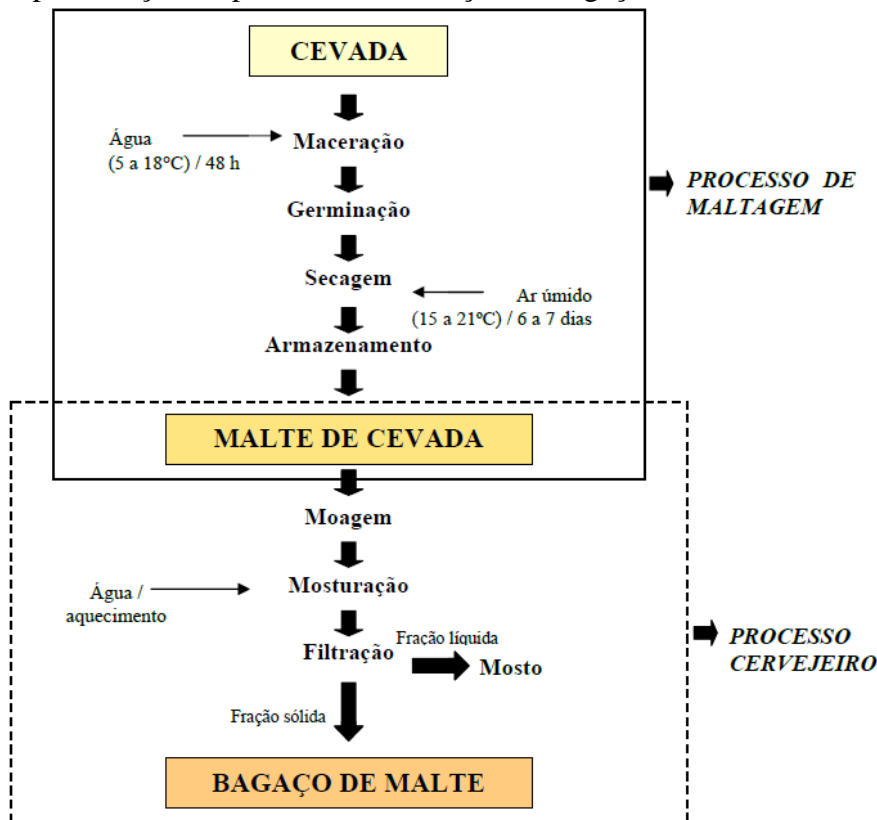
O malte é definido como o produto obtido após germinação de cereais sob condições controladas que estimulam a produção de enzimas amilolíticas e provocam modificações nos carboidratos e proteínas que constituem os grãos (LUFT, 2016). Para sua obtenção, a cevada é submetida ao processo de malteação, ou maltagem, no qual o cereal é acondicionado em ambientes artificiais de germinação, passando por etapas de limpeza, maceração, germinação e secagem (PORTO, 2011). Para um malte de excelência ser produzido, a cevada utilizada deve apresentar características, como poder germinativo e teor de proteína, que atendam às exigências de qualidade (GOUVÊA; MAIA, 2014).

Na maceração, o teor de água de água nos grãos é ajustado para iniciar a ativação do metabolismo, já a germinação tem objetivo de promover enriquecimento enzimático, além de transformar as substâncias de reserva, enquanto a secagem encerra os processos químico-biológicos e fornece as características sensoriais do malte (BELETI; DUARTE; GEORG-KRAEMER, 2012). É necessário manter o teor de umidade entre 44% e 48 %, e a temperatura entre 14 e 18 °C para que a germinação ocorra de forma homogênea (GOUVÊA; MAIA, 2014).

O bagaço de malte é o resíduo sólido úmido obtido após filtração ao final dos processos iniciais da produção de cerveja, sendo proveniente do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído (CORDEIRO; EL-AOUAR; GUSMÃO, 2012). Representa, aproximadamente, 85% dos subprodutos gerados, sendo considerado o principal resíduo do processo cervejeiro, correspondente a uma produção de cerca de 14 a 20 kg de bagaço de malte

para cada 100 litros de cerveja produzida (LUFT, 2016; OLIVEIRA et al., 2016). A Figura 3.1 mostra os processos que levam à obtenção do bagaço de malte.

Figura 3.1 – Representação do processo de obtenção do bagaço de malte.



Fonte: Dragone (2007)

A utilização de bagaço de malte como substrato para produção de enzimas amilolíticas se apresenta como uma boa alternativa, uma vez que este possui entre 11,60% e 32,14% de teor de amido em sua composição (MATTOS, 2010; LUFT, 2016).

3.3. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é descrita como o processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente neste tipo de cultivo encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (PINTO et al., 2005). Devido à ausência de água livre, fermentadores menores podem ser utilizados e há uma maior facilidade na realização dos processos de recuperação dos produtos (NOVAKI et al., 2010). Os parâmetros de temperatura, aeração, pH e umidade, além dos tipos e concentrações de substratos e microrganismos, são as principais variáveis operacionais no processo de fermentação em estado sólido (RODRÍGUEZ-ZUÑIGA et al., 2011).

Neste tipo de fermentação, o microrganismo se desenvolve sobre a superfície do substrato, ou dentro de sua matriz, consumindo seus nutrientes e secretando metabólitos, dentre os quais se destacam as enzimas (SANTANA, 2012). Amilases, celulasas, lipases, proteases e invertases são exemplos de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido (GUSMÃO et al., 2014). Como principais vantagens, a fermentação em estado sólido apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, que, por sua vez, são menos suscetíveis a inibições e suas enzimas produzidas são mais estáveis, mesmo quando sofrem variações de temperatura e pH (RODRÍGUEZ-ZUÑIGA et al., 2011).

O interesse por esta categoria de fermentação vem crescendo devido a sua simplicidade, manutenção de condições similares às de crescimento natural dos microrganismos, do consumo de energia reduzido e da baixa complexidade dos equipamentos e sistemas de controle utilizados (NOVAKI et al., 2010). Além disto, a fermentação em estado sólido se destaca por permitir o aproveitamento de resíduos sólidos (PINTO et al., 2005). Estes subprodutos provenientes de processos agroindustriais são usados como substrato para o crescimento celular, servindo de fonte de energia para o crescimento dos microrganismos e fornecendo nutrientes necessários para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (MENONCIN et al., 2009). Os substratos utilizados na fermentação em estado sólido são classificados de acordo com sua fonte de carbono principal, sendo estas amido, celulose e açúcares solúveis (ORLANDELLI et al., 2012).

Dentre as características principais da fermentação em estado sólido estão a atuação do substrato como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento dos microrganismos, a aeração do meio ocorre a pressões baixas, o crescimento microbiano ocorre em condições próximas às de seus habitats naturais e há uma alta heterogeneidade do meio de cultivo (PINTO et al., 2005). Os substratos utilizados possuem baixa atividade de água, sendo semelhantes às condições naturais de crescimento dos microrganismos em seus habitats, acarretando uma grande produção de enzimas (MENONCIN et al., 2009).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos, que se beneficiam de suas estruturas de desenvolvimento vegetativo para realizar o crescimento em matrizes sólidas porosas (SANTANA, 2012). Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um bom crescimento em substratos com baixo teor de atividade de água e concentrações elevadas de açúcares e sais, fazendo deste um gênero microbiano indicado para cultivo sob fermentação em estado sólido (GUSMÃO et al., 2014). Uma grande gama de enzimas extracelulares é

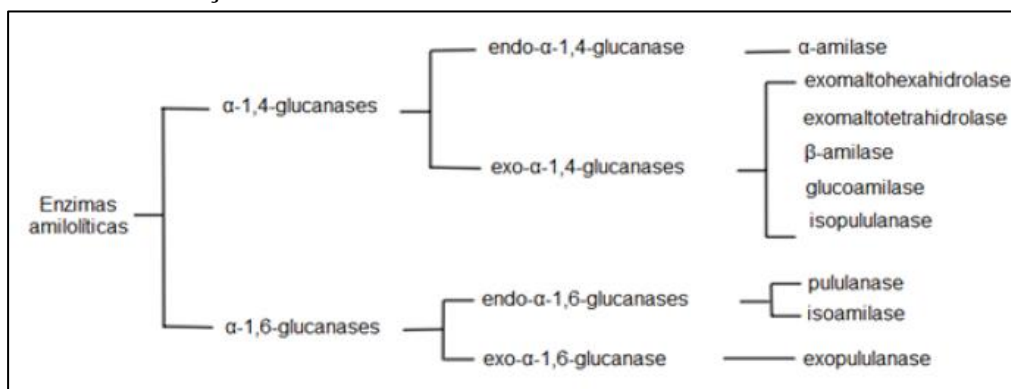
produzida pelas diversas espécies de *Aspergillus* em cultivo em estado sólido, das quais várias possuem aplicações em processos da indústria biotecnológica (SANTANA, 2012).

3.4. Amilases

As amilases, também conhecidas como enzimas amilolíticas, formam um grupo enzimático que atua na hidrólise de moléculas de amido. Estas enzimas têm ampla distribuição na natureza e podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de atuação sobre as moléculas de amido (FERNANDES et al., 2007; GRIEBELER et al., 2015). Podem ser obtidas a partir de microrganismos, cereais e animais, são bastante utilizadas pelas indústrias farmacológicas, têxteis e alimentícias, e são responsáveis por cerca de 25 a 33% da produção mundial de enzimas, sendo superadas apenas pelas proteases. Amido e resíduos amiláceos são os substratos mais adequados para se obter uma produtividade alta de amilases (BIAZUS et al., 2010; CARVALHO et al., 2008).

As amilases podem ser divididas em duas categorias principais, sendo classificadas como endoamilases e exoamilases. As endoamilases hidrolisam o interior das moléculas de amido aleatoriamente, formando oligossacarídeos de diversos comprimentos de cadeia, enquanto as exoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não-redutora, resultando em produtos finais pequenos (GUPTA et al., 2003). As enzimas amilolíticas também podem ser divididas em α -amilases, que clivam as ligações glicosídicas no interior do substrato, em β -amilases, que fazem a hidrólise nas extremidades não-redutoras, e as glicoamilases, que liberam unidades de glicose das extremidades não-redutoras das moléculas (LUFT, 2016). A Figura 3.2 mostra uma das formas de classificações das enzimas amilolíticas.

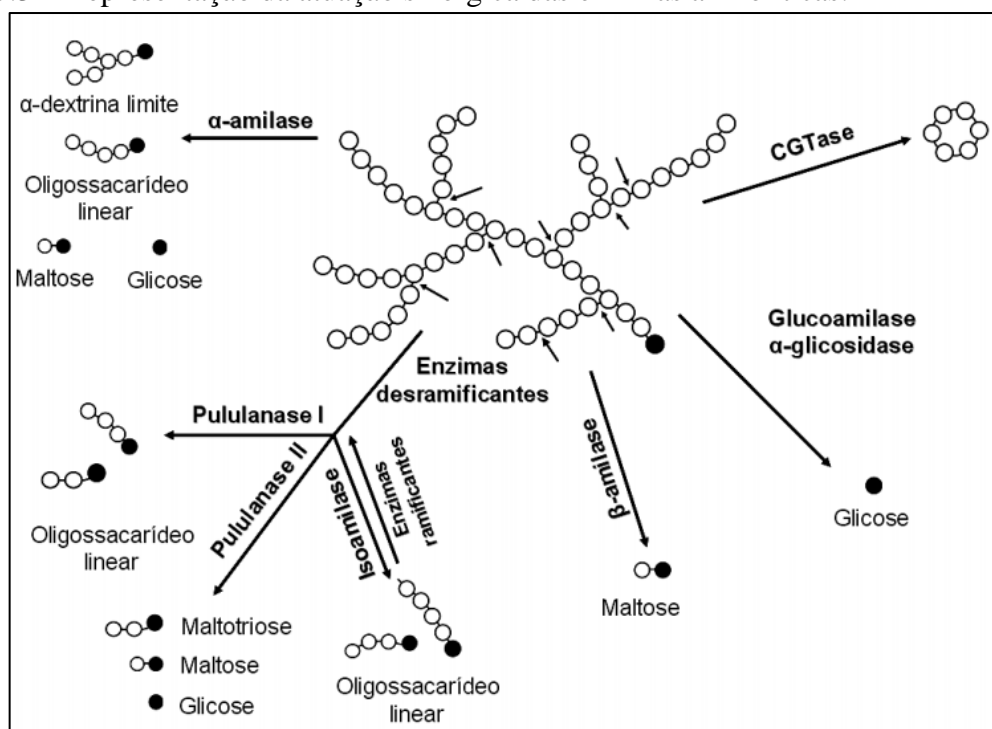
Figura 3.2 – Classificação das enzimas amilolíticas.



Fonte: Luft (2016)

As α -amilases hidrolisam ligações do tipo α -1,4, sendo divididas em sacarificantes, que produzem glicose e maltose a partir da hidrólise de cerca de 50 a 60% do amido, e em liquidificantes, que provocam rápida redução da sua viscosidade. As β -amilases, por sua vez, hidrolisam a penúltima ligação α -1,4, gerando duas unidades de glicose na forma de β -maltose. Enquanto as glicoamilases clivam as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido, levando à produção de glicose (CARVALHO, 2007). A Figura 3.3 representa o mecanismo da atuação sinérgica das enzimas amilolíticas.

Figura 3.3 – Representação da atuação sinérgica das enzimas amilolíticas.



Fonte: Cucolo (2009)

Dentre as diversas enzimas amilolíticas, a α -amilase é considerada a mais importante, pois tem atuação fundamental na conversão do amido em produtos menores, que podem ser utilizados por outras enzimas (CARVALHO et al., 2008). As α -amilases e β -amilases têm seus pHs ótimos entre 4,5 e 6,5 e suas temperaturas ótimas estão compreendidas entre 55 e 75 °C (BIAZUS et al., 2010).

A termoestabilidade das enzimas determina a velocidade do processo, uma vez que condições de temperaturas elevadas aumentam a taxa da reação (LEMOES 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). Bactérias, como as do gênero *Bacillus*, produzem α -amilases mais termoestáveis que as de origem fúngica. (DELATORRE et al., 2010).

3.5. Extração de enzimas

A extração sólido-líquido, também conhecida como lixiviação, é uma operação unitária que consiste na dissolução preferencial dos solutos desejados por meio do contato entre um sólido e um solvente líquido (SOUZA; SILVA; CONRADO, 2012). É um procedimento utilizado como etapa inicial para a recuperação das enzimas obtidas por fermentação em estado sólido, sendo etapa preliminar à purificação e tendo como objetivo obter o extrato bruto contendo a enzima na forma solúvel (MÉLO, 2016; VESCOVI, 2012).

Ao final da fermentação, os sólidos contêm células do fungo, substrato, enzimas e outros metabólitos. As enzimas não estão distribuídas homogeneamente no meio fermentado, logo, uma extração eficiente é determinante para a produção comercial da enzima (NOVAKI et al., 2010). Os solventes mais utilizados na recuperação de enzimas são a água destilada, tampões, soluções salinas diluídas e soluções aquosas de glicerol (MÉLO, 2016).

Nos processos de extração de enzimas, observa-se a influência de diversas variáveis, com destaque para a preparação dos sólidos, razão sólido/solvente, temperatura do processo, pH do solvente, tensão superficial do líquido, velocidade de agitação do sistema, e a presença de reação química (FERNÁNDEZ, 2009). Vários estudos consideraram como principais fatores para otimização de extração de enzimas a agitação do sistema, tempo de contato entre solvente e substrato fermentado, e a relação entre volume de solvente e massa de substrato (MÉLO, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Bagaço de malte

O bagaço de malte utilizado neste trabalho, mostrado na Figura 4.1, foi um resíduo proveniente da produção de cerveja artesanal do tipo Blond Ale, tendo este sido seco em estufa com circulação de ar a 55 °C e, posteriormente, armazenado a temperatura ambiente em recipiente plástico.

Figura 4.1 – Bagaço de malte utilizado.



Fonte: Autor (2019)

A caracterização deste bagaço de malte foi realizada por Aleixo Júnior (2018), tendo este as características descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Caracterização físico-química do bagaço de malte.

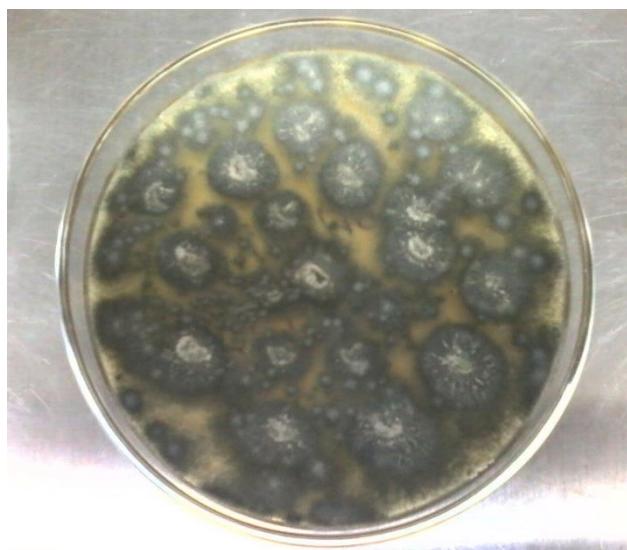
Parâmetro	Bagaço de malte
Densidade Aparente (g/mL)	0,14
Massa Específica (g/mL)	0,91
Porosidade	0,84
°Brix (%)	10,83
pH	5,8
Umidade (%)	8,5
Cinzas (%)	8,37
Proteínas (%)	21,83
Açúcares Redutores (g/L)	1,07
Açúcares Totais (g/L)	16,08

Fonte: Aleixo Júnior (2018)

4.1.2. Microrganismo

O fungo filamentoso utilizado para produção de amilases foi o *Aspergillus* sp. FSDE16, mostrado na Figura 4.2, sendo este isolado do solo de descanso da Usina Agroindustrial Japungu, Santa Rita – PB, por Gonçalves (2017). As culturas foram preservadas em placas de Petri contendo meio BDA (ágar, batata, dextrose) e mantidas sob refrigeração.

Figura 4.2 – Placa de Petri contendo *Aspergillus* sp. FSDE16.



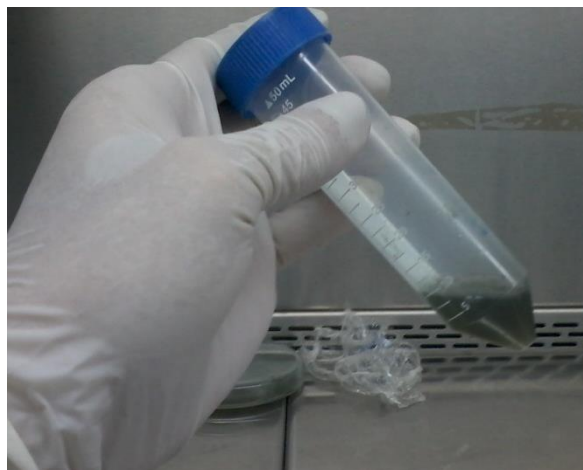
Fonte: Autor (2019)

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado através da suspensão em água destilada esterilizada dos esporos produzidos pelo *Aspergillus* sp. FSDE16 na placa de Petri contendo meio BDA. Primeiramente, água destilada foi adicionada aos poucos sobre os esporos presentes na placa e, em seguida, a raspagem da mesma foi realizada com alça de platina para facilitar a dissolução dos esporos na água. Ao final do processo de raspagem da placa e dissolução dos esporos na água destilada, foi obtida uma solução concentrada do inóculo, como mostrado na Figura 4.3.

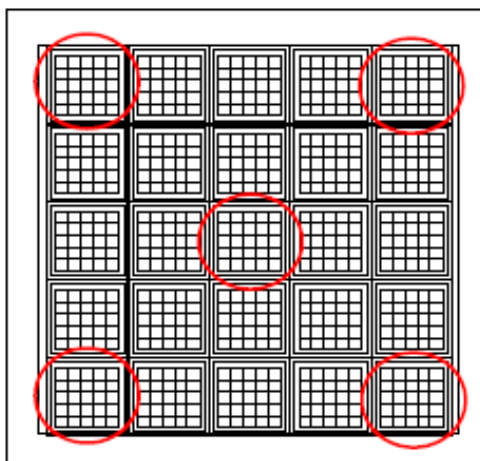
Figura 4.3 – Solução concentrada de inóculo.



Fonte: Autor (2019)

Para determinação do volume de inóculo a ser adicionado ao meio de cultivo, foi necessário estimar a concentração de esporos presentes na solução concentrada de inóculo. Para isto, foi preparada uma solução diluída do inóculo inicial, através da adição de 0,5 mL do mesmo a um tubo Falcon, posterior adição de 3,5 mL de água destilada ao tubo e, por fim, homogeneização do conteúdo. Em seguida, foi realizada a contagem dos esporos se utilizando da câmara de Neubauer, mostrada na Figura 4.4.

Figura 4.4 – Representação da câmara de Neubauer.



Fonte: Rocha (2016)

A câmara de Neubauer é uma lâmina especial utilizada para contagem direta do número de esporos numa solução, com auxílio de um microscópio. Ela contém 25 quadrantes totais, dos quais foram contados os esporos contidos nos cinco quadrantes destacados na Figura 4.4. Este valor obtido foi extrapolado para os demais quadrantes e utilizado para estimar a concentração de esporos na solução de inóculo inicial concentrada, através da Equação 4.1.

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \sum_{i=1}^{N=5} X_i * 5 * 10^4 * FD \quad (4.1)$$

Onde:

- X_i = Quantidade de esporos num dado quadrante;
- 5 = Fator de expansão dos quadrantes contados para o total de quadrantes;
- 10^4 = Fator de conversão de mm^3 para cm^3 ;
- FD = Fator de diluição.

Posteriormente, o volume da solução inicial de inóculo a ser adicionado ao meio de cultivo foi determinado através da Equação 4.2.

$$\text{Volume de inóculo (mL)} = \frac{C_D * m_S}{C_I} \quad (4.2)$$

Onde:

- C_D = Concentração desejada de esporos (esporos/g);
- C_I = Concentração da suspensão de inóculo (esporos/mL);
- m_S = Massa de substrato usado como meio de cultivo (g).

4.2.2. Cultivo para produção de amilases

Para produção de amilases, o *Aspergillus* sp. FSDE16 foi cultivado em meio sólido composto por bagaço de malte, como substrato, cuja umidade foi ajustada para 70% através da adição de uma solução de sais (sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L), condição descrita pelo trabalho de Araújo (2018) como ótima para produção de enzimas.

A primeira etapa para realização do cultivo foi o ajuste da umidade do meio para 70%. De conhecimento da umidade do bagaço de malte utilizado como substrato, a solução de umidificação, composta por sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L, foi preparada e sua quantidade necessária para manutenção da umidade desejada foi calculada através da Equação 4.3.

$$m_{SU} = \frac{m_S * (U_D - U_S)}{(1 - U_D)} \quad (4.3)$$

Onde:

- m_{SU} = Massa da solução de umidificação (g);
- m_S = Massa de substrato usado como meio de cultivo (g);
- U_D = Umidade desejada para o meio;
- U_S = Umidade inicial do substrato.

Após o devido ajuste da umidade do meio, foram adicionados, aproximadamente, 100 gramas do bagaço de malte umidificado em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, em duplicata. Os frascos foram fechados com tampões feitos de algodão, gaze e papel kraft e os meios de cultivo foram esterilizados por calor úmido sob pressão em autoclave durante 20 minutos, à temperatura de 121 °C.

Após resfriamento natural, à temperatura ambiente, os meios foram inoculados utilizando-se de pipeta automática com os volumes de inóculo correspondentes à concentração de 10^5 esporos por grama de meio de cultivo, sendo estes volumes calculados através da Equação 4.2. Os meios inoculados foram homogeneizados e incubados em estufa durante 5 dias, a uma temperatura média de 30 °C.

Figura 4.5 – Meios de cultivo imediatamente após inoculação.



Fonte: Autor (2019)

Ao fim do 5º dia de cultivo, o extrato enzimático foi obtido através da retirada de uma amostra de 10 gramas dos meios de cultivo, após devida homogeneização, e adição de água destilada na proporção de 30 mL por grama de amostra. A extração foi realizada durante 30 minutos, sob agitação manual, como descrito por Araújo (2018). Após passados os 30 minutos

de extração, o extrato enzimático obtido foi submetido a uma filtração simples com papel de filtro qualitativo, armazenado em tubos Falcon e congelados para utilização em análises posteriores.

4.2.3. Avaliação da termoestabilidade das amilases

Para avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas pelo *Aspergillus* sp. FSDE16, foi realizado o acompanhamento da atividade de α -amilase em pH 5,0, sendo esta a condição de pH ótima descrita pelo trabalho de Araújo (2018), durante um período de 8 horas de incubação do extrato enzimático nas temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C.

Tabela 4.2 – Experimentos de estabilidade das amilases.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Pontos Analisados
1	30	5,0	0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h
2	50	5,0	0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h
3	70	5,0	0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h

Fonte: Autor (2019)

A atividade de α -amilase foi determinada através de adaptação do procedimento descrito por Aiyer (2004). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de solução de amido solúvel 1%, onde o amido foi dissolvido em tampão citrato de sódio pH 5,0, e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático a cada tubo de ensaio. Os tubos foram colocados em banho térmico à respectiva temperatura do experimento durante 30 minutos para ocorrência da reação. Após esse tempo, foram adicionados 0,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) a cada tubo para interrupção da reação.

O branco das amostras foi preparado pela adição de 0,25 mL de tampão citrato de sódio e 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático em tubos de ensaio. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de reagente DNS a cada tubo de ensaio. O branco do espectrofotômetro foi preparado através da adição de 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL de reagente DNS em um tubo de ensaio.

Por fim, foi realizada a quantificação de açúcares redutores totais liberados pela reação, seguindo a metodologia proposta por Miller (1959). A partir do qual, foi possível calcular a atividade de α -amilase através da Equação 4.4, definindo uma unidade da atividade da enzima

(U) como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel, nas condições do ensaio (CARVALHO, 2007).

$$\text{Amilase} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{(A - B) * f * V_R * d * R}{0,18 * t_R * V_E} \quad (4.4)$$

Onde:

- A = Absorbância da amostra;
- B = Absorbância do branco da amostra;
- f = Fator de conversão da curva do reagente DNS (mg/mL);
- V_R = Volume do meio reacional (mL);
- d = Fator de diluição da amostra;
- R = Razão entre volume de solvente por massa de meio de cultivo (mL/g);
- 0,18 = Fator de conversão de miligramas para micromol de glicose (mg/ μmol);
- t_R = Tempo de reação (min);
- V_E = Volume de enzima no meio reacional (mL).

Para facilitar a análise do comportamento de termoestabilidade das α -amilases ao longo do período de incubação, os resultados também foram apresentados em função das atividades relativas. As atividades relativas para um dado tempo, nas diferentes temperaturas de incubação, foram calculadas de acordo com a Equação 4.5.

$$\text{Atividade Relativa \% (t)} = \frac{\text{Atividade (t)}}{\text{Atividade (t = 0)}} * 100\% \quad (4.5)$$

4.2.4. Condições de extração das amilases

O estudo para obtenção da melhor condição de extração das amilases produzidas por um novo cultivo do *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte foi realizado através de planejamento experimental fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais, avaliando a influência da variação dos parâmetros de velocidade de agitação, tempo de extração e razão entre volume de solvente por massa de meio de cultivo nas respostas de saída, que foram determinadas como as atividades de α -amilase, em U/g e U/mL.

As velocidades de agitação avaliadas foram as de 100, 150 e 200 rpm, os tempos de extração escolhidos foram de 20, 40 e 60 minutos, enquanto as razões entre volume de solvente por massa de meio de cultivo foram de 10, 20 e 30 mL/g, como descrito na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Planejamento fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais para as condições de extração.

Variáveis	-1	0	+1
Velocidade de agitação (rpm)	100	150	200
Tempo de extração (min)	20	40	60
Razão solvente/massa de meio (mL/g)	10	20	30

Fonte: Autor (2019)

Com base na variação destes 3 fatores, foram realizados 11 experimentos: 8 experimentos através da variação das condições de extração com os valores dos pontos extremos e 3 experimentos com os valores dos pontos centrais. A matriz obtida para o planejamento experimental fatorial está representada pela Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Matriz do planejamento experimental fatorial das condições de extração.

Experimento	Velocidade de agitação (rpm)	Tempo de extração (min)	Razão solvente/massa do meio (mL/g)
1	100 (-1)	20 (-1)	10 (-1)
2	200 (+1)	20 (-1)	10 (-1)
3	100 (-1)	60 (+1)	10 (-1)
4	100 (-1)	20 (-1)	30 (+1)
5	200 (+1)	60 (+1)	30 (+1)
6	100 (-1)	60 (+1)	30 (+1)
7	200 (+1)	20 (-1)	30 (+1)
8	200 (+1)	60 (+1)	10 (-1)
9	150 (0)	40 (0)	20 (0)
10	150 (0)	40 (0)	20 (0)
11	150 (0)	40 (0)	20 (0)

Fonte: Autor (2019)

As extrações foram realizadas em amostras de 5 gramas do meio de cultivo após fermentação sólida, utilizando água destilada como solvente, sob agitação em incubadora shaker, à temperatura de 30 °C. Após cada extração, os respectivos extratos enzimáticos foram submetidos a filtração simples com papel de filtro qualitativo e armazenados para utilização em análises posteriores. A atividade de α -amilase foi determinada através de adaptação do procedimento descrito por Aiyer (2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da termoestabilidade das amilases

Os extratos enzimáticos foram incubados em banho térmico, durante 8 horas, nas temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C. Nos tempos de 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h foram realizadas análises da atividade de α -amilase dos extratos. Os resultados obtidos para a termoestabilidade das amilases a diferentes temperaturas podem ser visualizados no gráfico representado pela Figura 5.1. Enquanto os resultados obtidos para as atividades relativas das amilases a diferentes temperaturas podem ser vistos na Figura 5.2.

Figura 5.1 – Termoestabilidade das amilases a diferentes temperaturas.

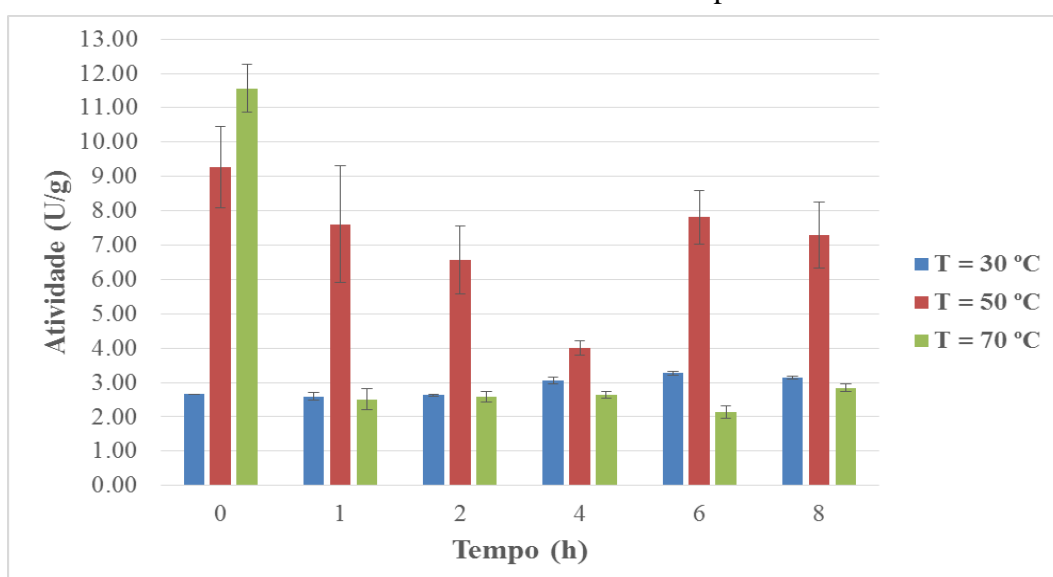
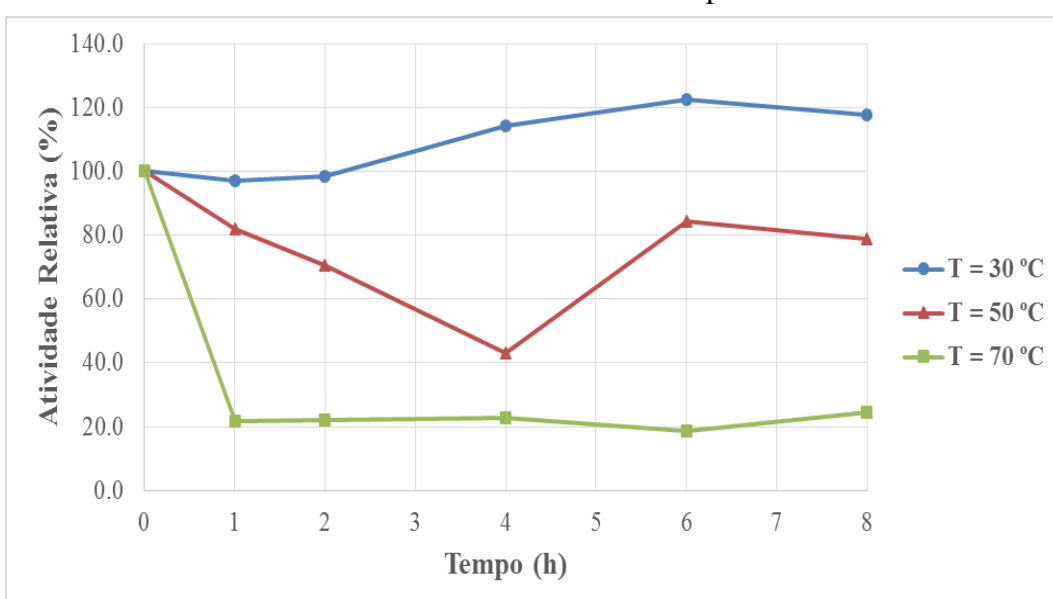


Figura 5.2 – Atividade relativa das amilases a diferentes temperaturas.



Os resultados mostraram que as α -amilases produzidas pelo *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte possuem uma melhor termoestabilidade para a temperatura de 30 °C, tendo aumentado sua atividade de $2,67 \pm 0,00$ U/g no tempo inicial para $3,14 \pm 0,05$ U/g ao final das 8 horas de incubação, sem sofrer alterações bruscas ao longo do tempo, resultando num aumento de, aproximadamente, 17,6% em comparação com atividade enzimática inicial.

Já para a temperatura de 50 °C, as α -amilases não apresentaram uma termoestabilidade satisfatória, uma vez que a atividade enzimática variou bastante ao longo do tempo, fato evidenciado pela queda brusca de $9,27 \pm 1,17$ U/g para $4,00 \pm 0,20$ U/g ao final das 4 horas iniciais de incubação e posterior recuperação da atividade para $7,30 \pm 0,96$ U/g ao final das 8 horas de incubação, valor correspondente a, aproximadamente, 78,7% da atividade enzimática inicial. Isto pode ter ocorrido devido a uma concentração do extrato enzimático ao longo do processo de incubação. Entretanto, mesmo com as variações bruscas na atividade ao longo do tempo, a incubação a 50 °C promoveu uma atividade maior que as outras incubações para todos os tempos do intervalo entre 1 hora e 8 horas, como pode ser observado na Figura 5.1.

Os dados experimentais também indicam que há uma grande queda no valor da atividade das α -amilases incubadas a 70 °C já na primeira hora de incubação, tendo esta caído de $11,57 \pm 0,70$ U/g no tempo inicial para $2,51 \pm 0,31$ U/g na primeira hora e estabilizado em torno deste valor nas 7 horas seguintes, finalizando a incubação com atividade de $2,84 \pm 0,12$ U/g, o que corresponde a, aproximadamente, 24,6% da atividade enzimática inicial.

O estudo de Silva et al. (2018) reporta que as amilases produzidas por *Metarhizium anisopliae* não possuem termoestabilidade satisfatória a 30 °C, sendo observada grande variação nos valores da atividade enzimática ao longo dos 60 minutos de incubação.

Garcia (2013) observou que a atividade das amilases produzidas por *Colletotrichum graminicola* tem queda contínua até atingir, aproximadamente, 28% da atividade inicial, quando o extrato enzimático é incubado a 50 °C por 60 minutos. Enquanto Oliveira (2013) relata que a atividade das enzimas amilolíticas produzidas por rizóbio INPA R020 varia de 6,12 U/mL até 1,00 U/mL entre 5 e 45 minutos de incubação a 50 °C, o que representa uma queda de, aproximadamente, 83,7% na atividade enzimática.

Bernardes et al. (2014) relatam que a atividade das α -amilases produzidas pelo fungo *Rhizomucor miehei* e incubadas a 70 °C decresce para, aproximadamente, 27% da atividade inicial ao final de 12 minutos de incubação. Astolpho, Carmo e Astolfi-Filho (2017) observaram

uma queda de 52,6% na atividade das α -amilases produzidas por clone recombinante de *Bacillus licheniformis* DSM13 e *Pichia pastoris* após 60 minutos de incubação, a 70 °C. Enquanto o estudo de Freitas, Martins e Ferreira (2014) relata uma diminuição de, aproximadamente, 70% na atividade das α -amilases produzidas por *Syncephalastrum racemosum* após incubação por 60 minutos, a 70 °C.

5.2. Avaliação das condições de extração das amilases

Seguindo o planejamento experimental elaborado para determinar as melhores condições de extração das amilases produzidas, foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resultados obtidos para os experimentos de extração das amilases.

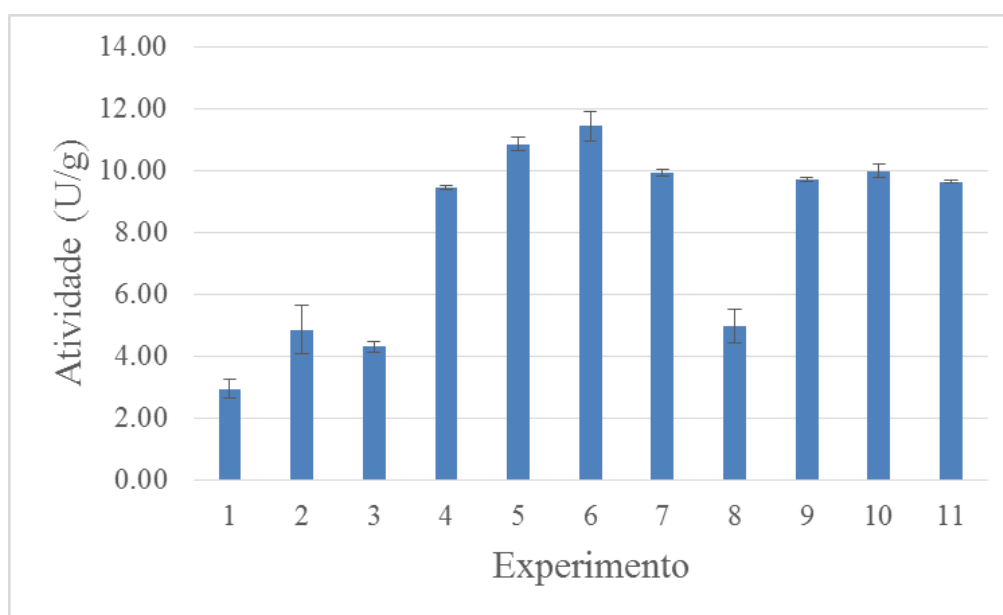
Experimento	Velocidade (rpm)	Tempo (min)	Razão (mL/g)	Atividade (U/g)	Atividade (U/mL)
1	100 (-1)	20 (-1)	10 (-1)	$2,95 \pm 0,31$	$0,295 \pm 0,031$
2	200 (+1)	20 (-1)	10 (-1)	$4,87 \pm 0,80$	$0,487 \pm 0,080$
3	100 (-1)	60 (+1)	10 (-1)	$4,31 \pm 0,17$	$0,431 \pm 0,017$
4	100 (-1)	20 (-1)	30 (+1)	$9,44 \pm 0,07$	$0,315 \pm 0,002$
5	200 (+1)	60 (+1)	30 (+1)	$10,86 \pm 0,22$	$0,362 \pm 0,007$
6	100 (-1)	60 (+1)	30 (+1)	$11,43 \pm 0,49$	$0,381 \pm 0,016$
7	200 (+1)	20 (-1)	30 (+1)	$9,92 \pm 0,11$	$0,331 \pm 0,004$
8	200 (+1)	60 (+1)	10 (-1)	$4,97 \pm 0,55$	$0,497 \pm 0,055$
9	150 (0)	40 (0)	20 (0)	$9,71 \pm 0,07$	$0,485 \pm 0,004$
10	150 (0)	40 (0)	20 (0)	$9,98 \pm 0,22$	$0,499 \pm 0,011$
11	150 (0)	40 (0)	20 (0)	$9,64 \pm 0,05$	$0,482 \pm 0,003$

A partir dos resultados mostrados na Tabela 5.1, as avaliações das melhores condições de extração foram realizadas de acordo com as duas respostas de saída monitoradas, que foram as atividades das α -amilases por massa de meio (U/g) e por volume de extrato (U/mL). A análise estatística dos resultados também foi realizada, com auxílio do *Software* Statistica, versão 12, visando ilustrar os efeitos das variáveis nas respostas de saída.

5.2.1. Atividade por massa de meio como resposta de saída

Com os dados experimentais mostrados na Tabela 5.1, foi possível plotar o gráfico de barras com os resultados, para facilitar a determinação da melhor condição de extração das amilases, utilizando-se de atividade de α -amilase por massa de meio (U/g) como resposta de saída. O gráfico obtido está representado na Figura 5.3.

Figura 5.3 – Atividade de α -amilase por massa de meio para cada experimento.



Observando os resultados mostrados no gráfico da Figura 5.3, é possível constatar que os experimentos 6 e 5 proporcionaram as maiores atividades de α -amilase por massa de meio de cultivo, sendo os valores de atividade obtidos iguais a $11,43 \pm 0,49$ U/g e $10,86 \pm 0,22$ U/g, respectivamente. Logo, os resultados mostram que as extrações mais eficazes, quando analisadas quanto a resposta de saída de atividade U/g, foram as realizadas nas condições de 100 rpm, 60 minutos e 30 mL/g, e 200 rpm, 60 minutos e 30 mL/g, respectivamente.

Os resultados da análise estatística realizada no *Software* Statistica estão representados na Tabela 5.2, que relaciona os parâmetros do modelo estatístico. Para o intervalo de confiança utilizado, que foi de 95%, o modelo estatístico obtido teve coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,86094, o que indica que o modelo possui boa correlação entre os valores experimentais e os previstos.

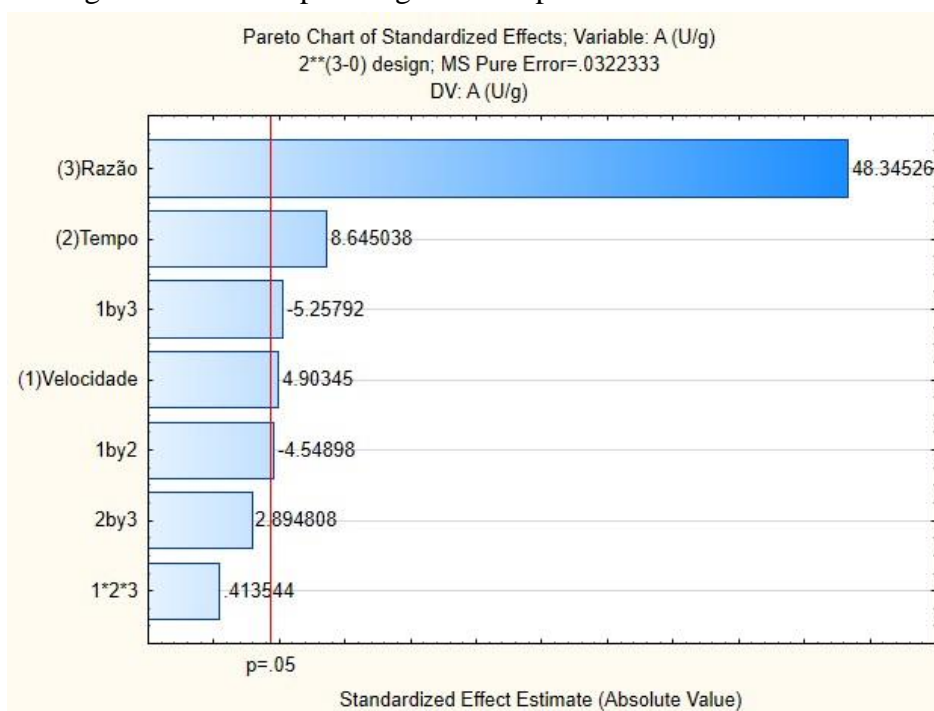
Tabela 5.2 – Parâmetros do modelo estatístico para U/g.

Fatores	Coefficientes	Desvio Padrão	Valor p	Limite Inferior (-95%)	Limite Superior (+95%)
Média	8,007273	$\pm 0,054132$	0,000046	7,774360	8,240185
Velocidade (V)	0,311250	$\pm 0,063476$	0,039164	0,038136	0,584364
Tempo (t)	0,548750	$\pm 0,063476$	0,013118	0,275636	0,821864
Razão (R)	3,068750	$\pm 0,063476$	0,000428	2,795636	3,341864
V*t	-0,288750	$\pm 0,063476$	0,045082	-0,561864	-0,015636
V*R	-0,333750	$\pm 0,063476$	0,034321	-0,606864	-0,060636
t*R	0,183750	$\pm 0,063476$	0,101490	-0,089364	0,456864
V*t*R	0,026250	$\pm 0,063476$	0,719334	-0,246864	0,299364

De acordo com a Tabela 5.2, pode-se observar que os efeitos das interações entre os fatores de tempo e razão e entre os fatores de velocidade, tempo e razão, destacados pela cor vermelha na tabela, não são considerados estatisticamente significativos para a elaboração do modelo matemático, pois possuem valor $p > 0,05$ e seus intervalos de confiança para 95% compreendem o valor zero.

Outra forma de determinar quais são as variáveis significativas em um experimento é através da análise do diagrama de Pareto, que está mostrado na Figura 5.4. As variáveis são consideradas estatisticamente significativas quando seus respectivos gráficos de barras ultrapassam a linha do coeficiente de significância.

Figura 5.4 – Diagrama de Pareto para U/g como resposta de saída.



O diagrama de Pareto representado na Figura 5.4 mostra que os efeitos das interações entre os fatores de tempo e razão e entre os fatores de velocidade, tempo e razão não são estatisticamente significativos para o processo, confirmando o que os resultados mostrados na Tabela 5.2 já haviam evidenciado. O diagrama também mostra que o fator de razão é o que possui maior influência nos resultados, sendo esta influência positiva. Logo em seguida, vem o fator de tempo, que também possui influência positiva, de interação entre os fatores de velocidade e razão, que possui influência negativa, o fator de velocidade, com influência positiva e de interação entre os fatores de velocidade e tempo, com influência negativa. Os quatro fatores citados anteriormente possuem, aproximadamente, uma influência de mesma ordem no processo de extração das amilases.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 5.2, a equação do modelo estatístico foi obtida, desconsiderando os fatores que não são estatisticamente significativos. A Equação 5.1 representa a equação obtida para o modelo estatístico.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{g} \right) = 8,007273 + 0,31125 V + 0,54875 t + 3,06875 R - 0,28875 V * t - 0,33375 V * R \quad (5.1)$$

Onde:

- V = Velocidade de agitação (rpm);
- t = Tempo de extração (minutos);

- R = Razão entre volume de solvente/massa de meio (mL/g).

A partir do *Software Statistica*, também foi possível gerar as superfícies de resposta dos resultados do planejamento experimental. Esses gráficos permitem realizar a otimização das condições de extração através da plotagem da atividade de α -amilase em função de duas de suas variáveis, como mostrado nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7.

Figura 5.5 – Superfície de resposta em função do tempo e velocidade.

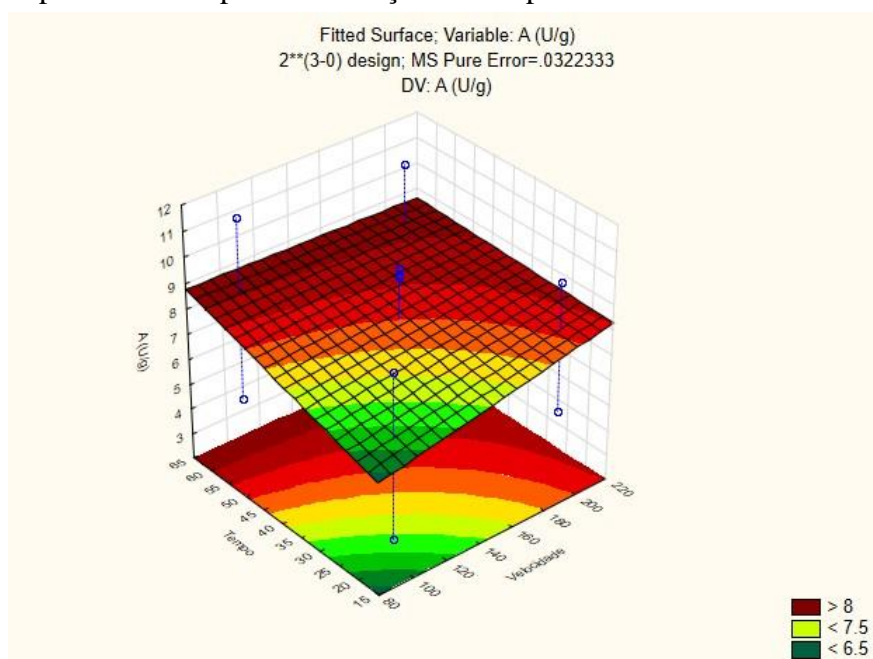


Figura 5.6 – Superfície de resposta em função do razão e velocidade.

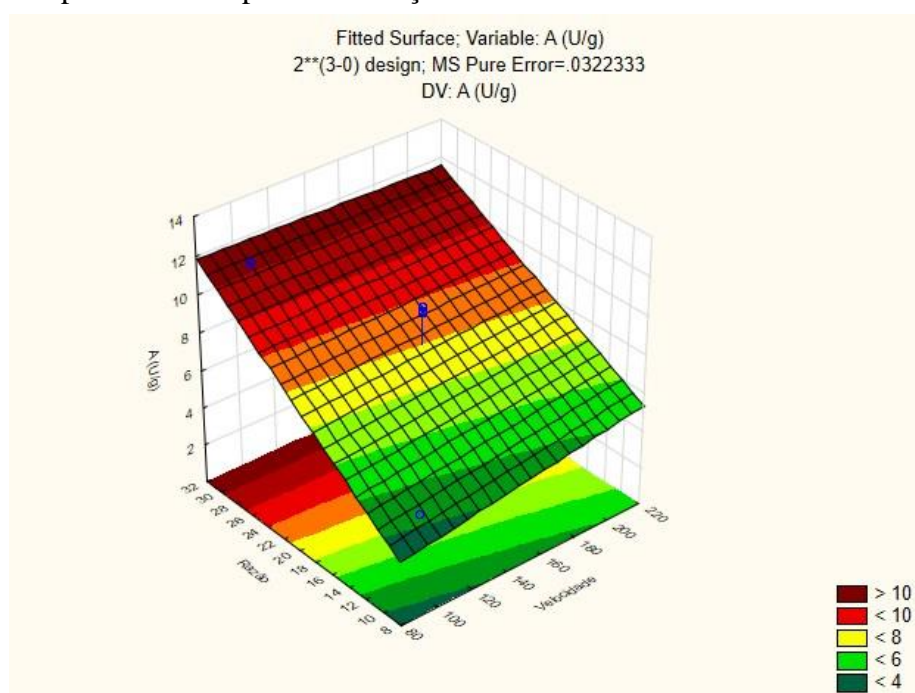
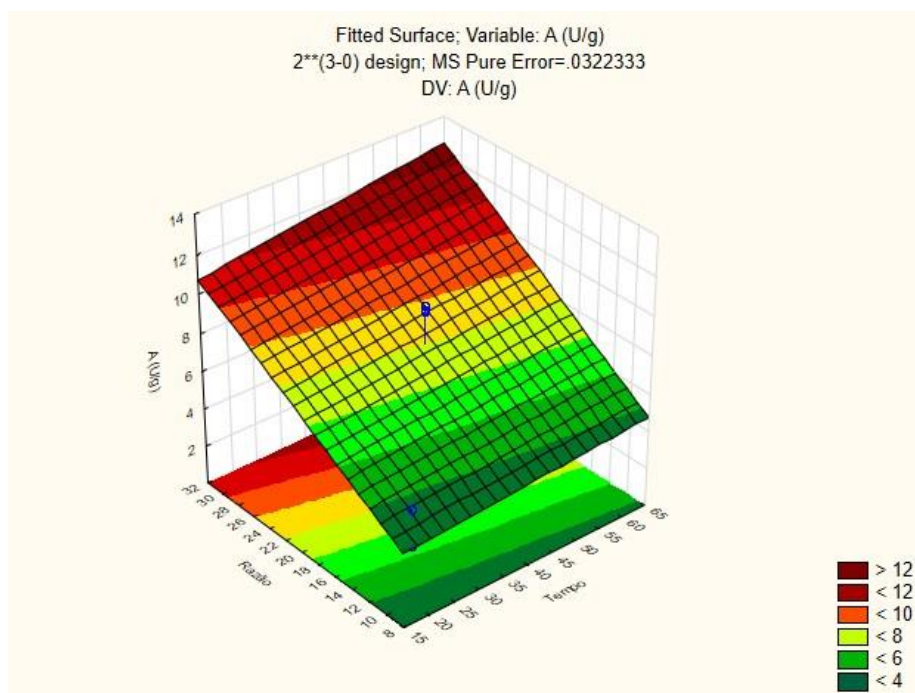


Figura 5.7 – Superfície de resposta em função do tempo e razão.



A partir da visualização das superfícies de resposta obtidas, é possível observar o quanto a atividade das amilases varia de acordo com a variação dos parâmetros da extração.

A superfície de resposta representada pela Figura 5.5 mostra que a atividade (U/g) das amilases aumenta de acordo com o aumento da velocidade de agitação e o tempo de extração, quando a razão é fixada no ponto central de 20 mL/g, atingindo os valores mais elevados a partir de 200 rpm e 50 minutos.

Por sua vez, a Figura 5.6 indica que, quando o tempo de extração é fixado no ponto central de 40 minutos, a razão é o fator mais determinante para a atividade (U/g) das amilases, e a velocidade de agitação possui pouca influência, tendo esta atingido os valores mais elevados a partir de uma razão de 24 mL/g.

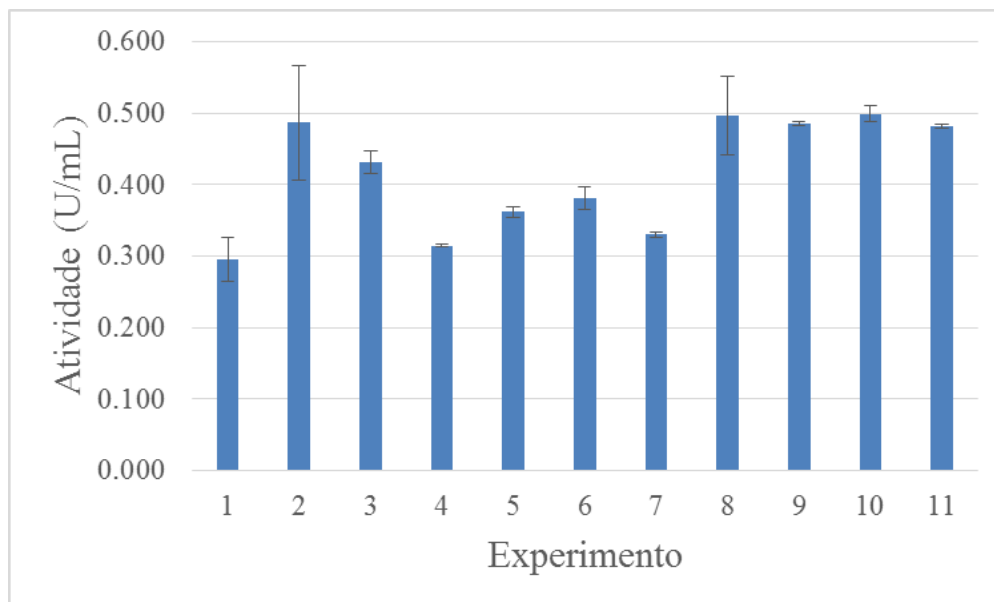
Por fim, observa-se na Figura 5.7 que, quando a velocidade de agitação é fixada em seu ponto central de 150 rpm, a razão é, mais uma vez, o fator mais determinante para a atividade (U/g) das amilases, e o tempo de extração possui moderada influência, tendo esta atingido os valores mais elevados a partir de uma razão de 30 mL/g.

5.2.2. Atividade por volume de extrato como resposta de saída

Similarmente à seção anterior, o gráfico de barras com os resultados mostrados na Tabela 5.1 foi plotado para determinação das melhores condições de extração das amilases,

desta vez considerando a atividade de α -amilase por volume de extrato (U/mL) como resposta de saída, como representado pela Figura 5.8.

Figura 5.8 – Atividade de α -amilase por volume de extrato para cada experimento.



A partir da análise do gráfico da Figura 5.8, é possível constatar que os melhores resultados para atividade por volume de extrato enzimático foram obtidos para os experimentos 8 e 2, sendo seus valores iguais a $0,497 \pm 0,055$ U/mL e $0,487 \pm 0,080$ U/mL, respectivamente, e para os pontos centrais do experimento, em especial o experimento 10, que apresentou a maior atividade dentre os experimentos realizados, sendo esta igual a $0,499 \pm 0,011$ U/mL.

Desta forma, os resultados mostram que as extrações mais eficazes, quando analisadas quanto a resposta de saída de atividade U/mL, foram as realizadas nas condições de 200 rpm, 60 minutos e 10 mL/g, nas condições do ponto central (150 rpm, 40 minutos e 20 mL/g), e 200 rpm, 20 minutos e 10 mL/g, respectivamente.

A Tabela 5.3 mostra os resultados da análise estática realizada no *Software* Statistica. Para o intervalo de confiança utilizado, que foi de 95%, o modelo estatístico obtido teve coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,64782, o que indica que o modelo não possui uma boa correlação entre os valores experimentais e os previstos.

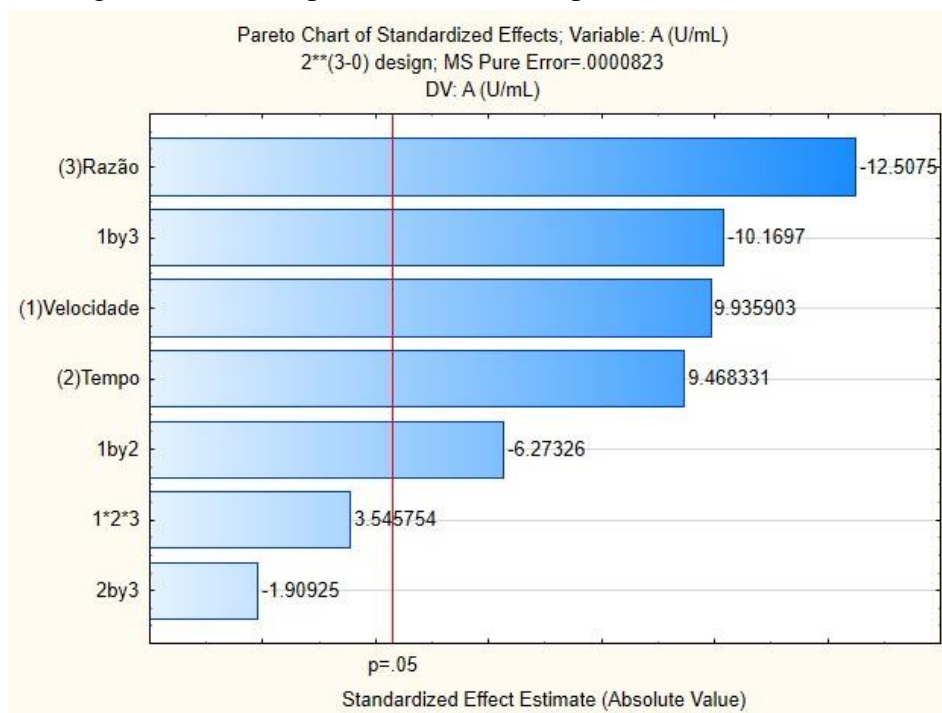
Tabela 5.3 – Parâmetros do modelo estatístico para U/mL.

Fatores	Coefficientes	Desvio Padrão	Valor p	Limite Inferior (-95%)	Limite Superior (+95%)
Média	0,415000	$\pm 0,002736$	0,000043	0,403229	0,426771
Velocidade (V)	0,031875	$\pm 0,003208$	0,009978	0,018072	0,045678
Tempo (t)	0,030375	$\pm 0,003208$	0,010971	0,016572	0,044178
Razão (R)	-0,040125	$\pm 0,003208$	0,006332	-0,053928	-0,026322
V*t	-0,020125	$\pm 0,003208$	0,024481	-0,033928	-0,006322
V*R	-0,032625	$\pm 0,003208$	0,009531	-0,046428	-0,018822
t*R	-0,006125	$\pm 0,003208$	0,196433	-0,019928	0,007678
V*t*R	0,011375	$\pm 0,003208$	0,071155	-0,002428	0,025178

A Tabela 5.3 informa que os efeitos das interações entre os fatores de tempo e razão e entre os fatores de velocidade, tempo e razão, destacados pela cor vermelha na tabela, não são considerados estatisticamente significativos, similarmente ao caso onde a atividade por massa de meio era a resposta de saída, pois possuem valor $p > 0,05$ e seus intervalos de confiança para 95% compreendem o valor zero.

O diagrama de Pareto mostrado na Figura 5.9 confirma a conclusão tirada a partir da Tabela 5.3, pois os gráficos de barras dos efeitos fatores de interação referidos anteriormente não ultrapassaram a linha do coeficiente de significância.

Figura 5.9 – Diagrama de Pareto para U/mL como resposta de saída.



O diagrama também mostra que o fator de razão, novamente, é o que possui maior influência nos resultados para a atividade das amilases, entretanto, ao contrário dos resultados obtidos para a atividade em U/g, esta influência foi negativa. Logo em seguida, vem o fator da interação entre velocidade e razão, que também possui influência negativa, os fatores de velocidade e tempo, ambos com influência positiva e o fator da interação entre velocidade e tempo, que possui influência negativa na atividade das amilases extraídas.

Como o coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi baixo, sendo este considerado um modelo de baixa preditibilidade, optou-se pela não obtenção da equação do modelo estatístico e das superfícies de respostas.

6. CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados neste trabalho, foi observado que a termoestabilidade das amilases produzidas por cultivo de *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte é comprometida com o aumento da temperatura de incubação do extrato enzimático. Entretanto, apesar da não-manutenção satisfatória da termoestabilidade pelas amilases a 50 °C, esta temperatura foi a que proporcionou a maior atividade enzimática ao longo das 8 horas de incubação.

Na avaliação das condições de extração das amilases, utilizando-se da atividade por massa de meio como resposta de saída, o modelo estatístico obtido teve uma boa correlação com os valores experimentais, e seu diagrama de Pareto evidenciou que a razão foi o fator de maior influência nos resultados, sendo esta positiva, e que os efeitos das interações entre os fatores de tempo e razão e entre os fatores de velocidade, tempo e razão não foram estatisticamente significativos.

Por fim, para a avaliação das condições de extração, tendo a atividade por volume de extrato como resposta de saída, o modelo estatístico foi considerado pouco preditivo, e seu diagrama de Pareto apresentou que o parâmetro de razão foi o mais influente nos resultados, sendo sua influência negativa, e que os efeitos das interações entre os fatores de tempo e razão e entre os fatores de velocidade, tempo e razão não foram estatisticamente significativos.

7. REFERÊNCIAS

- AIYER, P.V.D. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004.
- ALEIXO JÚNIOR, M.E. **Produção e caracterização de enzimas produzidas por *Penicillium* sp FSDE 15 usando bagaço de malte**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- ARAÚJO, L.A. **Cinética da produção de amilases produzido por *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte**. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- ASTOLPHO, H.A.; CARMO, E.J.; ASTOLFI-FILHO, S. Expressão e caracterização de α -amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13 em levedura *Pichia pastoris*. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 3, p. 107-118, 2017.
- BELETI, M.A.; DUARTE, F.; GEORG-KRAEMER, J.E. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 467-473, 2012.
- BENASSI, V.M. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de minas gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Revista Unimontes Científica**, v. 20, n. 1, p. 150-169, 2018.
- BERNARDES, A.V. *et al.* Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -amilase por *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, p. 1439-1451, 2014.
- BIAZUS, J.P.M. *et al.* Purificação de amilases de malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.
- CARVALHO, R.V. **Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

CARVALHO, R.V. *et al.* Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008.

CASTILHO, L.R. *et al.* Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CERVBRASIL. **Anuário 2016**. Associação Brasileira das Indústrias de Cerveja, 2017. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

COELHO, G.D. *et al.* Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p. 286-297, 2018.

CORDEIRO, L.G.; EL-AOUAR, A.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.

CUCOLO, G.R. **Produção de ciclodextrinas a partir de amidos de diferentes fontes vegetais e seu emprego na inclusão molecular de aroma cítrico**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009.

DELATORRE, A.B. *et al.* Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas online**, v. 4, n. 16, p. 132-145, 2010.

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

FERNANDES, L.P. *et al.* Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FERNÁNDEZ, D.E.R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2009.

FREITAS, L.S.; MARTINS, E.S.; FERREIRA, O.E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

GARCIA, R.C. **Produção e caracterização parcial das amilases de *Colletotrichum graminicola***. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GONÇALVES, A.Z.L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2006.

GONÇALVES, L.C.T.C. **Bioprospecção de fungos celulolíticos provenientes da agroindústria para produção de bioetanol**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

GOUVÊA, L.F.C.; MAIA, G.D. Avaliação do poder germinativo e teor de proteína para sementes de cevada brasileira com vistas ao processo de malteação. **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, p. 760-764, 2014.

GRIEBELER, N.E. *et al.* Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 13, n. 685, p. 13-22, 2015.

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

GUSMÃO, R.O. *et al.* Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, 2014. Disponível em: <<https://scientiaplena.emnuvens.com.br/sp/article/view/2052/1083>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

LEMO, C.M.Y. *et al.* Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 86-94, 2003.

LUFT, L. **Hidrólise enzimática do bagaço de malte usando tecnologias alternativas visando à obtenção de açúcares fermentescíveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MANERA, A.P. *et al.* Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de Beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, 2011.

MARCUSSO, E.F.; MÜLLER, C.V. **A cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/@@@download/file/A%20CERVEJA%20N%20BRASIL-28.08.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

MARCUSSO, E.F.; MÜLLER, C.V. **Anuário da cerveja no Brasil em 2018: Crescimento e inovação**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018/@@@download/file/ANU%20C3%81RIO%20DA%20CERVEJA%20NO%20BRASIL%202018-29.01.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

MATTOS, C. **Desenvolvimento de um pão de fibras a partir do bagaço de malte**. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MÉLO, B.C.A. **Produção de celulasas por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia* sp.) utilizando *Trichoderma reesei***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MENONCIN, S. **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.

MENONCIN, S. *et al.* Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.

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

NASCIMENTO FILHO, W.B.; FRANCO, C.R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

NOVAKI, L. *et al.* Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**, v. 12, n. 2, p. 131-140, 2010.

OLIVEIRA, C.F.D. *et al.* Bagaço de malte como substrato para produção de biopigmentos produzidos por *Monascus ruber* CCT 3802. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 6-9, 2016.

OLIVEIRA, C.M. **Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes de *Bacillus* sp. provenientes de solos amazônicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

ORLANDELLI, R.C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

ORTENZIO, Y.T. *et al.* Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2015.

PINTO, G.A.S. *et al.* Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico Online** – Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.

PORTO, P.D. **Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão**. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

REINEHR, C.O. *et al.* Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

ROCHA, J.C. **Produção de celulases e xilanases utilizando o *Penicillium* sp. FSDE15.** Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U.F. *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROSA, M.F., *et al.* Valorização de resíduos da agroindústria. *In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais.* Foz do Iguaçu, PR: [s.n.], p. 98-105, 2011. Disponível em: <<http://www.sbera.org.br/2sigera/obras/p12.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

SANTANA, R.S.M. **Produção de enzimas amilolíticas através de fermentação em estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SIGMA-ALDRICH. **Catálogo de produtos.** 2019. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=alfa+amilase&interface=All&N=0&mode=partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SILVA, G.M.H. *et al.* Produção de amilase e protease obtidas por *Metarhizium Anisopliae* Var. *Anisopliae* através da fermentação em estado sólido. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p. 486-502, 2018.

SLEIMAN, M. **Determinação do percentual de malte de cevada em cervejas tipo Pilsen utilizando os isótopos estáveis do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$).** Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

SOUZA, C.A.B.; SILVA, F.L.H.; CONRADO, L.S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 7, p. 790–794, 2012.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres.** Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, 2012.