

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DE MANDIOCA**

JOÃO PESSOA – PB

2021

AMANDA LETÍCIA DE CARVALHO CARDOSO SIMÕES

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DE MANDIOCA**

JOÃO PESSOA – PB

2021

AMANDA LETÍCIA DE CARVALHO CARDOSO SIMÕES

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S593p Simões, Amanda Letícia de Carvalho Cardoso.
Produção de amilases por cultivo em estado sólido e
hidrólise enzimática de resíduos de mandioca / Amanda
Letícia de Carvalho Cardoso Simões. - João Pessoa,
2021.
70 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Coorientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Enzimas - Produção. 2. Fontes de nitrogênio. 3.
Resíduo - Crueira. 4. Resíduo - Casca de mandioca. 5.
Hidrólise enzimática - Resíduos da mandioca. I. Santos,
Sharline Florentino de Melo. II. Sousa, Carlos Alberto
Bispo de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 577.15(043)

AMANDA LETÍCIA DE CARVALHO CARDOSO SIMÕES

**PRODUÇÃO DE AMILASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DE MANDIOCA**

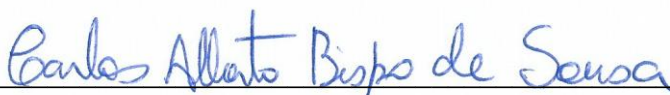
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 26.07.2021.

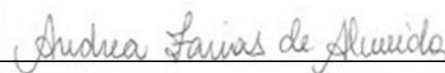
BANCA EXAMINADORA



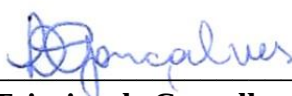
**Prof^a.Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos – PPGEQ/CT/UFPB
(Orientadora)**



**Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – PPGEQ/CT/UFPB
(Coorientador)**



**Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida – PPGEQ/CT/UFPB
(Examinadora Interna)**



**Prof^a. Dr^a. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves – DTS/CTDR/UFPB
(Examinadora externa)**

Dedico este trabalho a Deus, pois tudo é para Ele e por Ele, e aos meus pais, por todo amor e dedicação em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ser minha fortaleza, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Eufrasia e Adson, por todo o amor e dedicação ao longo desta caminhada.

Aos meus irmãos Pedro e Ester, por toda a compreensão e ajuda em todos os momentos.

Ao meu esposo Thiago, por todo o amor, compreensão, carinho, apoio e por estar sempre ao meu lado.

A todos os meus familiares, pelo amor e apoio ao longo dessa jornada.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a.Sharline Florentino, por ter me aberto as portas no mundo da pesquisa, por toda a dedicação, paciência e apoio para realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Bispo, por todos os ensinamentos, dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

Aos membros da banca pela disposição, contribuição e colaboração para melhoria deste trabalho.

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por toda atenção, disponibilidade e contribuição para a minha formação.

A todos os meus amigos do mestrado e pesquisa, em especial Felipe, Carol e Riann, por toda a ajuda e parceria.

A toda equipe do Laboratório de Bioengenharia e colaboradores dos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química, em especiala Débora, pela colaboração e paciência ao longo da pesquisa.

Por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a CAPES pela contribuição para concretização da minha formação.

*“Rendam graças ao Senhor, pois Ele é bom; o
seu amor dura para sempre”.
(1 Crônicas 16:34)*

RESUMO

O Brasil gera grande quantidade de resíduos provenientes de atividades agrícolas. Estes resíduos são considerados ótimas fontes de energia para serem utilizados em diversos bioprocessos, devido a riqueza nutricional ainda existente. A mandioca está entre uma das culturas mais produzidas no Brasil e dentre os processamentos desta na indústria, um dos principais resíduos gerados é a casca de mandioca. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de amilases pelos fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16 por cultivo em estado sólido e hidrólise enzimática de resíduos de mandioca utilizando o extrato enzimático produzido. A cinética de produção enzimática por *Penicillium* sp. FSDE15 foi avaliada com a realização de cultivos contendo bagaço de malte, variando a proporção das fontes indutoras, casca de mandioca e crueira, em 0%, 10% e 20%, durante 7 dias sob temperatura de 30°C. Para verificar a influência de diferentes nutrientes no meio de cultivo foram realizados experimentos a partir de um planejamento fatorial de 2⁴ avaliando diferentes concentrações de sulfato de amônia, extrato de levedura, fosfato de potássio e casca de mandioca, pelo *Penicillium* sp. FSDE15 cultivado durante 4 dias. O umedecimento do meio sólido foi avaliado de duas formas distintas: com uma solução contendo nutrientes e sem nutrientes. Foi realizado o cultivo dos fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16, separadamente, em meio contendo 70% de farelo de trigo e 30% de casca durante 5 dias à 36°C. Todo o fermentado obtido foi seco à 60°C durante 24h e após realizou-se a extração enzimática. Foi realizada a caracterização das enzimas amilases. A hidrólise enzimática dos resíduos da mandioca ocorreu em duas condições: triturados e moídos. As condições de hidrólise foram concentração de substrato de 10%(m/v), pH 5,0, temperatura 50°C e tempo de 24h. O melhor resultado para as fontes indutoras foi para o cultivo contendo 20% de casca, com atividade de amilases de 3,97 U/g. O cultivo realizado com água destilada apresentou valor de atividade enzimática de 13,62 U/g em 96h de cultivo. Para os experimentos realizados com os dois fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16, em 120h de cultivo, os valores de atividade de amilases foram de 19,33 U/g e 44,60 U/g, respectivamente. As condições ótimas para as amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15 foram pH 6,0 e temperatura 60°C, e apresentaram termoestabilidade nas temperaturas de 50 a 90 °C pelo tempo de duas horas. Já para as enzimas produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 o pH ótimo foi 5,0 e temperatura ótima de 50°C, e termoestáveis à 50°C durante duas horas. Para a hidrólise enzimática, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os resíduos moídos, com a casca o melhor valor de concentração de AR obtido foi de 22,61 g/L em 24h, enquanto com a crueira o melhor valor de concentração de AR obtido foi de 21,01 g/L em 24h de processo. O fungo *Aspergillus* sp. FSDE16 demonstrou bom desempenho para a produção de amilases. Os resíduos da mandioca, se mostraram promissores para obtenção de açúcares redutores através da hidrólise enzimática.

Palavras-chave: enzimas; fontes de nitrogênio; crueira; casca de mandioca; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Brazil generates a large amount of waste from agricultural activities. These residues are considered excellent energy sources to be used in various bioprocesses, due to the nutritional richness still existing. Cassava is among the most produced crops in Brazil and among its processing in the industry, one of the main residues generated is cassava bark. The objective of this work was to evaluate the production of amyloses by the fungi *Penicillium* sp. FSDE15 and *Aspergillus* sp. FSDE16 by solid state cultivation and enzymatic hydrolysis of cassava residues using the enzymatic extract produced. The kinetics of enzymatic production by *Penicillium* sp. FSDE15 was evaluated with the performance of crops containing malt bagasse, varying the proportion of inducing sources, cassava peel and crueira, by 0%, 10% and 20%, for 7 days at 30°C. To verify the influence of different nutrients in the culture medium, experiments were carried out based on a factorial planning of 24 evaluating different concentrations of ammonia sulfate, yeast extract, potassium phosphate and cassava bark, by *Penicillium* sp. FSDE15 grown for 4 days. The damping of the solid medium was evaluated in two different ways: with a solution containing nutrients and without nutrients. The fungi *Penicillium* sp. FSDE15 and *Aspergillus* sp. FSDE16, separately, in medium containing 70% wheat bran and 30% peel for 5 days at 36°C. All fermented was dried at 60°C for 24 h and after enzymatic extraction was performed. Amyloses were characterized. Enzymatic hydrolysis of cassava residues occurred under two conditions: crushed and ground. Hydrolysis conditions were substrate concentration of 10%(m/v), pH 5.0, temperature 50°C and 24h time. The best result for inducing sources was for cultivation containing 20% bark, with amylase activity of 3.97 U/g. Cultivation performed with distilled water presented enzymatic activity value of 13.62 U/g in 96h of cultivation. For the experiments carried out with the two fungi *Penicillium* sp. FSDE15 and *Aspergillus* sp. FSDE16, in 120h of cultivation, the activity values of amyloses were 19.33 U/g and 44.60 U/g, respectively. The optimal conditions for amyases produced by *Penicillium* sp. FSDE15 was pH 6.0 and temperature 60°C, and showed thermostability at temperatures from 50 to 90 °C for a time of two hours. For enzymes produced by *Aspergillus* sp. FSDE16 the optimum pH was 5.0 and optimum temperature was 50°C, and thermostable at 50°C for two hours. For enzymatic hydrolysis, the best results were obtained using the ground residues, with the bark the best AR concentration value obtained was 22.61 g/L in 24h, while with the raw the best AR concentration value obtained was 21.01 g/L in 24h of process. The fungus *Aspergillus* sp. FSDE16 demonstrated good performance for the production of amyloses. Cassava residues were shown to be promising to obtain reducing sugars through enzymatic hydrolysis.

Keywords: enzymes; nitrogen sources; cruising; cassava peel; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	18
Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca	19
Figura 3 – Representação do processo de obtenção do bagaço de malte	22
Figura 4 – Representação esquemática da ação das enzimas amilases	24
Figura 5 – Representação da estrutura da amilose (a) e amilopectina (b)	25
Figura 6 – Fluxograma do estudo para produção das amilases	30
Figura 7 – Bagaço de malte	31
Figura 8 – Resíduos de mandioca (a) Casca de mandioca e (b) Cruera	31
Figura 9 – Farelo de trigo	32
Figura 10 – Microrganismo <i>Penicillium</i> sp. FSDE15: (a) Frente e (b) Verso.....	32
Figura 11– Microrganismo <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16: (a) Frente e (b) Verso.....	32
Figura 12 – Cinética de atividade enzimática de amilases por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 em meios contendo bagaço de malte, bagaço e cruera e bagaço e casca de mandioca.....	39
Figura 13 – Diagrama de Pareto mostrando a influência da adição de nutrientes do meio de bagaço de malte na atividade de amilase por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15.....	43
Figura 14 – Gráfico dos valores preditivos versus observados	45
Figura 15 – Superfície de resposta para a atividade de amilase em função do Sulfato (%) e Fosfato (%)	45
Figura 16 – Cinética de produção de amilases por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 em meio contendo bagaço de malte e casca de mandioca umedecidos com água destilada.....	47
Figura 17 – Avaliação do pH ótimo para atividade de amilase produzida por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	48
Figura 18 – Avaliação da temperatura ótima para atividade de amilase produzida por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	49
Figura 19 – Avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	50
Figura 20 – Cinética de produção de amilasespor <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16 em meio contendo farelo de trigo e casca de mandioca.....	51
Figura 21 – Avaliação do pH ótimo para atividade das enzimas amilases produzidas por <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16.....	53
Figura 22 – Avaliação da temperatura ótima para atividade das enzimas amilases produzidas por <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	54

Figura 23–Avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	55
Figura 24 – Crueira (a) triturada e (b) moída	56
Figura 25 – Casca de mandioca (a) triturada e (b) moída	56
Figura 26 – Concentração de açúcares redutores (AR) durante a hidrólise enzimática dos resíduos (a) casca de mandioca e (b) crueira	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química média do farelo de trigo	23
Tabela 2 – Valores das variáveis independentes	34
Tabela 3 – Influência da adição de Sulfato de amônia (S), Fosfato de potássio (F), Extrato de levedura (E) e Casca de mandioca (C) na atividade de amilase	42
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de amilase	44
Tabela 5 – Valores de atividade enzimática após secagem do fermentado	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CULTURA DA MANDIOCA	18
2.1.1 CASCA DE MANDIOCA	19
2.1.2 CRUEIRA	20
2.2 BAGAÇO DE MALTE	21
2.3 FARELO DE TRIGO	22
2.4 AMILASES	24
2.5 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)	26
2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	28
3 METODOLOGIA	30
3.1 SUBSTRATOS	30
3.2 MICRORGANISMOS	32
3.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	33
3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES USANDO BAGAÇO DE MALTE E RESÍDUOS DE MANDIOCA PELO <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	33
3.4.1 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MEIO DE CULTIVO	34
3.5 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DESTILADA EM SUBSTITUIÇÃO À SOLUÇÃO DE NUTRIENTES DO MEIO	35
3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16 E <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 USANDO FARELO DE TRIGO E CASCA DE MANDIOCA	35
3.7 SECAGEM DO FERMENTADO	35
3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS PELOS FUNGOS <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 E <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	36
3.8.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
3.8.2 AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE ENZIMÁTICA	36
3.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
3.10 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA MANDIOCA	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES EM MEIO COM BAGAÇO DE MALTE E RESÍDUOS DE MANDIOCA POR <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	39
4.1.1 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MEIO DE CULTIVO	41
4.2 UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DESTILADA EM SUBSTITUIÇÃO A ADIÇÃO DE NUTRIENTES	46
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR <i>Penicillium</i> sp. FSDE15	48
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16 E <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 USANDO FARELO DE TRIGO E CASCA DE MANDIOCA	50
4.5 SECAGEM DO FERMENTADO	52
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	53
4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE MANDIOCA	56
5 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma economia bastante ligada à agricultura, gerando assim grande quantidade de resíduos agroindustriais. Em geral, estes resíduos incluem os subprodutos que são gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou atividades agrícolas (SANTOS et al., 2018).

Dentre os resíduos provenientes de atividades agroindustriais, temos os resíduos do processamento da mandioca, casca e crueira. A casca constitui grande parte dos resíduos gerados do processamento da mandioca, sendo obtida em diversos processos, principalmente da produção de farinha (ONA, HALLING e BALLESTEROS, 2018). Enquanto a crueira é o resíduo obtido na etapa de peneiramento do processo de produção da farinha da raiz da mandioca (PEREIRA JÚNIOR et al., 2013). Outro resíduo gerado em grande quantidade é o bagaço de malte, considerado o resíduo mais importante que é gerado pelas cervejarias, pois representa 85% dos subprodutos oriundos da fabricação da cerveja (VERDE et al., 2019).

Os resíduos agroindustriais necessitam de um beneficiamento adequado para evitar problemas de acúmulo e degradação ambiental (MARTINEZ, 2016). Eles, em grande parte, apresentam altos teores de matéria orgânica e certa quantidade de açúcares fermentescíveis, tornando-os uma boa e promissora alternativa para aplicação em diferentes processos biotecnológicos (GUSMÃO et al., 2014). Estes resíduos podem ser utilizados como substratos alternativos, principalmente na área de tecnologia enzimática e fermentação para obtenção de bioprodutos (ARAÚJO et al., 2017).

Os processos enzimáticos possuem custos elevados, pois é necessário produção e purificação da enzima. Como tecnologia promissora para a produção de enzima a baixo custo, está o cultivo em estado sólido (CES), que possui como principal característica a ausência de água livre. Neste tipo de cultivo utiliza-se como substrato resíduos agroindustriais e este material sólido atua como suporte e fontes de nutrientes para os microrganismos (RODRIGUES et al., 2015; PINHEIRO, AMBROZIM e OLIVEIRA, 2019). Dentre os microrganismos mais utilizados no CES, os fungos se destacam, pela semelhança com o seu habitat natural, podendo secretar enzimas para serem utilizadas em processos de hidrólise enzimática. Alguns dos principais gêneros utilizados na produção de enzimas são *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Humicola* (BOMTEMPO et al., 2017).

As enzimas possuem a capacidade de catalisar processos químicos com a vantagem de serem ecologicamente mais viáveis em relação aos catalisadores químicos (SANTOS e

ORLANDELLI, 2019). As amilases são um grupo de enzimas que possuem diversas aplicações industriais. Essas moléculas são responsáveis pela hidrólise do amido, podendo ser aplicadas em setores como indústria têxtil, alimentos, papel e celulose, farmacêutica, entre outras (ARAÚJO e MARTINS, 2018).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para aplicação destas enzimas na conversão de resíduos agroindustriais em produtos de valor agregado através da hidrólise, em especial os biocombustíveis (MORAES et al., 2017). Na hidrólise enzimática, as enzimas degradam as moléculas de polissacarídeos presentes na biomassa e disponibilizam açúcares fermentescíveis para posterior fermentação e produção alcoólica (HÉRNANDEZ et al., 2015).

Assim, o presente trabalho pretende obter amilases a partir do cultivo em estado sólido, usando fungos filamentosos e resíduos agroindustriais e fazer a hidrólise enzimática dos resíduos de mandioca usando o extrato enzimático bruto obtido.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de amilases pelos fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16 por cultivo em estado sólido utilizando bagaço de malte, farelo de trigo e resíduos de mandioca como substrato, caracterizar as enzimas produzidas bem como realizar a hidrólise enzimática dos resíduos de mandioca utilizando o extrato enzimático obtido.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar a produção de amilases usando bagaço de malte e resíduos de mandioca, casca e crueira, pelo *Penicillium* sp. FSDE15;
- b. Avaliar a suplementação do meio de cultivo com sulfato de amônia (2, 3 e 4%), fosfato de potássio (1, 2 e 3%), extrato de levedura (0, 0,5 e 1%) e casca de mandioca (20, 30 e 40%);
- c. Realizar a caracterização das enzimas produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 em relação a temperatura, pH e termoestabilidade;
- d. Avaliar a produção de amilases pelos fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16 usando farelo de trigo e casca de mandioca;
- e. Realizar a caracterização das amilases produzidas pelo *Aspergillus* sp. FSDE16 em relação ao pH, temperatura e termoestabilidade;
- f. Produzir as enzimas na melhor condição encontrada;

- g. Avaliar a hidrólise enzimática dos resíduos de mandioca utilizando as amilases produzidas como carga enzimática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta*), Figura 1, está entre uma das culturas mais produzidas no Brasil, é cultivada em todos os estados brasileiros e vem sendo cultivada na América Tropical há mais de 5 mil anos. É uma raiz que possui alto teor de amido, o que a torna uma ótima fonte de energia, tendo sua principal utilização na alimentação humana e animal (SANTOS, 2017).

Figura 1 – Mandioca (*Manihot esculenta*)



Fonte: EMBRAPA, 2021.

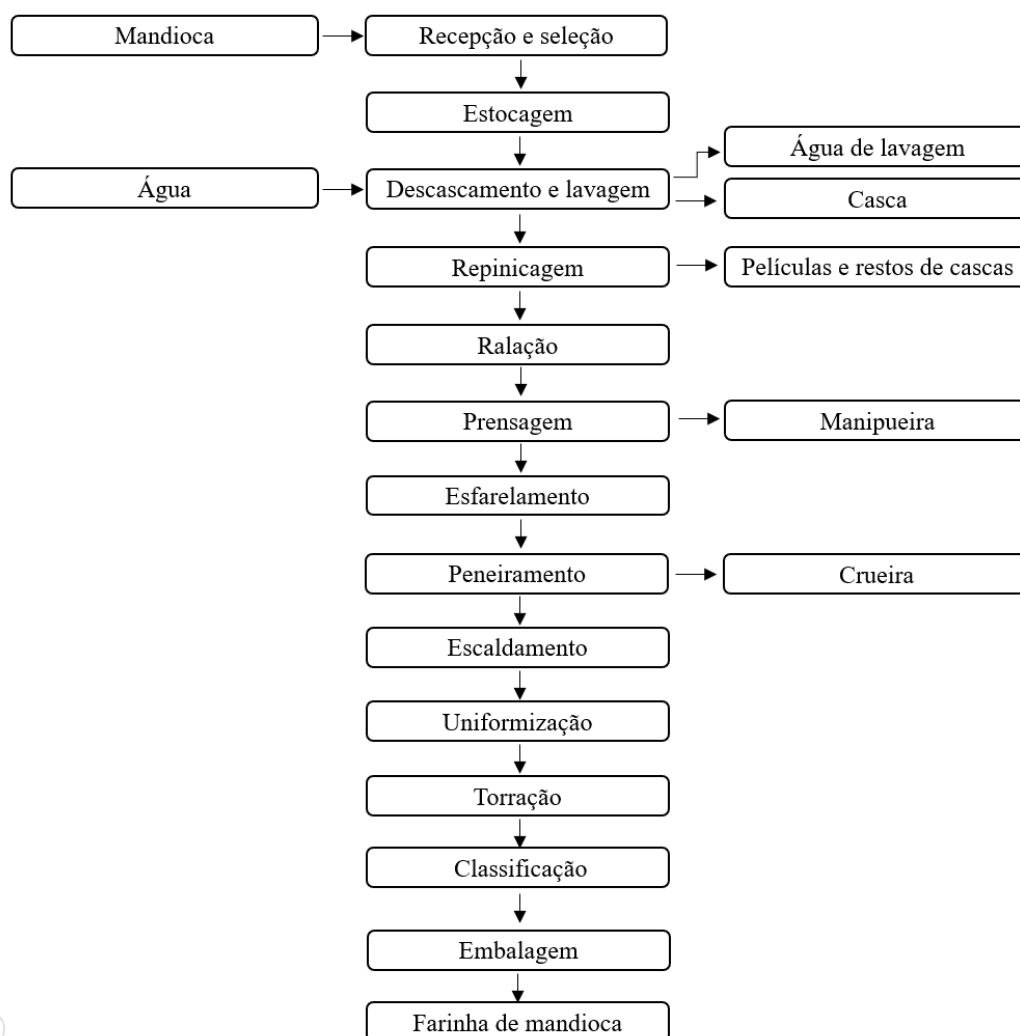
A cultura da mandioca é de grande importância no cenário socioeconômico brasileiro por ter participação de geração de emprego e renda, especialmente para pequenos produtores. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2019), a quantidade de mandioca produzida no país no ano de 2018 foi de aproximadamente 18 milhões de toneladas, e na Paraíba cerca de 139 mil toneladas, correspondendo a uma área cultivada de cerca de 1,2 milhões hectares e 14,9 mil hectares, respectivamente.

Destacam-se dentre os principais produtos oriundos da mandioca, a farinha de mandioca, a goma, a fécula e o tucupi (CARVALHO, 2016). Destes processamentos da mandioca muitos resíduos são gerados, podendo ser líquidos ou sólidos. Dentre os resíduos líquidos destaca-se a manipueira. Dentre os resíduos sólidos destacam-se: casca, entrecasca, crueira, fibra e bagaço (SILVA et al., 2018).

A farinha ocupa posição de destaque dentre os principais produtos obtidos a partir da mandioca. Está bastante presente na mesa dos brasileiros, podendo ser utilizada em diferentes

preparações de alimentos, o que a torna bastante popular (BEZERRA, 2006). O processo de obtenção da farinha de mandioca pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca



Fonte: Adaptado de BEZERRA (2006)

2.1.1 CASCA DE MANDIOCA

A casca de mandioca é um dos resíduos gerados na produção da farinha de mandioca, sendo constituído da casca, entrecasca e pontas de mandioca, apresentando elevador teor de umidade (KONOPKA, 2018).

Este resíduo é obtido após a colheita e transporte das raízes para as casas de farinha, na etapa de descascamento da raiz (ARAÚJO e LOPES, 2009). Estima-se que de toda a mandioca utilizada na indústria farinheira, cerca de 10% seja eliminado em forma de casca (CRUZ et al., 2011).

A casca possui em sua composição uma média de 30% de amido, 5% de açúcares, 11% de lignina, 5% de proteínas, 4% de minerais e pequenas quantidades de pectina, carboxil, hidroxila e aminogrupos (AJALA et al., 2020). Pooja et al. (2018) ao revisar a composição química da casca, reporta que este material contém cerca de 16% de amido, 36% de celulose, 9% de hemicelulose e 11% de lignina. De acordo com Vilhalva et al. (2012) a casca de mandioca apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta, 28,6% de fibra e 85% de umidade.

Por possuir alto teor de umidade presente, o transporte da casca para longas distâncias é difícil, pois a deterioração microbiana ocorre muito rápido. Muitas vezes a casca é seca antes da sua destinação final e armazenada em local aberto e/ou utilizada no próprio local de produção para alimentação animal (ARAÚJO e LOPES, 2009).

2.1.2 CRUEIRA

A crueira é um dos resíduos sólidos obtidos no processo de produção da farinha de mandioca. É composta de entrecascas, fiapos e raízes, sendo obtida na etapa de peneiramento do processo (PEREIRA JUNIOR et al., 2013). Estima-se que de toda a mandioca utilizada no processo de fabricação da farinha são gerados 3,89% de crueira (CRUZ et al., 2003).

Logo após a massa de mandioca ralada sair da prensa, ela está em formato de torrões e necessita passar pelo processo de esfarelamento, em seguida é realizada a separação da massa por peneiramento (AYACHE, 2015). As partículas grosseiras contidas na massa ficam retidas na peneira, sendo denominadas de crueira, enquanto a massa que passa pela peneira é destinada para a produção da farinha de mandioca (VENTURIN, 2017).

De acordo com Rocha et al. (2016), a crueira é rica em amido. Em seus estudos de caracterização físico-química deste resíduo, verificou que este resíduo possui cerca de 82% de amido, 2% de proteínas e 4% de fibra bruta. Machado (2014) ao revisar a composição físico-química da crueira, demonstra que este resíduo contém 81,1% de amido, 7,39% de fibras, 1,41% de proteínas e 0,90% de cinzas.

Por conter características como grande quantidade de amido, proteínas, sais, entre outras substâncias, a crueira se torna interessante para utilização em processos de bioconversão, como a obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol (COSTA et al., 2016). Uma outra alternativa para utilização deste resíduo é a alimentação de peixes através de enriquecimento proteico das rações (PEREIRA JUNIOR et al., 2013). Além destas, existem diversas alternativas para que este resíduo possa ser aproveitado e

transformado em fonte de energia afim de contribuir com a redução dos problemas ambientais e a crise energética mundial (SOUZA et al., 2019).

2.2 BAGAÇO DE MALTE

No Brasil, a indústria de cerveja cresce a cada ano, se destacando no mundo. Nos últimos anos, o país vem desenvolvendo um papel enorme entre os maiores produtores de cerveja mundiais e em 2016 chegou a produzir 14,1 bilhões de litros, sendo o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos (CERVBRASIL, 2017).

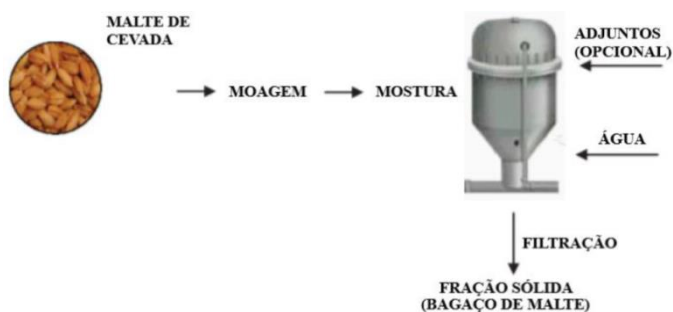
Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2020), nos últimos cinco anos houve um crescimento de 36,4% no número de cervejarias registradas no país, alcançando-se a marca de 1.209 estabelecimentos em 2019. A maior concentração está na região Sul-Sudeste, mas mostra grande avanço na região Nordeste. A cerveja é o produto mais registrado do MAPA e possui 27.329 registros válidos em todo o país, e só no ano de 2019 foram contabilizados 9.950 novos registros, apresentando crescimento exponencial nos últimos vinte anos.

No processo de produção da cerveja são gerados três resíduos principais: bagaço de malte, *trub* e levedo. O resíduo produzido em maior quantidade é o bagaço de malte, sendo gerados aproximadamente 15,4 milhões de toneladas por ano (TORRES e SILVA, 2016). Estima-se que o bagaço represente cerca de 85% de todo o resíduo gerado pela indústria cervejeira, pois para cada 100 litros de cerveja produzida é obtido aproximadamente 20 Kg de bagaço de malte após o processo de mosturação com cerca de 80% de umidade (LIMA, 2019).

Este resíduo é proveniente do processo inicial da fabricação da cerveja, que consiste no processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído e dos adjuntos milho, trigo, arroz (CORDEIRO, EL-AOUAR e GUSMÃO, 2012). Sua composição pode variar entre os cultivares, podendo ser atribuído aos fatores genéticos e condições ambientais, como época, local e tempo de plantio (CORDEIRO, 2011).

A escolha do processo de malteação, moagem e demais características relacionadas ao processo de fabricação da cerveja também influenciam na composição do bagaço de malte (CECCATO, 2019). Algumas das etapas que podem influenciar estão mostradas na Figura 3 através da representação deste processo.

Figura 3 – Representação do processo de obtenção do bagaço de malte



Fonte: CECCATO (2019)

O bagaço de malte é constituído principalmente pelas cascas de cevada malteada, sendo rico em amido, proteínas e fibras. É considerado um material lignocelulósico contendo em média 17% de celulose, 28% de hemicelulose e 28% de lignina, além dos extrativos, proteínas e cinzas em menores proporções (WISNIEWSKI, 2009).

Luft (2016) ao estudar a composição química do bagaço de malte, obteve valor de teor em massa de 32,14% de amido. Massardi, Massini e Silva (2020) ao revisar a composição química do bagaço de malte, abrangeu que a composição deste material é diversa, e em geral tem-se: celulose (16,8% - 20,6%), hemicelulose (18,4% - 28,4%), lignina (9,9% - 27,8%), proteínas (15,3% - 26,6%), extrativos (5,2% - 5,8%) e cinzas (2,7% - 4,6%).

O bagaço de malte não pode ser transportado para localidades distantes pois possui alto teor de umidade, podendo sofrer rápida deterioração microbiológica, então a sua destinação fica limitada, necessitando de tratamentos para ser encaminhado para longas distâncias (MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006). O principal destino é para alimentação animal. As principais cervejarias vendem para os intermediários, e estes transportam o bagaço até as fazendas próximas (LINHARES, 2018).

Devido a sua composição, o bagaço de malte tem potencial para ser empregado em diversos setores, comopanificação, adsorção, construção civil, secagem e processos fermentativos. O elevado teor de carbono e amido que possui o torna uma ótima fonte de alimentação para microrganismos empregados em processos de bioconversão (MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006).

2.3 FARELO DE TRIGO

O trigo (*Triticum aestevum*), pertencente à família das gramíneas, é um dos três grãos mais produzidos no mundo juntamente com o milho e o arroz, e tem ocupado posição de destaque devido à sua importância para economia global (NETO e SANTOS, 2017).

Segundo dados da análise de mercado realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2020), na safra de 2018/2019 a produção de trigo no país foi de aproximadamente 5,4 milhões de toneladas, o que corresponde à uma área plantada de cerca de 2 milhões de hectares. No ranking dos maiores produtores de trigo mundiais, o Brasil ocupa a posição de 16º lugar, e a estimativa de produção para a safra 2019/2020 é de 5,2 milhões de toneladas, permanecendo nesta posição.

O grão de trigo é bastante utilizado na alimentação básica, contendo cerca de 70% de carboidratos em sua composição. Além disto, contém muitos outros nutrientes benéficos para a microbiota intestinal, como proteínas, fibras, minerais, vitaminas, amido, açúcares, entre outros (BAKKER, 2017). Durante o seu processamento na indústria, na etapa de moagem do grão, são obtidos o farelo, o endosperma e o gérmen.

O farelo de trigo é formado pelo pericarpo, que constitui película externa e a camada protetora do grão, rico em fibras e minerais (NETO e SANTOS, 2017). Essa película não é digerida pelo organismo humano, sendo o farelo considerado um subproduto (BAKKER, 2017). O endosperma é constituído basicamente por carboidratos formados por amido, representa cerca de 80% do grão e dá origem a farinha de trigo branca (GWIRTZ et al., 2014). E o gérmen que contém lipídeos, representa em média 3% do grão e é a parte do grão que dá origem a uma nova planta (SCHEUER et al., 2011).

O farelo de trigo é um resíduo que possui muitos nutrientes em sua composição, como carboidratos, proteínas, amido, entre outros. Também é composto de celulose, hemicelulose e lignina, sendo caracterizado como uma biomassa lignocelulósica (MAO et al., 2019). Na Tabela (1), estão alguns valores da composição do farelo de trigo encontrados na literatura.

Tabela 1 – Composição química média do farelo de trigo

Componentes	Quantidade (%)	Referências
Carboidratos totais	56,8 – 75,0	Dobrevet al., 2007; Onipe et al., 2015
Celulose	9 - 25	Babu et al., 2018; Formela et al., 2016
Hemicelulose	28,9 - 32	Formela et al., 2016; Rodriguez-Zúnga, 2010
Lignina	2,5 – 10	Araújo et al., 2008; Wesendonck, 2012
Proteína	9,6 – 18,6	Onipe et al., 2015; Yan et al., 2015
Amido	11,8 – 24,7	Dobrev et al., 2007; Yan et al., 2015
Cinzas	3,4 – 8,1	Apprich et al., 2014; Babu et al., 2018

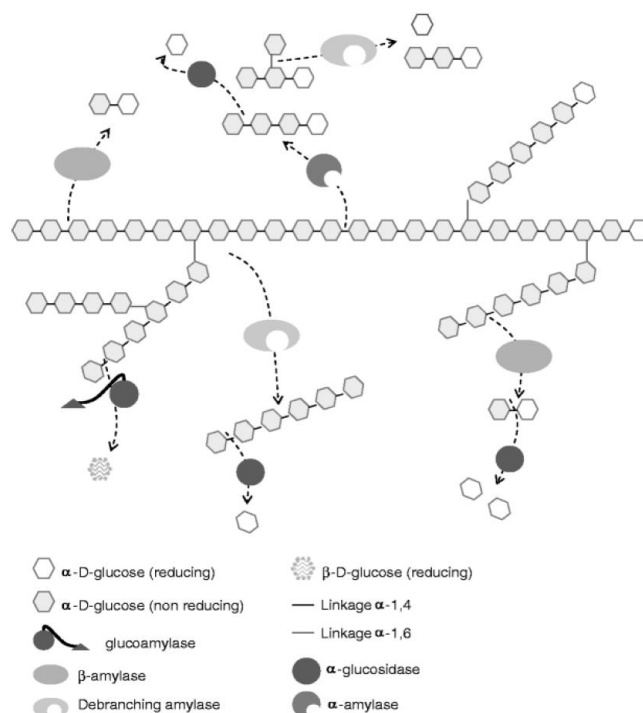
Como pode ser observado acima, a composição deste resíduo varia um pouco, o que se deve a fatores genéticos do grão de trigo e às condições ambientais que este foi submetido, mas no geral apresenta boa quantidade de nutrientes, porém com baixo valor agregado, sendo

utilizado principalmente na alimentação animal (YAN et al., 2015). Devido a quantidade de celulose, hemicelulose, proteína e amido presentes, este resíduo é uma excelente fonte de carbono e nitrogênio para microrganismos, podendo ser utilizado em diferentes tipos de bioprocessos.

2.4 AMILASES

As amilases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise do amido em unidades de glicose. Estas enzimas se classificam em três subgrupos, α -amilase, β -amilase e glicoamilase, a depender do tipo de ligação em que são capazes de atuar (LIU e KOKARE, 2017). A α -amilase (EC 3.2.1.1.) é o subgrupo que atua nas ligações $\alpha(1,4)$ dos polissacarídeos quebrando as moléculas em três ou mais unidades de D-glicose (FREITAS, MARTINS e FERREIRA, 2014). A β -amilase (EC 3.2.1.2.) atua na hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha-1,4$ dos polissacarídeos separando duas unidades de glicose (FARIA SILVA et al., 2017). A glicoamilase (EC 3.2.1.3.), que são extracelulares, rompem as ligações glicosídicas $\alpha-1,4$ e $\alpha-1,6$ do amido em glicose (BENASSI, 2018). A ação conjunta deste grupo de enzimas é essencial para promover a hidrólise completa da molécula do amido em glicose. Esta atuação está representada na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática da ação das enzimas amilases

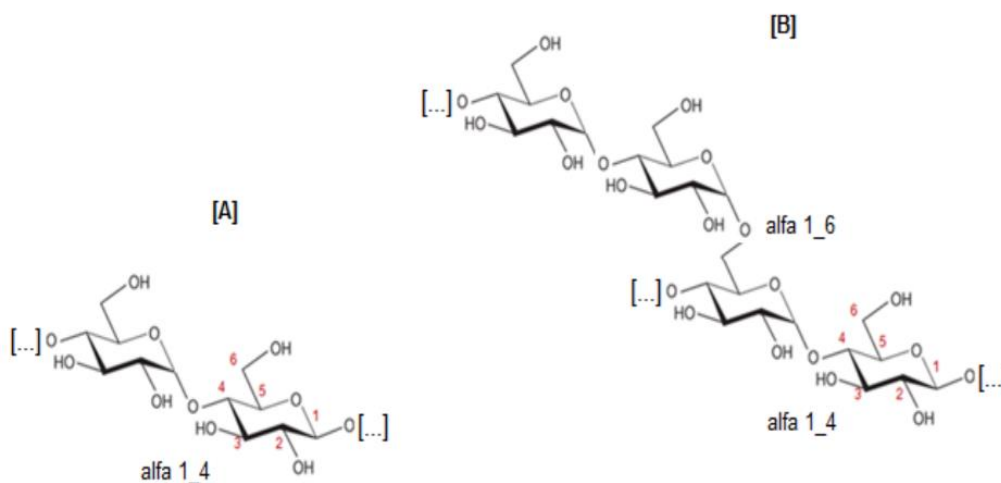


Fonte: BRITO (2017)

O principal substrato das amilases é o amido. Ele é um dos polímeros mais abundantes na natureza. É constituído de moléculas de amilose e amilopectina, que são polímeros de D-glicose, ligadas entre si por pontes de hidrogênio (SOUTO, 2011).

Na Figura 5 estão representadas as estruturas moleculares da amilose e amilopectina. Na molécula de amilose, as unidades de D-glicose estão ligadas principalmente por ligações glicosídicas α -(1,4), formando uma estrutura essencialmente linear, enquanto a molécula de amilopectina tem a estrutura mais ramificada, pois nesta surgem também ligações α -(1,6) (RODRIGUES, MORAIS e CASTRO, 2015).

Figura 5 – Representação da estrutura da amilose (a) e amilopectina (b)



Fonte: ALVES et al. (2012)

As amilases são o grupo de enzimas mais importante na indústria para processos de conversão do amido. Estas enzimas têm aplicação estabelecida em diversos setores, como papel, detergentes e farmacêutica. Na indústria de alimentos atuam na produção de xarope de glicose, clarificação de sucos, cerveja e panificação (LIU e KOKARE, 2017).

Estas enzimas podem ter origem fúngica e bacteriana, e para cada tipo existem condições específicas que são consideradas ótimas para atuação destas como pH, temperatura, especificidade e estabilidade (ZAFERANLOO et al., 2014). Como também possuem um amplo campo de atuação, é necessária uma busca contínua por amilases que apresentem propriedades adequadas para cada tipo de processo industrial. Devido a isso muita atenção vem sendo dada a estudos de diferentes tipos de bioprocessos para a produção de enzimas e características específicas (REIS, 2015).

A atividade enzimática e a estabilidade a temperatura, são variáveis da atuação da enzima que dependem do tempo. Altas temperaturas levam à aumento da cinética de reação, mas também causam a desnaturação da enzima. O efeito do pH também depende do tempo e da temperatura. Em geral, as enzimas são menos estáveis em altas temperaturas ao longo do tempo em valores de pH próximos ao limite do ótimo (HUSSAIN et al., 2013).

Freitas, Martins e Ferreira (2014) ao estudarem a atividade enzimática de α -amilases produzidas por *Syncephalastrum racemosum* em diferentes pH e temperaturas, observaram que o melhor pH de atuação foi 4,5, temperatura ótima foi em torno de 65°C e na análise de termoestabilidade até 55°C a enzima permaneceu com 90% da sua atividade residual em 1 hora de exposição. De acordo com Saleem e Ebrahim (2014), as α -amilases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, apresentaram a melhor atividade enzimática em pH 6,0 e temperatura de 30°C. YI et al. (2018) analisaram as melhores condições de atuação da NF Amy13A, que são α -amilases purificadas, e observaram que a melhor temperatura para atividade da enzima foi de 60°C, o pH ótimo foi em torno de 5,5 e com relação à estabilidade até 60°C a atividade residual da enzima foi de 8% para 6 horas de incubação.

Sinha e Vakilwala (2016) obtiveram melhor resultado de atividade enzimática para α -amilases produzidas por *Aspergillus* spp. para o pH em torno de 6,0. Singh et al. (2014) reportaram que as amilases produzidas por *Aspergillus fumigatus* NTCC 1222 apresentaram melhor atividade enzimática para o pH em torno de 6,0 e a temperatura ótima foi de 55°C. Araújo e Martins (2018) analisaram as α -amilases produzidas pelos fungos *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* e obtiveram que pH ótimo para a atividade enzimática foi em torno de 5,0 e a temperatura ótima para a enzima produzida por *R.miehei* foi de 75°C, enquanto que a do fungo *S.racemosum* foi de 70°C. Com relação à termoestabilidade, quando incubadas durante 1 hora, a enzima produzida por *R.miehei* apresentou mais de 90% da estabilidade até a temperatura de 65°C, enquanto que a do fungo *S.racemosum* apresentou 80% de estabilidade até 55°C.

2.5 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

O CES é realizado na ausência de água livre, porém contendo uma quantidade suficiente para o crescimento de microrganismos, em que se utiliza um material não solúvel que atua como suporte sólido e fonte de nutrientes (SANTOS et al., 2017). Este tipo de cultivo apresenta como principais vantagens em relação a fermentação submersa, a alta

produtividade volumétrica, menor uso de água, baixo custo do equipamento envolvido, melhor rendimento do produto e menor geração de resíduos ambientais (KAHIL e HASSAN, 2015). Em contrapartida, apresenta como desvantagens dificuldade de controlar a temperatura por ser um meio heterogêneo, evaporação da água durante a fermentação, problemas para aumento da agitação e aeração do meio e a necessidade de um grande volume de inóculo (HYSENI, AYTEKIN e NIKEREL, 2018).

O microrganismo pode se desenvolver entre as partículas sólidas ou sobre a superfície do substrato, consumindo os nutrientes secretando diversos metabólitos e enzimas (RODRIGUES et al., 2015). Geralmente, os fungos filamentosos são mais adequados para fermentação em estado sólido devido às suas características morfológicas. Eles se colonizam e penetram no substrato com maior facilidade, pois as hifas fúngicas se espalham com mais eficiência e possuem boa tolerância à baixa quantidade de água (ABDULLAH et al., 2014).

O CES tem sido muito utilizado para a produção de enzimas. Apresenta como fatores positivos: a facilidade na recuperação de produtos, ausência da formação de espumas, menor volume de reação e menor risco de contaminação para formação de produtos indesejáveis (EL-SHISHTAWY et al., 2014). Dentre os principais fatores que também pode afetar a produção de enzimas estão a seleção do substrato e microrganismo adequados, tamanho da partícula do substrato, concentração de inóculo e umidade do substrato (BALKAN e ERTAN, 2007).

A seleção do substrato determina o melhor material para a formação da enzima desejada (BALKAN e ERTAN, 2007). A água é um fator importante, pois permite a estabilidade das estruturas biológicas e as transferências de soluto e gás dissolvido ocorrem no filme aquoso que envolve os microrganismos (CARBOUÉ et al., 2017). Porém uma grande quantidade de água pode causar compactação do meio sólido e impedir a fluidez dos gases. Partículas menores têm maior área superficial para o ataque microbiano, porém se forem pequenas demais podem causar também a compactação do substrato, interferindo nas trocas gasosas e na respiração microbiana (CASTRO et al., 2018).

Neste tipo de processo, são utilizados resíduos agroindustriais como fontes de energia natural, o que facilita o gerenciamento de resíduos sólidos e menor geração de efluentes (SOCCOL et al., 2017). Geralmente são os melhores substratos sólidos para o CES, tornando este método ainda mais atraente. Resíduos sólidos como trigo, cevada, arroz, farelo de milho, casca de arroz e torta de óleo de coco são reportados na literatura como boas fontes de amido e para a produção de amilases (KARRI et al., 2014).

2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática consiste na utilização de enzimas, como as amilases, para a quebra do substrato em açúcares menores fermentescíveis. Na produção de bioetanol, as leveduras alcoólicas não têm a capacidade de fermentar diretamente a biomassa, sendo necessário a transformação dos biopolímeros em moléculas de glicose para posterior fermentação (SOUTO et al.2017). A realização dos processos de hidrólise e fermentação de maneira separada permite maior controle das condições otimizadas tanto na hidrólise enzimática quanto nas etapas de fermentação (VALERIANO et al., 2018).

O amido pode ser hidrolisado via ácida ou por via enzimática. A hidrólise via ácida ocorre mais rápido que a enzimática, por apresentar menor tempo de quebra do amido, porém causa corrosão dos equipamentos, tem necessidade de correção do pH da solução de açúcares, gera destruição parcial dos açúcares e formação de inibidores (NEUMANN et al., 2014). A hidrólise enzimática se apresenta mais vantajosa para desenvolvimento devido à alta especificidade das enzimas, operam em condições mais brandas de temperatura e pressão, evitando corrosão dos equipamentos e sem a necessidade de equipamentos complexos como a via ácida gerando economia de energia (SOUSA, 2019). Apesar de apresentar as vantagens citadas, na hidrólise enzimática existe a limitação do alto custo da enzima. A utilização de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido se torna mais econômico, pois é possível a diminuição do custo do processo (BÓZIC et al., 2017).

Fatores como dosagem da enzima, concentração do substrato, temperatura, pH e tempo de atuação enzimática influenciam na quantidade de açúcares liberados na composição do caldo hidrolisado ao final do processo (NUNES, ARAÚJO e GUARDA, 2014). As condições da hidrólise devem ser otimizadas para se atingir maior eficiência do processo. Se as condições não forem ideais, uma maior dosagem de enzima pode ser necessária para se atingir o mesmo nível de hidrólise (AMIT et al., 2018).

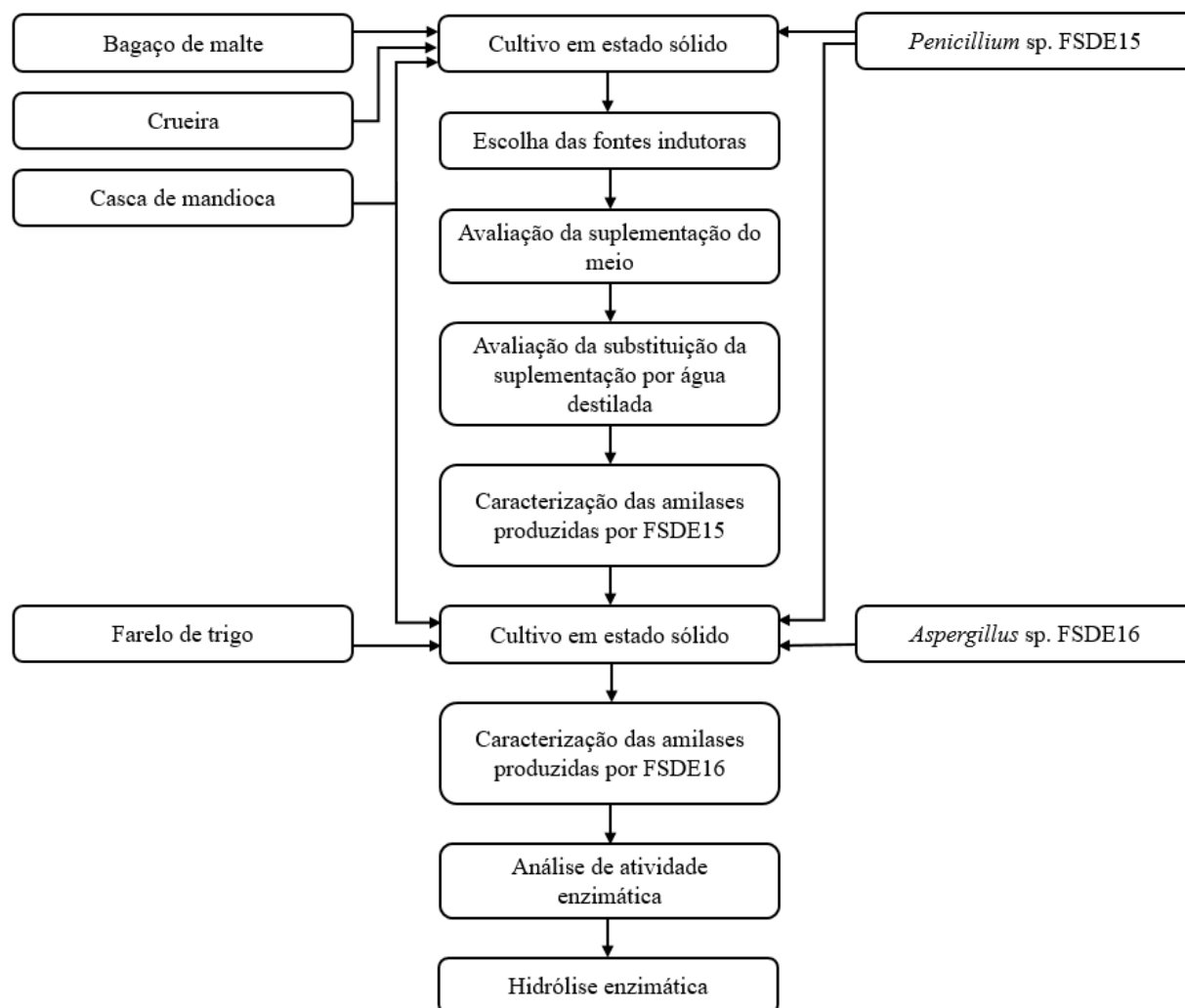
Cinelli (2012) realizou a hidrólise da farinha de babaçu utilizando o extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus awamori*, com as seguintes condições: carga enzimática de 20 U/mL, concentração de substrato de 160 g/L, pH 5,0, temperatura de 50°C e tempo de 24h, e o resultado de concentração de glicose obtido ao final do processo foi de 41,63 g/L. Costa et al. (2016) ao analisarem a hidrólise da crueira com a utilização do extrato enzimático bruto obtido por *Bacillus* sp. ANRAS02, observaram que a concentração de substrato de 108,2 g/L e dosagem de enzima de 14,3 U/mL em meio reacional com pH 5,0 sob a temperatura de 60°C, gerou o melhor resultado na liberação de açúcares totais em 24h

de processo. Gonçalves (2016) ao avaliar a hidrólise do bagaço de mandioca utilizando extrato enzimático bruto produzido por *Rhizopus oligosporus*, observou que o melhor resultado de produção de açúcares redutores (AR) foi para a condição de concentração de substrato de 100g/L, com carga enzimática de 12 U/g de substrato, pH 5,5, temperatura de 55°C, em que se obteve o valor de 39,8 g/L em 10 h de reação, se mantendo constante até 50h.

3 METODOLOGIA

As etapas do estudo desenvolvido no presente trabalho, estão mostradas de maneira simplificada na Figura 6. Para realização deste estudo, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioengenharia – UFPB.

Figura 6 – Fluxograma do estudo para produção das amilases



3.1 SUBSTRATOS

Para este estudo foram utilizados como substratos nos cultivos bagaço de malte, crueira, casca de mandioca e farelo de trigo.

O bagaço de malte, Figura 7, foi obtido da produção de cerveja artesanal do tipo *Blond Ale*, contendo 95% de malte de cevada e 5% malte de trigo, sendo cedido pela cervejaria Turmalina, localizada em João Pessoa-PB. Este resíduo foi seco à 60°C em estufa

com circulação de ar e posteriormente foi armazenado em recipiente fechado à temperatura ambiente.

Figura 7 – Bagaço de malte



Os resíduos da mandioca foram obtidos da produção de farinha e goma de mandioca, cedidos pela casa de farinha artesanal Goma Silva, localizada no município de Pedras de Fogo-PB. Os mesmos foram secos em estufa com circulação de ar à 60°C, em seguida foram triturados em processador doméstico e armazenados em recipientes fechados à temperatura ambiente. A Figura 8 mostra os resíduos de mandioca.

Figura 8 – Resíduos de mandioca (a) Casca de mandioca e (b) Cruera



(a)



(b)

O farelo de trigo foi obtido no comércio local de João Pessoa-PB, seco e triturado, sendo apenas armazenado em recipiente fechado à temperatura ambiente, como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Farelo de trigo



3.2 MICRORGANISMOS

Para este estudo foram utilizados dois microrganismos, ambos fungos, o *Penicillium* sp. FSDE15 (Figura 10) e o *Aspergillus* sp. FSDE16 (Figura 11). Estes fungos foram isolados do solo de descanso da Usina Japungu Agroindustrial S.A, localizada no município de Santa Rita, estado da Paraíba (CARVALHO-GONÇALVES, 2017).

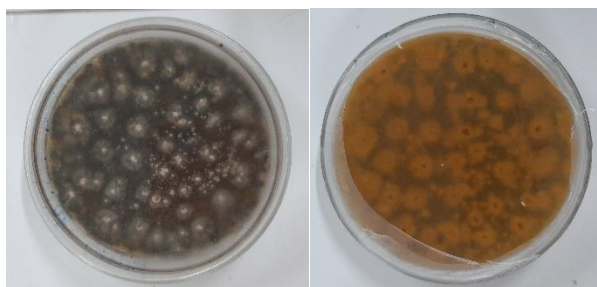
Figura 10 – Microrganismo *Penicillium* sp. FSDE15: (a) Frente e (b) Verso



(a)

(b)

Figura 11– Microrganismo *Aspergillus* sp. FSDE16: (a) Frente e (b) Verso



(a)

(b)

3.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para o inóculo, foi feito o repique dos fungos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). As placas foram incubadas durante 7 dias à 30°C.

Após o crescimento, foi realizada a suspensão dos esporos em água destilada esterilizada. Para obtenção do volume de suspensão com a concentração desejada, seguindo metodologia proposta por Rocha (2019), primeiramente foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer no microscópio eletrônico, obtida pela Equação (3.1). Posteriormente o volume de inóculo foi obtido pela Equação (3.2).

$$C = \sum x * 5 * 10^4 * f \quad (3.1)$$

Onde:

C = Concentração de esporos (esporos/mL);

$\sum x$ = Quantidade de esporos contados na câmara de Neubauer, nas 5 regiões;

f = fator de diluição.

$$V = \frac{Cd * M}{C} \quad (3.2)$$

Onde:

Cd = Concentração desejada (esporos/g);

V = volume do inóculo (mL);

C = Concentração de esporos (esporos/mL);

M = Massa do substrato.

3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES USANDO BAGAÇO DE MALTE E RESÍDUOS DE MANDIOCA PELO *Penicillium sp.* FSDE15

Para avaliação da cinética de produção de amilase, o fungo *Penicillium sp.* FSDE15 foi cultivado, em triplicata, em meio sólido contendo como substratos bagaço de malte e resíduos de mandioca, crueira ou casca, em três proporções: 0%, 10% e 20%.

Para o ajuste da umidade de 70%, foi necessário conhecer primeiramente a umidade de cada resíduo que foi obtida seguindo a metodologia do ADOLFO LUTZ (1985).

Foi preparada a solução contendo 3,3 g/L de sulfato de amônia e 1,5 g/L de fosfato de potássio, para umidificação do meio de cultivo (ARAÚJO, 2018). Em seguida, os resíduos foram umedecidos com o volume de solução obtido de acordo com a quantidade de água necessária calculada através da Equação (3.3). Pesou-se as massas do bagaço de malte, crueira e casca com entrecasca umedecidos, e de acordo com as proporções estabelecidas colocou-se

100g de meio em erlenmeyers de 1000 mL. Os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos à 121°C.

$$m_a = m_r * \frac{u_d - u_r}{1 - u_d} \quad (3.3)$$

Onde:

m_a = massa de água;

m_r = massa do resíduo;

u_d = umidade desejada;

u_r = umidade do resíduo.

Depois de frio, foi feita a inoculação com o volume de inóculo calculado de acordo com a Equação (3.2) para a concentração de 10^5 esporos/g. O meio foi homogeneizado e os erlenmeyers foram incubados durante 7 dias sob temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). A cada 24 horas, retirou-se uma amostra de aproximadamente 2 gramas para análise de pH (ADOLFO LUTZ, 1985) e atividade enzimática.

Para obtenção do extrato enzimático, utilizou-se tampão citrato pH 5,0 como solvente na proporção de 20 mL por grama. Adicionou-se o tampão em aproximadamente 1 grama da amostra e após homogeneização, aguardou-se 40 minutos. Em seguida, fez-se a filtração da mistura com papel filtro. O extrato filtrado foi armazenado sob refrigeração para posterior análise de atividade enzimática.

3.4.1 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MEIO DE CULTIVO

Para avaliar a influência das concentrações de sulfato de amônia, fosfato de potássio, extrato de levedura e casca de mandioca, usando a ferramenta do planejamento experimental fatorial, foram realizados experimentos com variação das concentrações conforme mostrado na Tabela (2). O extrato enzimático para posterior análise foi retirado com 4 dias de produção e refrigerado para posterior análise de atividade enzimática.

Tabela 2 – Valores das variáveis independentes

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sulfato de amônia	2%	3%	4%
Fosfato de potássio	1%	2%	3%
Extrato de levedura	0%	0,5%	1%
Casca de mandioca	20%	30%	40%

3.5 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DESTILADA EM SUBSTITUIÇÃO À SOLUÇÃO DE NUTRIENTES DO MEIO

Com a melhor condição obtida no item 3.4.1 para a produção de amilases, foi realizado um cultivo do *Penicillium* sp. FSDE15 para avaliar a substituição dos nutrientes na solução de umidificação do meio por somente água destilada. O procedimento foi realizado em triplicata de maneira semelhante ao descrito no item 3.4 avaliando-se a cinética de produção. Após, foi realizado um novo cultivo com as condições descritas anteriormente, com obtenção do extrato enzimático bruto em 4 dias de cultivo. Em seguida, todo o extrato foi armazenado sob refrigeração para posterior análise de caracterização enzimática.

3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus* sp. FSDE16 E *Penicillium* sp. FSDE15 USANDO FARELO DE TRIGO E CASCA DE MANDIOCA

Os fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16 foram cultivados, separadamente, em meio sólido contendo como substratos farelo de trigo e casca de mandioca, com o intuito de comparar a produção enzimática por ambos os fungos, para avaliar onde haveria maior atividade de amilases, visto que quanto mais enzimas forem produzidas ao decorrer do cultivo, melhor é para a etapa de hidrólise enzimática.

As condições de cultivo foram: 70% de farelo de trigo e 30% de casca de mandioca, 70% de umidade, meio umedecido com água destilada, concentração de inóculo de 10^6 esporos/g, temperatura de 36°C e 5 dias de cultivo. Este procedimento foi realizado em triplicata, de maneira semelhante ao descrito no item 3.4, porém na extração da enzima utilizou-se água destilada como solvente.

3.7 SECAGEM DO FERMENTADO

Para obtenção de um extrato enzimático bruto mais concentrado, o fermentado obtido nos cultivos dos itens 3.5 e 3.6 foi seco em estufa. Todo o fermentado foi retirado dos erlenmeyers após realização dos cultivos e colocado em bandejas de alumínio, em seguida as bandejas foram dispostas em estufa à 60°C durante 24 horas. Para obtenção do extrato enzimático bruto utilizou-se água destilada como solvente na proporção de 20mL por grama de fermentado seco. Em seguida, o extrato foi filtrado e armazenado sob refrigeração para posterior análise da caracterização enzimática.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS PELOS FUNGOS *Penicillium* sp. FSDE15 E *Aspergillus* sp. FSDE16

3.8.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após avaliação das melhores condições de cultivos, foi realizada a avaliação das melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática das amilases produzidas pelos dois microrganismos.

Para análise do pH ótimo, variou-se o mesmo na faixa de 4,0 a 8,0 (incremento de 1,0) na preparação da solução de amido e do meio reacional a cada análise de atividade enzimática realizada conforme procedimento do item 3.9. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo utilizado tampão citrato de sódio para a faixa de pH de 4,0 a 6,0 e tampão fosfato de sódio para a faixa de 7,0 a 8,0.

Após obtenção do melhor valor de pH para atividade de amilase, foi realizada a análise de temperatura ótima, onde manteve-se o pH constante no melhor valor obtido e variou-se a temperatura de 30 a 90°C (incremento de 10) para cada análise de atividade enzimática realizada conforme procedimento do item 3.9 também em triplicata.

3.8.2 AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE ENZIMÁTICA

Este procedimento foi realizado, em duplicata, variando-se a temperatura de 30 a 90°C (incremento de 10). O extrato enzimático foi colocado em erlenmeyer fechado com papel alumínio sendo incubado em banho-maria na temperatura desejada e foram retiradas amostras de 2 mL nos tempos de 0h, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min. A atividade de amilase foi obtida conforme procedimento descrito no item 3.9.

3.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a análise da atividade enzimática de amilase foi seguido o método proposto por Aleixo Júnior (2018) com adaptações. Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,25 mL de amido solúvel 1%(m/v) em 0,25 mL de tampão citrato de sódio pH 5,0, e em seguida adicionou-se 0,25 mL de sobrenadante do extrato enzimático, a mistura foi homogeneizada e a reação ocorreu por 10 minutos à 50°C, com exceção dos extratos enzimáticos obtidos no item 3.4, estes foram analisados com o tempo de reação de 30 minutos à 40°C. Preparou-se o branco

das amostras. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de tampão citrato, 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático e 0,5 mL de solução de DNS. Preparou-se também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,5 mL de tampão citrato e 0,5 mL de solução de DNS em um tubo de ensaio. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS. Fez-se a leitura a 540 nm usando solução de glicose como padrão (MILLER, 1959). O valor da atividade enzimática foi calculado através da Equação (3.4):

$$Amilase \left(U/g \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{0,18 \times t \times V_e} \quad (3.4)$$

Onde:

A = absorbância da amostra;

B = absorbância do branco da amostra;

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

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);

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

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

3.10 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA MANDIOCA

Foram avaliadas duas condições de granulometria dos resíduos da mandioca: triturados em triturador doméstico e moídos em moinho de facas. As condições de pH e temperatura utilizadas foram aquelas que apresentaram os melhores resultados da atividade enzimática na etapa de caracterização das amilases.

Para realização da hidrólise, primeiramente foi feito o estudo da cinética baseado em Michaelis e Menten. Neste procedimento, foi realizado a variação da concentração de substrato em 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 40% (m/v). Em frascos contendo o extrato enzimático bruto obtido, em duplicata, foram adicionados a quantidade de crueira e casca de mandioca de acordo com a concentração desejada, e estes foram incubados durante 10 minutos em banho-maria sob a melhor temperatura obtida na caracterização da enzima. Em seguida, foi realizada a quantificação dos açúcares redutores (AR) seguindo metodologia proposta por Miller (1959).

Para o ajuste do pH do meio reacional, o extrato enzimático bruto utilizado nesta etapa de hidrólise foi obtido através da extração com o solvente sendo tampão citrato de sódio pH 5,0.

Foram pesados 10g de resíduo e 90 mL de extrato enzimático como carga enzimática, com atividade deamilases de 63,5 U/g (3,18 U/mL), o que representa uma carga enzimática de 28,6 U por grama de resíduo de mandioca. Em seguida, em duplicata, os erlenmeyers contendo o meio reacional foram colocados em incubadora na temperatura de 50°C, velocidade de agitação de 100 rpm e tempo de 24 horas. As amostras para quantificação de AR foram retiradas nos tempos de 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas e armazenadas sob refrigeração para posterior análise seguindo metodologia proposta por Miller (1959).

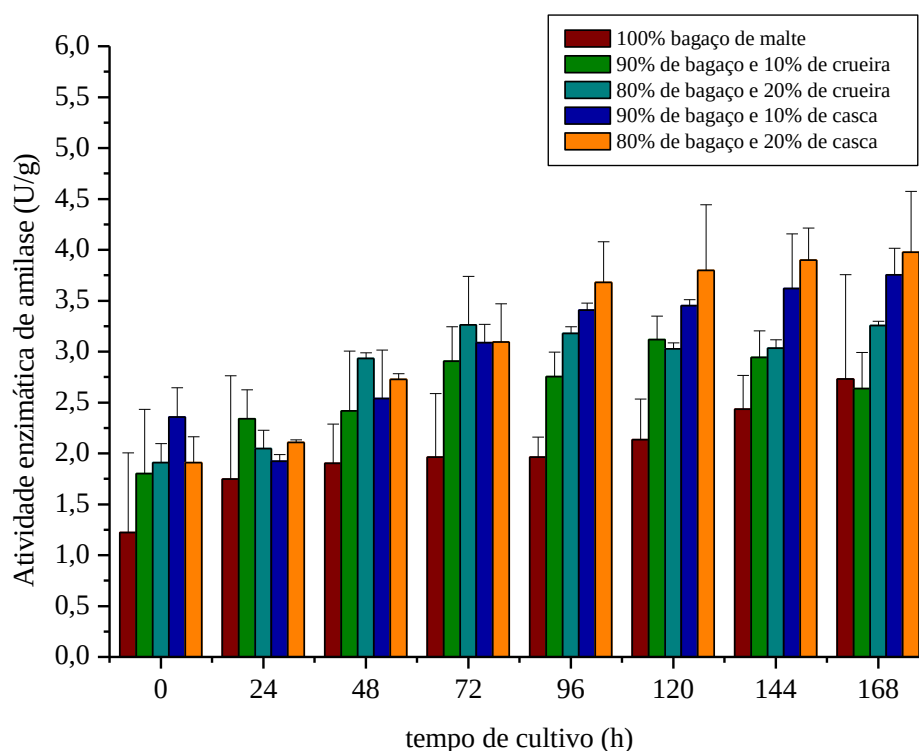
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES EM MEIO COM BAGAÇO DE MALTE E RESÍDUOS DE MANDIOCA POR *Penicillium* sp. FSDE15

O acompanhamento da cinética de produção de amilases por *Penicillium* sp. FSDE15 foi realizado com a finalidade de avaliar a utilização de outros substratos além daqueles que já foram estudados anteriormente no grupo de pesquisa do Labio – UFPB. Os cultivos foram realizados com condições semelhantes, 70% de umidade, temperatura ambiente e concentração de inóculo de 10^5 , porém além da utilização do bagaço de malte, foram utilizados os resíduos da mandioca: crueira e casca de mandioca.

O comportamento da cinética de atividade enzimática de amilases para os cultivos contendo estes resíduos como substratos está mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Cinética de atividade enzimática de amilases por *Penicillium* sp. FSDE15 em meios contendo bagaço de malte, bagaço e crueira e bagaço e casca de mandioca



Conforme pode ser observado, para o cultivo contendo apenas bagaço de malte, o pico de atividade enzimática foi em 168h de cultivo, com um valor de 2,73 U/g. Em termos de produtividade, o melhor resultado acontece em 96h de cultivo, com um valor de 0,683

U/g.dia. Aleixo Júnior (2018), ao analisar a produção de amilases utilizando o fungo *Penicillium* sp. FSDE15 em meio contendo bagaço de malte, com condições de umidade de 70%, concentração de inóculo de 10^5 esporos/g e temperatura de incubação de 29°C, obteve pico de atividade enzimática em 120h de cultivo, com um valor de 8,68 U/g.

Rocha (2019), ao realizar cultivo com o *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte, umidade de 70%, concentração de inóculo de 10^6 esporos/g e temperatura de incubação de 30°C, para 120h de cultivo, obteve valor de atividade enzimática de 9,98 U/g. Santos et al. (2017) cultivaram o fungo *Penicillium* spp. LEMI A11 em meio contendo talos de banana, umidade ajustada para 70% e temperatura de cultivo de 30°C e obtiveram resultado de atividade de amilase de 0,12 U/g em 96h de processo.

Também pode ser observado na Figura 12, o comportamento da cinética de produção para os cultivos contendo bagaço de malte e crueira. Como mostrado, para o cultivo contendo 10% de crueira o pico de atividade de amilases foi em 120h de cultivo, com um valor de 3,11 U/g. Em termos de produtividade, o melhor resultado foi em 72h, com um valor de 0,96 U/g.dia. Para o cultivo contendo 20% de crueira, o pico de atividade enzimática ocorreu em 72h de cultivo, com um valor de 3,26 U/g. Em termos de produtividade, o melhor resultado também foi para 72h de cultivo, com um valor de 1,08 U/g.dia. Ao analisar estes casos, percebe-se que a cinética de atividade enzimática não apresentou muita variação em relação as proporções estudadas de crueira, com um comportamento semelhante do início ao fim do cultivo.

Observando, agora, o comportamento da cinética para os cultivos realizados em meio contendo bagaço de malte e casca de mandioca mostrado na Figura 12, para o cultivo contendo 10% de casca, o melhor resultado de atividade enzimática ocorreu em 168h de cultivo, com um valor de 3,75 U/g. Em termos de produtividade o melhor resultado foi em 96h de cultivo, com um valor de 0,85 U/g.dia. Enquanto para o cultivo contendo 20% de casca, o pico de atividade enzimática ocorreu em 168h, com um valor de 3,97 U/g. Em termos de produtividade, o melhor resultado foi em 96h de cultivo, com um valor de 0,92 U/g.dia.

O comportamento do gráfico de cinética é semelhante em ambos os casos, mostrando que não houve muita variação em relação às proporções estudadas de resíduos de mandioca tanto para a atividade enzimática quanto para a produtividade. No entanto, nas primeiras 72 horas de cultivo, os cultivos com crueira apresentam valores de atividades maiores se mantendo estáveis ao longo do tempo. Com 96 horas de cultivo os cultivos com casca de mandioca apresentaram maiores atividades enzimáticas.

Wisniewski et al. (2010) estudaram a produção de amilases pelo fungo *Macrocybe titans* em meio contendo 79% de bagaço de malte, 10,5% de farelo de mandioca e 10,5% de farelo de soja, umidade de 70%, temperatura de cultivo de 25°C, obtiveram pico de atividade enzimática em 22 dias de cultivo, com um valor de 12,72 U/g, sendo este superior ao obtido no presente trabalho. Mas em termos de produtividade, obteve o valor de 0,58 U/g.dia, que é considerado um valor baixo para tantos dias de cultivo. Onofre et al. (2017) analisaram a produção de amilases por *Penicillium digitatum* em meio contendo farelo de arroz suplementado com 20% de amido de mandioca, umidade de 65%, concentração de inóculo de 10^8 esporos em todo o meio, temperatura de 28°C, e obtiveram em 120h de cultivo um valor de atividade enzimática de 65 U/g, valores maiores que os encontrados, mas usando o amido de mandioca, produto com custo maior que os resíduos aqui usados.

Cruz et al. (2011) avaliaram a produção de amilases por *Aspergillus niger* em meio contendo resíduos de cascas da mandioca, umidade de 75%, temperatura de 35°C, concentração de inóculo de 10^7 esporos/mL, e em 120h de cultivo obtiveram valor de atividade enzimática de amilases de 30,3 U/g. Cunha et al. (2016) estudaram a produção de amilases pelo fungo *Penicillium* spp. LEMIA8221 em meio contendo resíduos da colheita de soja, com umidade de 70%, temperatura de 30°C, e em 96h de cultivo obtiveram valor de atividade enzimática de amilases de 20 U/g. Em termos de produtividade, o valor foi de 5 U/g.dia.

Analisando todos os gráficos de cinética dos cultivos da Figura 12 que foram estudados, percebe-se que os valores de atividade enzimática não tiveram muita variação ao longo do tempo de cultivo, indicando que a produção foi baixa para estas fontes indutoras e condições estudadas. Porém, foi percebido também, que os melhores resultados em termos de produtividade foram em 96h de cultivo. Para realização dos ensaios posteriores utilizou-se a casca de mandioca e o tempo de 96h de cultivo para avaliação das concentrações de nutrientes no meio de cultivo, na tentativa de melhorarmos resultados de atividade da enzima.

4.1.1 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MEIO DE CULTIVO

Os resultados do planejamento fatorial, que avaliou a influência da concentração de nutrientes em meio de bagaço de malte para produção de amilases pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15, são mostrados na Tabela (3).

Os valores de atividade enzimática apresentados na tabela são referentes à 96 horas de cultivo, pois como observado no tópico anterior, este foi o melhor tempo em termos de produtividade.

Tabela 3 – Influência da adição de Sulfato de amônia (S), Fosfato de potássio (F), Extrato de levedura (E) e Casca de mandioca (C) na atividade de amilase

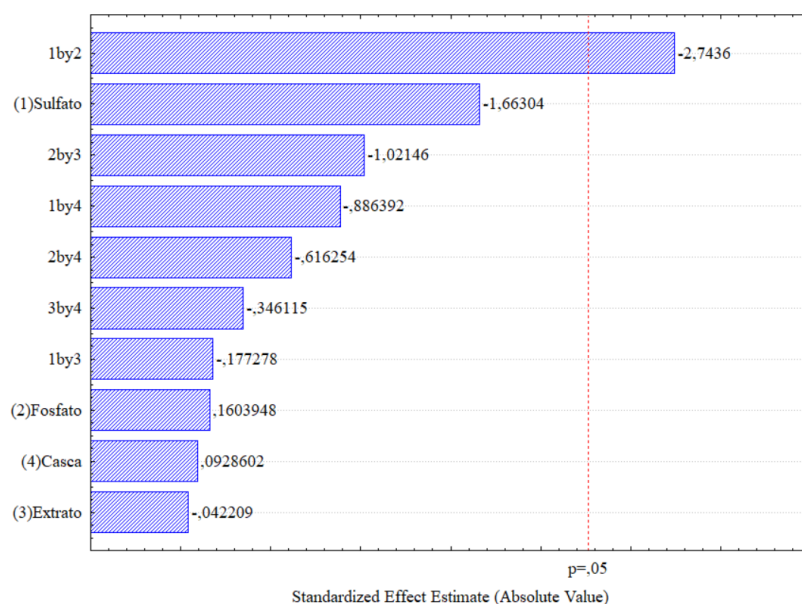
Ensaio	S (%)	F (%)	E (%)	C (%)	Amilase (U/g)
1	-1 (2,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	-1 (20,0)	7,47
2	+1 (4,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	-1 (20,0)	8,81
3	-1 (2,0)	+1 (3,0)	-1 (0,0)	-1 (20,0)	10,08
4	+1 (4,0)	+1 (3,0)	-1 (0,0)	-1 (20,0)	8,34
5	-1 (2,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	-1 (20,0)	8,96
6	+1 (4,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	-1 (20,0)	8,96
7	-1 (2,0)	+1 (3,0)	+1 (1,0)	-1 (20,0)	9,36
8	+1 (4,0)	+1 (3,0)	+1 (1,0)	-1 (20,0)	8,09
9	-1 (2,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	+1 (40,0)	8,70
10	+1 (4,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	+1 (40,0)	8,92
11	-1 (2,0)	+1 (3,0)	-1 (0,0)	+1 (40,0)	10,52
12	+1 (4,0)	+1 (3,0)	-1 (0,0)	+1 (40,0)	7,51
13	-1 (2,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	+1 (40,0)	8,67
14	+1 (4,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	+1 (40,0)	9,43
15	-1 (2,0)	+1 (3,0)	+1 (1,0)	+1 (40,0)	10,08
16	+1 (4,0)	+1 (3,0)	+1 (1,0)	+1 (40,0)	6,64
17	0 (3,0)	0 (2,0)	0 (0,5)	0 (30,0)	10,30
18	0 (3,0)	0 (2,0)	0 (0,5)	0 (30,0)	10,55
19	0 (3,0)	0 (2,0)	0 (0,5)	0 (30,0)	9,94
20	0 (3,0)	0 (2,0)	0 (0,5)	0 (30,0)	10,91

É possível observar, que de maneira geral, os valores de atividade enzimática não sofreram muita variação para as condições analisadas. Os maiores valores de atividade de amilases foram observados nos ensaios 18 e 20, que são dois dos quatro pontos centrais.

Então, com os dados da Tabela (3) realizou-se um tratamento estatístico para obter informações mais precisas sobre a influência dos nutrientes na atividade de amilase. A metodologia de planejamento fatorial além de reduzir o número de experimentos, melhora a qualidade da análise qualitativa de dados obtidos experimentalmente (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

O diagrama de Pareto na Figura 13 mostra que o único parâmetro estatisticamente significativo é a interação entre o sulfato e o fosfato, apresentando pouca influência sobre a atividade enzimática de amilase pois o valor do efeito está próximo da linha do p-valor e esta influência ocorre de maneira negativa, o que indica que a maior atividade é obtida quando um dos nutrientes está na menor concentração.

Figura 13 – Diagrama de Pareto mostrando a influência da adição de nutrientes do meio de bagaço de malte na atividade de amilase por *Penicillium* sp. FSDE15



A quantidade excessiva de fontes de nitrogênio causa um estresse para o crescimento de microrganismos, inibindo a produção de amilases (SUNDARRAM, PANDURANGAPPA e MURTHY, 2014). Ferreira et al. (2015) ao analisarem a suplementação do meio sólido contendo farelo de trigo variando a adição das fontes de nitrogênio nitrato de amônia, sulfato de magnésio e sulfato de amônia, para a produção de amilases por *Rhizopus oryzae*, observaram que não houve diferença significativa no resultado de atividade enzimática ao longo de 120h de cultivo em relação à estas fontes. Almeida (2019), por sua vez, avaliou o efeito das fontes de nitrogênio para a produção amilolítica por fungo *Mucor* sp. AD742 e reporta que muitas fontes de nitrogênio no meio inibiram a atividade enzimática, sendo obtido um valor bem inferior quando comparado com os valores de atividade em meio contendo apenas uma fonte. A concentração adequada de fontes de nitrogênio para a produção de amilases é de extrema importância, pois pequenas quantidades podem não ser suficientes para melhorar o processo de obtenção de enzimas, mas o excesso de nitrogênio é equivalentemente prejudicial por causar a inibição enzimática (DHARANI AIYER, 2004).

Foi obtido um modelo de regressão linear para a atividade enzimática, conforme mostrado na Equação (4.1). Os coeficientes foram obtidos com 95% de confiança, sendo estatisticamente significativos aqueles que estão em negrito.

$$Y_{\text{amilase}} = \mathbf{9,111} - 0,446S + 0,043F - 0,011E + 0,025C - \mathbf{0,0736SF} - 0,047SE - 0,238SC - 0,274FE - 0,165FC - 0,093EC \quad (4.1)$$

A partir desta equação, observa-se que apenas dois coeficientes foram estatisticamente significativos, sendo um deles a média e o outro a interação entre sulfato e fosfato com o sinal negativo, mostrando que a interação de sulfato e fosfato só traz benefício quando um dos elementos está no valor máximo e o outro no valor mínimo. O coeficiente de determinação do ajuste linear (R^2) foi de 58,9%, o que mostra que o ajuste do modelo foi baixo. Porém, foi desenvolvido a análise de variância (ANOVA) para verificação da consistência do modelo obtido. A Tabela (4) mostra os resultados da ANOVA gerada a partir dos dados obtidos nos ensaios.

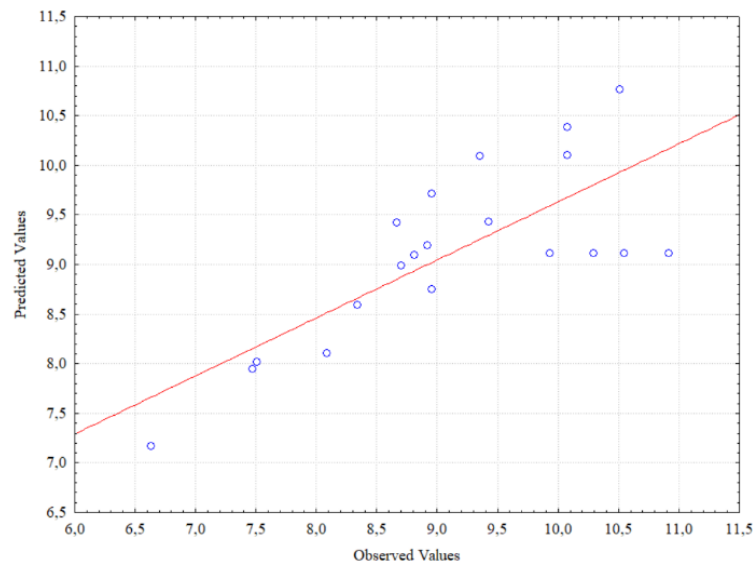
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de amilase

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	14,733	1	14,733	25,55	4,414
Resíduo	10,378	18	0,577		
Falta de ajuste	9,866	15	0,658	3,871	8,703
Erro puro	0,511	3	0,170		
Total	25,011	19			
R^2	0,589				
Teste F					5,788

O teste F é a razão entre o F_{calc} e o F_{tab} . Se esta razão for maior ou igual a 1,0, ou seja, se o F calculado for maior que o F tabelado, então o modelo de regressão é estatisticamente significativo. Mas para que o modelo também seja considerado preditivo, o valor do F calculado deve ser, no mínimo, quatro vezes maior que o F tabelado (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001). A análise de variância mostrou que o valor do teste F foi 5,788, sendo o modelo de regressão estatisticamente significativo e preditivo. Porém, como o ajuste do modelo foi baixo, isto indica que o adequado seria estender o modelo de regressão linear para um modelo quadrático para obter melhor ajuste.

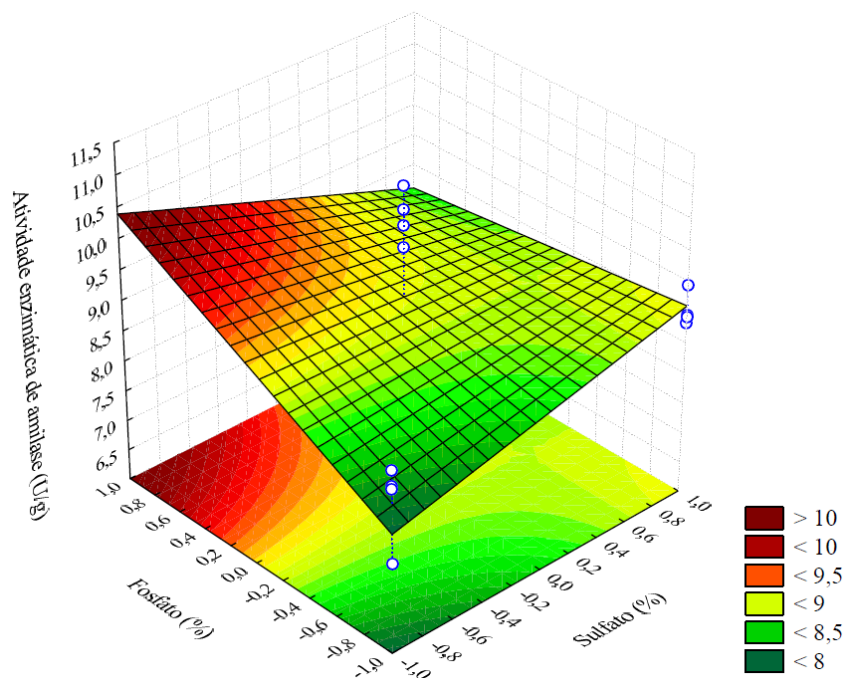
Então foi gerado o gráfico dos valores observados e preditivos que está mostrado na Figura 14, que como pode ser observado, confirma que o modelo obtido foi de baixo ajuste, pois os pontos estão muito distantes da reta.

Figura 14 – Gráfico dos valores preditivos versus observados



Mesmo com a falta de ajuste elevada, devido ao fato de que o modelo foi estatisticamente significativo, foi plotada a superfície de resposta, sendo representada na Figura 15. A atividade enzimática de amilase foi analisada como função da concentração de Sulfato e Fosfato, fixando-se as outras variáveis Extrato e Casca, no menor nível (-1), pois estas não apresentaram influência alguma sobre a atividade.

Figura 15 – Superfície de resposta para a atividade de amilase em função do Sulfato (%) e Fosfato (%)



Analisando a superfície de resposta, percebe-se que os valores mais altos de atividade de amilase estão para os menores níveis de Sulfato e para os maiores níveis de Fosfato. Porém, a influência exercida pelas variáveis de entrada sobre a variável de resposta não foi tão significativa assim, pois observa-se que os valores obtidos para atividade enzimática tiveram pequena variação ao longo dos níveis.

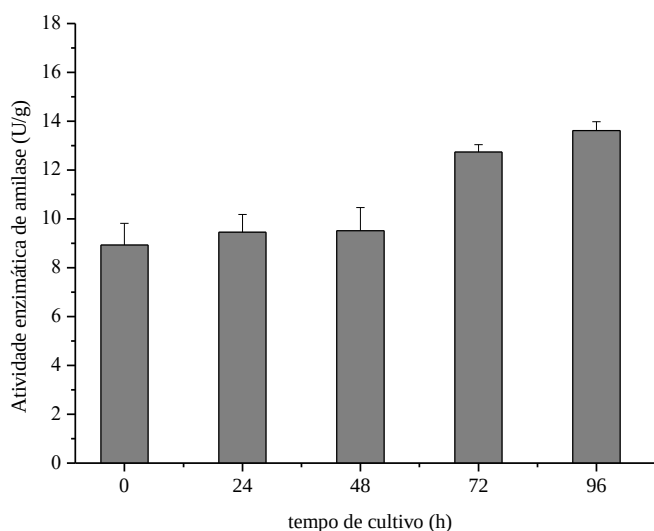
Segundo Sethi e Gupta (2015), a adição de sulfato de amônia como enriquecimento do meio para a produção de amilases por fungos, incluindo os do gênero *Penicillium*, não apresenta resultado positivo, sendo obtido um pequeno valor de atividade enzimática. Fontes de nitrogênio orgânicas apresentam resultados melhores na produção de amilases do que as fontes inorgânicas (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2017). A utilização de fontes inorgânicas também pode elevar o custo do processo, pois os nutrientes inorgânicos possuem maior custo comparado com o custo de fontes orgânicas (CASTRO et al., 2018).

Como a adição de nutrientes ao meio de cultivo não apresentou influência para a produção de amilases, e com o intuito de tornar o processo o mais econômico possível, foram realizados ensaios com 30% de casca de mandioca para avaliar a produção das enzimas utilizando-se apenas água destilada para umidificação do meio de cultivo.

4.2 UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DESTILADA EM SUBSTITUIÇÃO A ADIÇÃO DE NUTRIENTES

O acompanhamento da cinética de produção de amilases para o cultivo do *Penicillium* sp. FSDE15 em meio sólido contendo 70% de bagaço de malte e 30% de casca de mandioca umedecidos com água destilada, pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 – Cinética de produção de amilases por *Penicillium* sp. FSDE15 em meio contendo bagaço de malte e casca de mandioca umedecidos com água destilada



Analisando a curva de cinética, o pico de atividade enzimática foi atingido com 96h de cultivo, com um valor de 13,62 U/g. Comparando este resultado com a média dos resultados dos ensaios do ponto central do planejamento fatorial, observa-se que a suplementação ao meio não se faz necessária, pois estas não apresentaram influência positiva na produção de enzimas. Percebe-se, inclusive, que o valor obtido sem suplementação foi 30,58% superior ao obtido com a suplementação.

Selim, Mostafa e Eid (2017) avaliaram a produção de amilases por *Penicillium* sp. (1) em meio sólido contendo resíduos de batata, umedecidos apenas com água destilada, e em 120 dias de cultivo obtiveram um valor de atividade enzimática de 24,34 U/g. Freitas, Martins e Ferreira (2014) realizou cultivos do fungo *Syncephalastrum racemosum* em meio sólido contendo farelo de trigo como substrato, com umidade de 70% e temperatura de 28°C, com nitrato de amônia, sulfato de magnésio e sulfato de amônia, e também sem estas fontes de nitrogênio, e obteve resultados muito próximos de atividade enzimática de amilases para ambos os casos, indicando que não há necessidade de suplementação do meio contendo resíduos agroindustriais.

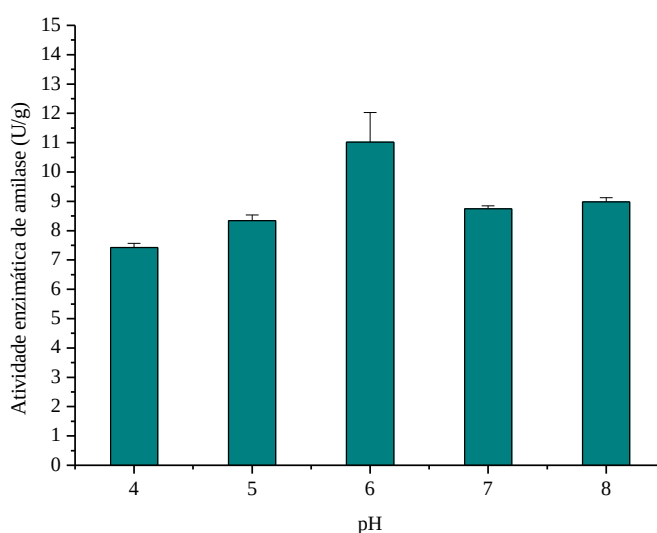
No caso deste cultivo contendo bagaço de malte e casca de mandioca, realizado no presente trabalho, a quantidade de casca presente no meio pode ter sido suficiente para a produção enzimática. Segundo Dourado et al. (2017) a casca de mandioca apresenta na sua composição, em média, 6,9% de teor de proteína bruta. A proteína que está presente em plantas e vegetais, possui quantidade de nitrogênio dentre os elementos constituintes que são considerados essenciais (SODRÉ et al., 2017).

Como discutido anteriormente, uma quantidade excessiva de nitrogênio no meio pode prejudicar a produção de enzimas, então umedecer o meio com água destilada é suficiente para obtenção de amilases nestas condições, além de trazer mais economia ao processo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR *Penicillium* sp. FSDE15

A Figura 17 mostra a atividade enzimática em função do pH para as amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15. O maior valor de atividade obtido foi com o pH 6,0, sendo este considerado o pH ótimo para estas enzimas por apresentar melhor resultado.

Figura 17 – Avaliação do pH ótimo para atividade de amilase produzida por *Penicillium* sp. FSDE15

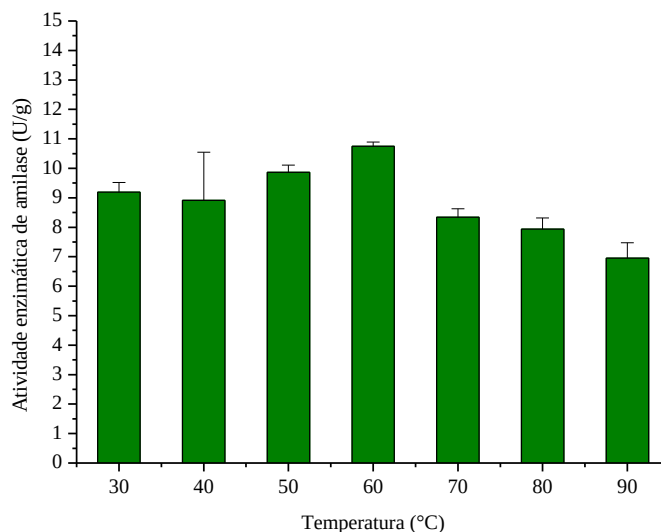


Erdal e Taskin (2010) determinaram o pH ótimo de 6,0 para a atividade de amilases produzidas por *Penicillium expansum* MT-1. Uzun, Demirci e Akatin (2017) avaliaram as condições ótimas para as amilases produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-4 e observaram que a atividade foi máxima em pH 5,5. Já Gosh et al. (2015) caracterizaram as amilases produzidas por *Penicillium notatum* NCIM 923 e obtiveram que a melhor faixa de pH está entre 5,0 – 6,0, enquanto Abdullah et al. (2017) ao avaliarem a atividade enzimática de amilases produzidas por *Penicillium* sp. observaram o pH ótimo de 6,0.

Estes resultados estão de acordo aos encontrados neste trabalho. Apesar de no pH 6,0 obtermos a maior atividade de amilases, nos outros pH avaliados os valores foram bem próximo, mostrando que a enzima atua bem em ampla faixa de pH (4-8).

A influência da temperatura na atividade enzimática das amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15 pode ser observada na Figura 18.

Figura 18 – Avaliação da temperatura ótima para atividade de amilase produzida por *Penicillium* sp. FSDE15

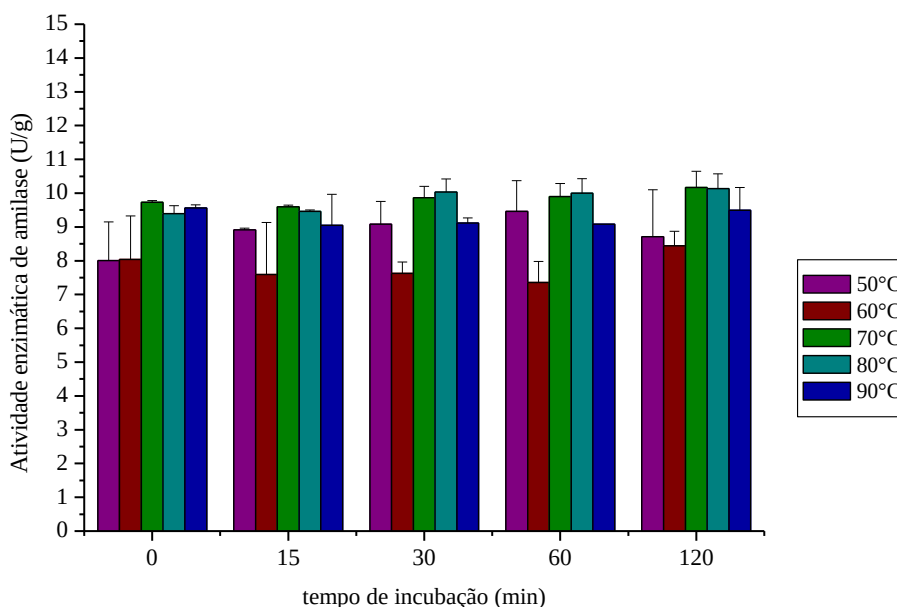


Observa-se que a atividade enzimática é máxima à 60°C, sendo esta considerada a temperatura ótima. Após esta temperatura, percebe-se que a atividade cai, o que indica que a partir de 70°C deve estar ocorrendo a desnaturação das enzimas.

Aisien e Igbinosa (2019) obtiveram maior valor de atividade de amilases produzidas por *Penicillium expansum* na temperatura de 45°C. Enquanto Balkan e Ertan (2005) caracterizaram as amilases produzidas por *Penicillium chrysogenum* obtiveram como temperatura ótima 50°C. Xian et al. (2015) obtiveram temperatura ótima de 55°C para amilases produzidas por *Talaromyces pinophilus* 1-95. Tiwari, Jadhav e Fatima (2007) analisaram a atividade enzimática de amilases produzidas por *Penicillium rugulosum* e observaram a temperatura ótima de 57°C para estas enzimas.

A avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15 pode ser observada na Figura 19.

Figura 19 – Avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15



Como mostra a figura, as amilases produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 se mostraram praticamente estáveis às temperaturas de 50 a 90 °C pelo tempo de duas horas.

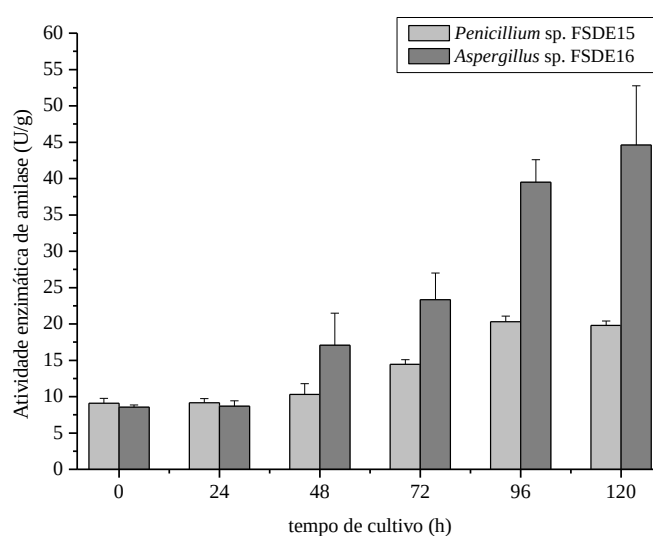
Nouadri et al. (2010) ao caracterizarem as amilases produzidas por *Penicillium camemberti* PL21, observaram que estas enzimas permaneceram termoestáveis à 60°C até 1h de incubação, com 70% de atividade residual, tendo queda para 40% em 2h de incubação. Abdulaal (2018) avaliando a termoestabilidade das amilases produzidas por *Trichoderma pseudokoningii*, em 1h de incubação, observaram que a partir de 60°C a atividade residual começou a cair para 85%, chegando à 80°C com 70% de atividade residual. Já Oliveira et al. (2016) avaliaram as amilases produzidas por *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacuse* em ambos os casos as enzimas permaneceram estáveis até 53°C durante 1h de incubação. Araújo e Martins (2018) observaram para as amilases produzidas por *Rhizopus miehei*, que até 65°C as enzimas apresentaram mais de 90% de atividade residual quando incubadas por 1h, tendo bruto decréscimo acima desta temperatura.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus* sp. FSDE16 E *Penicillium* sp. FSDE15 USANDO FARELO DE TRIGO E CASCA DE MANDIOCA

A cinética de produção de amilases por fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE16 em meio contendo 70% de farelo de trigo e 30% de casca de mandioca está mostrada na Figura 20. Como pode ser observado na curva cinética de ambos os casos, os

fungos não demonstraram produção de enzimas nas primeiras 24 h de cultivo com o valor de atividade inicial de aproximadamente 9 U/g, sendo percebido aumento de atividade a partir de 48 horas de cultivo. Para o cultivo com *Penicillium* sp. FSDE15, o pico de atividade de amilases foi de 20,30 U/g e ocorreu em 96h, mantendo-se constante até 120h, enquanto para o cultivo com o *Aspergillus* sp. FSDE16, a atividade enzimática apresentou aumento até 120 h, atingido seu valor máximo de 44,60 U/g. Sendo o microrganismo que apresentou maior resultado de produção de amilases, o fungo do gênero *Aspergillus*.

Figura 20 – Cinética de produção de amilases por *Aspergillus* sp. FSDE16 em meio contendo farelo de trigo e casca de mandioca



Balkan e Ertan (2007) ao realizarem cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* em meio sólido contendo farelo de trigo, com umidade 75% e temperatura de incubação de 28°C, obtiveram resultado de atividade enzimática de amilases de 82,5 U/g em 168h de cultivo. Zhao, Yi e Li (2019) ao avaliar a produção de enzimas por *Penicillium oxalicum* 16, em meio contendo 60% de farelo de trigo e 40% de palha de arroz, com umidade de 75% e temperatura de 28°C, obtiveram resultado de atividade enzimática de amilases de 270 U/g em 96h de cultivo.

Ferreira et al. (2015) estudaram o cultivo do fungo *Rhizopus oryzae* em farelo de trigo com umidade ajustada para 70% e temperatura de 30°C, e em 120h de experimento a atividade de amilases foi de 220 U/g. Irfan, Nadeem e Syed (2012) analisaram a produção de amilases por *Aspergillus niger*-ML-17 em meio contendo farelo de trigo com umidade de 55% incubado à temperatura de 30°C, e obtiveram o valor de atividade enzimática de 4,4 U/g em 96h de cultivo.

Pereira et al. (2018) realizaram cultivo do fungo *Aspergillus niger* em meio contendo resíduo de mandioca, com umidade ajustada para 47%, incubados à temperatura de 30°C, e obtiveram em 61,5h resultado de atividade enzimática de amilases de 37,6 U/g. Karri et al. (2014) ao estudarem a produção de amilases por *Aspergillus Strains-A* em farelo de trigo, umidade de 70%, à temperatura de incubação de 30°C, obtiveram resultado de atividade enzimática de 52,5 U/g. Kalaiarasi e Parvatham (2015) avaliaram a produção de amilases pelo fungo *Aspergillus awamori* MTCC 9997 em meio contendo casca de mandioca em pó, com umidade ajustada para 70% e temperatura de 28°C, e obtiveram resultado de atividade enzimática de 18,2 U/g em 120h de cultivo. Sethi et al. (2016) ao cultivarem o fungo *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 em meio sólido contendo milho com umidade ajustada para 70%, com incubação à 30°C durante 96h e obtiveram atividade de amilases de 16,8 U/g.

Assim, como já confirmado por outros autores, o farelo de trigo é um excelente substrato para produção de amilases. Pelos resultados apresentados, o *Aspergillus* sp. FSDE16 mostrou melhor desempenho para a produção de amilases quando comparado ao *Penicillium* sp. FSDE15.

4.5 SECAGEM DO FERMENTADO

Na Tabela (5) estão os resultados de atividade enzimática dos extratos brutos obtidos antes e após a secagem do fermentado dos cultivos realizados utilizando como substrato farelo de trigo e casca de mandioca.

Tabela 5 – Valores de atividade enzimática após secagem do fermentado

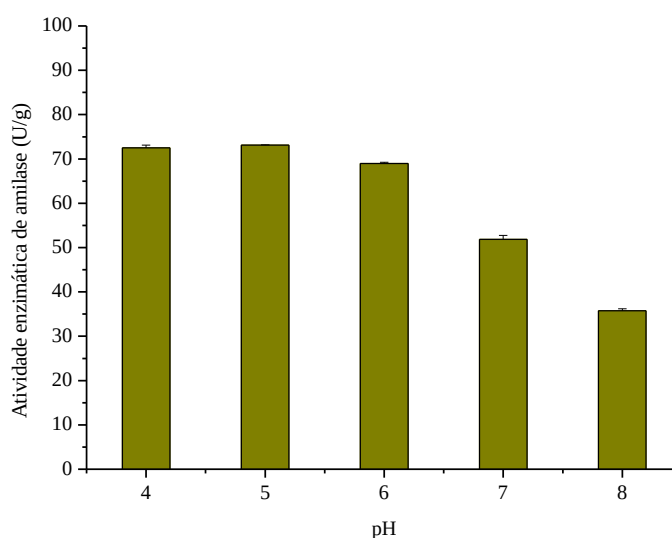
Microrganismo	Amilase (120h)	Amilase (após secagem)
<i>Aspergillus</i> sp. FSDE16	44,60 U/g	73,09 U/g
<i>Penicillium</i> sp. FSDE15	19,79 U/g	36,33 U/g

É possível observar que a atividade de amilases após a secagem aumentou consideravelmente para os dois casos. Neste caso específico, a secagem a temperatura de 60°C foi favorável, o que mostra que as amilases produzidas são estáveis a temperatura e ao retirar a umidade as enzimas se concentram mais no fermentado, se tornando interessante para a etapa de hidrólise, visto que uma boa carga enzimática nesta etapa pode trazer melhores resultados.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. FSDE16

A atividade enzimática de amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 em função do pH está mostrada na Figura 21. Como pode ser observado, o pH ótimo está na faixa entre 4,0 – 6,0, com atividade máxima em pH 5,0.

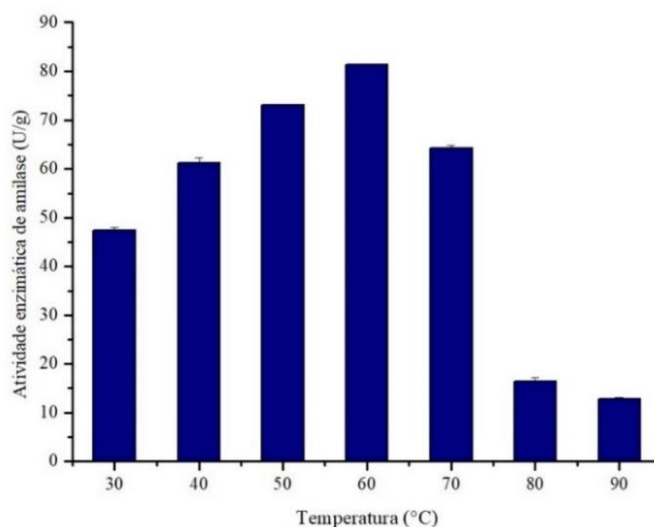
Figura 21 – Avaliação do pH ótimo para atividade das enzimas amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16



Wang, Li e Lu (2018) caracterizaram amilases produzidas por *Aspergillus niger* e determinaram a faixa de pH ótimo entre 4,0 – 6,0. Ayansina, Adelaja e Mohammed (2017) avaliaram a atividade enzimática de amilases produzidas por *Aspergillus flavus* e obtiveram como pH ótimo 6,0. Já Mahapatra e Barnejee (2012) obtiveram pH ótimo de 5,5 para a atividade de amilases produzidas por *Aspergillus aculeatus* DBF9, enquanto Avwioroko, Tonukari e Asagba (2015) ao caracterizarem amilases produzidas por *Aspergillus* sp. CSA25, *Aspergillus* sp. CSA25 e *Aspergillus* sp. CSA26, obtiveram pH ótimo 5,0 para os três casos. No caso em estudo mostrou que a enzima produzida trabalha bem em um faixa de pH de 4 a 6, este resultado é bom pois na utilização da enzima é complicado manter o pH em um valor único, dependendo do processo variações de pH ocorrem com frequência.

A influência da temperatura na atividade enzimática das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 pode ser observada na Figura 22.

Figura 22 – Avaliação da temperatura ótima para atividade das enzimas amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16

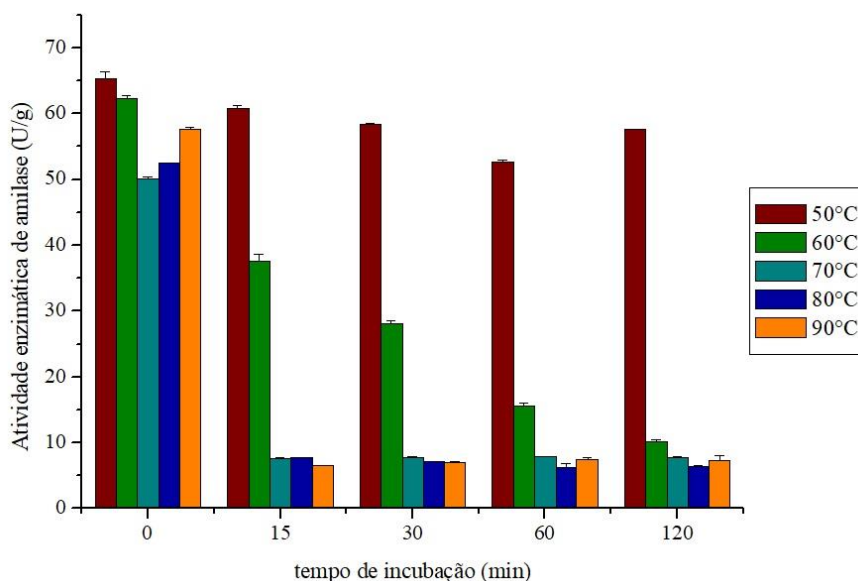


Como pode ser observado, a atividade enzimática das amilases é máxima à 60°C, sendo esta considerada a temperatura ótima. Após esta temperatura, ocorre queda da atividade enzimática com o aumento da temperatura, indicando que a partir de 70°C deve estar acontecendo a desnaturação das enzimas.

Unal (2015) ao caracterizar as amilases produzidas por *Aspergillus niger* obteve como melhor condição de atividade enzimática a temperatura ótima de 65°C. Karim et al. (2019) obtiveram a temperatura ótima de 70°C para a atividade enzimática de amilases produzidas por *Aspergillus flavus* NSH9. Enquanto Aggarwal, Dutta e Sheikh (2019) ao avaliarem a atividade enzimática de amilases produzidas por um fungo do gênero *Aspergillus* isolado do efluente de uma fábrica têxtil e determinaram a faixa de temperatura ótima entre 60°C e 70°C. Já Almeida et al. (2017) caracterizam a atividade amilolítica de enzimas produzidas por *Aspergillus brasiliensis* obtiveram melhores resultados na faixa de temperatura de 50°C a 60°C.

A avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 pode ser observada na Figura 23. Como mostrado na figura, observa-se que na temperatura de 50°C as amilases são termoestáveis pelo tempo de duas horas, porém a partir de 60°C em 15 minutos de reação ocorre queda da atividade enzimática.

Figura 23—Avaliação da termoestabilidade das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16



Wang et al. (2018) ao avaliarem a caracterização de amilases produzidas por *Aspergillus niger* observaram que, em 120 min de incubação, até 50°C estas enzimas se apresentaram consideravelmente estáveis, com atividade relativa de cerca de 45%, ocorrendo queda da atividade relativa para cerca de 8% na temperatura de 60°C. Karam et al. (2017) avaliando a termoestabilidade das amilases produzidas por *Aspergillus awamori* obtiveram que as enzimas se apresentaram relativamente estáveis até a temperatura de 60°C durante 2h de incubação, com atividade residual de 60%, e para as temperaturas de 70°C e 80°C a atividade residual caiu para aproximadamente 30%.

Já Trabelsi et al. (2018) ao caracterizarem as amilases produzidas por *Aspergillus oryzae* S2 obtiveram que estas enzimas permaneceram termoestáveis à 50°C durante 1h de incubação, com atividade relativa de 90%, apresentando queda desta atividade a partir de 60°C. Enquanto Sethi et al. (2016) caracterizam as amilases produzidas por *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 e observaram que as enzimas se apresentaram termoestáveis até a temperatura de 60°C durante 120 min de incubação. Neste caso, mesmo a atividade sendo maior na temperatura de 60°C é melhor para o processo usar temperatura de 50°C, pois nesta temperatura a enzima apresenta com boa estabilidade.

4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE MANDIOCA

A hidrólise dos resíduos de mandioca foi realizada usando as enzimas produzidas pelo *Aspergillus* sp. FSDE 16, com carga enzimática de 28,6 U por grama de resíduo, pH 5,0 e temperatura de 50°C. Foram utilizadas casca e crueira de mandioca trituradas e moídas.

Durante o estudo para obter a melhor condição de concentração de substrato para realização da hidrólise destes resíduos foi percebido que em altas concentrações o meio reacional se tornou muito viscoso, o que dificultou as condições de trabalho para as posteriores análises. Por este motivo, decidiu-se prosseguir os ensaios com a condição de concentração de substrato de 10% (m/v) para os dois resíduos.

A comparação entre as duas granulometrias dos resíduos que foram avaliados na hidrólise pode ser observada nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 – Crueira (a) triturada e (b) moída

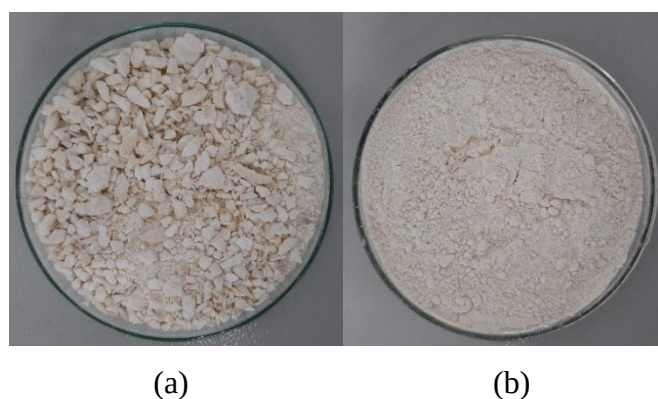
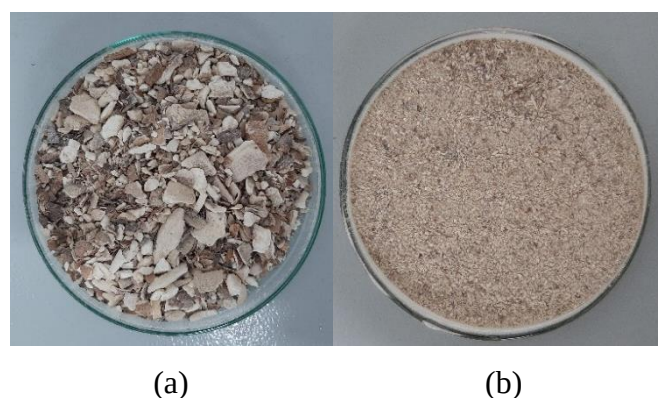


Figura 25 – Casca de mandioca (a) triturada e (b) moída

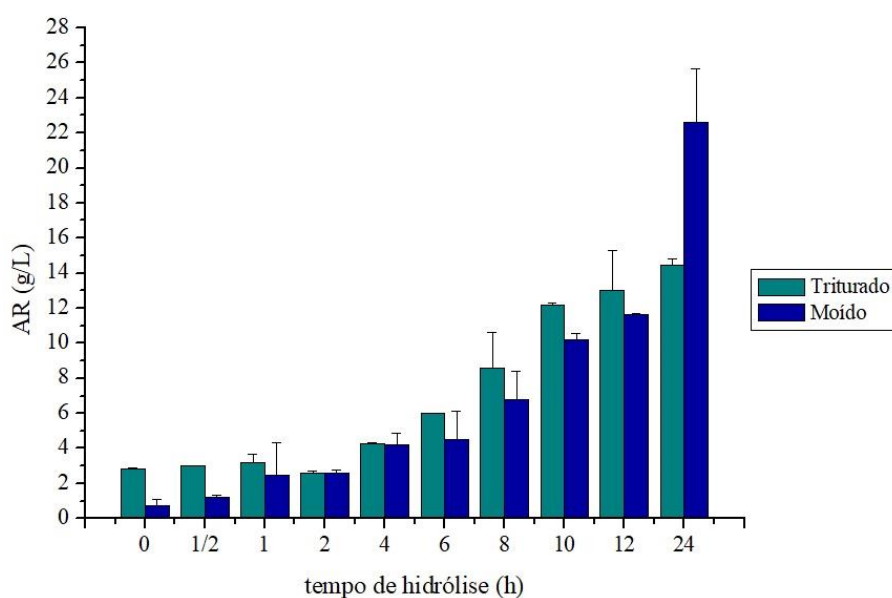


Os resultados da concentração de AR durante a hidrólise enzimática dos resíduos de mandioca em diferentes granulometrias estão mostrados na Figura 26. Como pode ser observado, para ambos os resíduos, a concentração de AR foi aumentando ao longo do tempo,

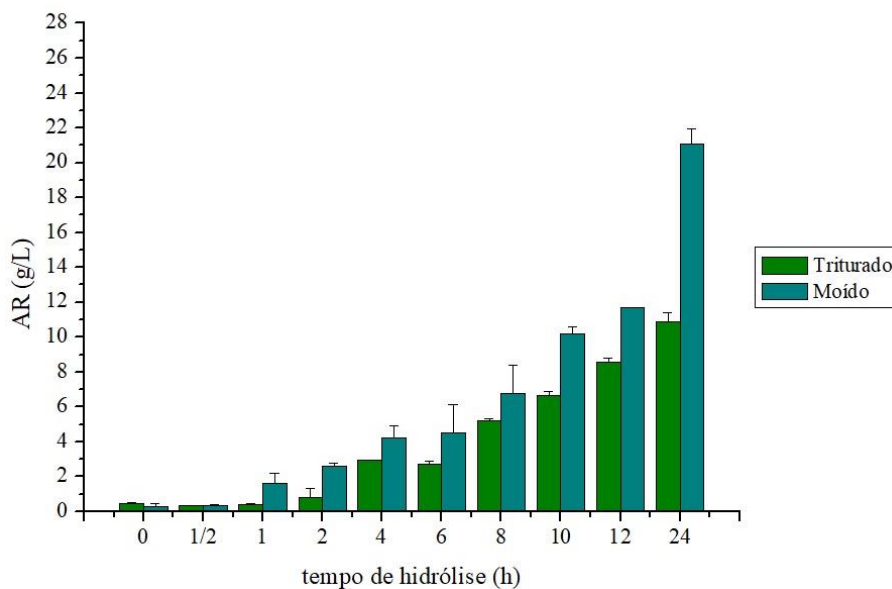
indicando que houve liberação de açúcares durante a hidrólise, atingindo-se o maior valor de concentração em 24h de processo.

Figura 26 – Concentração de açúcares redutores (AR) durante a hidrólise enzimática dos resíduos (a) casca de mandioca e (b) crueira

(a)



(b)



Analisando o comportamento da liberação de açúcares redutores para ambos os casos, é possível observar que ocorreu maior liberação nos experimentos de hidrólise realizados com os resíduos moídos. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que uma menor

granulometria possibilita uma maior área superficial dos sólidos, podendo assim facilitar o ataque enzimático das amilases ao amido existente nos resíduos da mandioca para liberação em açúcares redutores.

Hera, Gomez e Rosell (2013) afirmam que o tamanho das partículas de farinhas de amido influencia na ação das enzimas amilases ao substrato, pois quanto menor o tamanho destas partículas maior a área da superfície por unidade de volume e biodisponibilidade de nutrientes. A área superficial maior com relação ao volume aumenta a adsorção das enzimas ao substrato, melhorando o ataque enzimático e a taxa de hidrólise (FERNANDES, 2018).

No caso da hidrólise da casca triturada o valor máximo da concentração de AR obtido foi 14,44 g/L, enquanto com a casca moída o maior valor atingido foi 22,61 g/L. Já no caso da hidrólise da crueira triturada o maior valor da concentração de AR obtido foi 10,86 g/L e com a crueira moída o valor máximo foi 21,01 g/L. Comparando os valores máximos de concentração de AR que foram obtidos com os dois resíduos triturados em 24h de processo, percebe-se que o valor de concentração obtido com a casca foi maior do que o valor obtido com a crueira, enquanto para os valores de concentração que foram obtidos com os resíduos moídos praticamente não houve diferença.

Gonçalves (2016) ao avaliar a hidrólise enzimática do bagaço de mandioca utilizando amilases produzidas por *Rhizopus oligosporus*, com carga enzimática de 24U/g, pH 5,5 e temperatura de 50°C, obteve concentração de AR de 24 g/L em 50h de experimento. Pereira et al. (2017) em seu estudo sobre avaliação da hidrólise enzimática do amido granular de batata doce utilizando extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus niger*, carga enzimática de 22,50 U/g, pH 5,0 e temperatura de 55°C, em 26h obteve concentração de 17,5 g/L. Escaramboni et al. (2018) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de mandioca ao utilizar extrato enzimático bruto produzido por *Rhizopus oligosporus*, pH 5,5 e temperatura de 55°C, e obtiveram concentração de 36g/L em 12h de ensaio. Já Saekhow et al. (2020) estudaram a hidrólise enzimática do caule da mandioca utilizando a combinação das enzimas comerciais Termamyl e AMG, com carga enzimática de 1,2 U/g e 3,5, respectivamente, pH 7,0 e temperatura de 60°C, e obtiveram a concentração de AR de 12 g/L em 48h.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que às enzimas produzidas pelo *Aspergillus sp.* FSDE 16 mostram resultados promissores na hidrólise dos resíduos de mandioca, lembrando que foi utilizado o extrato bruto enzimático, sem passar por nenhum processo de concentração ou purificação.

5 CONCLUSÕES

Dentre os cultivos realizados com o fungo *Penicillium* sp. FSDE15 em meios contendo bagaço de malte e resíduos de mandioca em diversas proporções, os cultivos contendo bagaço e casca se mostraram mais promissores.

Através da avaliação das concentrações de nutrientes no meio de cultivo, foi percebido que a adição de nutrientes não se faz necessária, sendo suficiente a presença de casca de mandioca no meio de cultivo.

Foi possível obter as condições ótimas de pH e temperatura que maximizam a atividade das amilases produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15, sendo a enzima ativa na faixa de pH de 4,0 a 8,0 e nas temperaturas entre 30 e 90°C.

O farelo de trigo e a casca de mandiocas e mostraram como bons indutores para a produção de amilases, onde foram obtidos maiores valores de atividade enzimática com o fungo *Aspergillus* sp. FSDE16.

A caracterização enzimática das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 mostrou que a enzima apresenta maior atividade no pH 5,0 e temperatura de 60°C, mas se mostrando ativa na faixa de pH entre 4 e 6, e estabilidade na temperatura de 50°C por até duas horas.

A avaliação da hidrólise enzimática foi realizada utilizando-seo extrato enzimático bruto como carga enzimática e os melhores resultados foram obtidos para os resíduos moídos quando comparados com os resíduos triturados.

Ambos os resíduos se mostraram promissores para obtenção de açúcares fermentescíveis através do processo de hidrólise enzimática.

Como sugestões para trabalhos futuros, seria interessante avaliar outras condições de concentração de substrato e carga enzimática na etapa de hidrólise.

REFERÊNCIAS

- ABDULAAL, W. H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochemistry**, v. 19, 2018.
- ABDULLAH, R.; SHAHEEN, N.; IQTEDAR, M.; NAZ, S.; IFTIKHAR, T. Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus niger* (BTM-26) in solid state fermentation. **Pak. J. Bot.**, v. 46, n.3, p. 1071 – 1078, 2014.
- ABDULLAH, R.; NADEEM, S.; IQTEDAR, M.; KALLEM, A.; IFTIKHAR, T.; NAZ, S. Influence of growth conditions on enhanced production of alpha amylase from *Penicillium* species in solid state fermentation. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 426 – 432, 2017.
- AGGARWAL, R.; DUTTA, T.; SHEIKH, J. Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, 100178, 2019.
- AISIEN, E. T.; IGBINOSA, I. H. Production, purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* using cassava peels as substrate. **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 36, p. 114 – 126, 2019.
- AJALA, E. O.; AJALA, M. A.; TIJANI, I. A.; ADEMOLA, A. A.; SURU, I. S. Kinetics modelling of acid hydrolysis of cassava (*Manihot esculanta* Cranz) peel and ITS hydrolysate chemical characterisation. **Journal of King Saud University**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.03.003>, 2020.
- ALEIXO JÚNIOR, M. E. **Produção e caracterização de enzimas produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15 usando bagaço de malte**. João Pessoa, 63 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- ALMEIDA, A. C. **Bioprospecção de fungos amilolíticos e caracterização bioquímica da amilase de *Mucor* sp. AD742 visando aplicação na hidrólise do amido**. Diamantina, 92 p. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.
- ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 03, e20170337, 2017.
- ALVES, G.S.; SAMPAIO, A. P. L.; ZAVOLSKI, C. A.; BRITO, V. H.; CEREDA, M. P.; NEZES, E. Material a base de amido de mandioca para manufatura de embalagem de alimentos. **Revista Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**, v. 02, n. 01, p. 16 – 24, 2012.

- AMIT, K.; NAKACHEW, M.; YILKAL, B.; MUKESH, Y. A review of factors affecting enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, n. 7, p. 62 – 67, 2018.
- APPRICH, S.; TIRPANALAN, O.; HELL, J.; REISINGER, M.; BOHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 56, p. 222 – 231, 2014.
- ARAÚJO, A. S.; MARTINS, E. da S. Produção de α -amilases por *Rhizocomur miehei* E *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. **Nucleus**, v. 15, n.2, p. 583 – 592, 2018.
- ARAÚJO, D. de M.; SILVA, J. H.V da; MIRANDA, E. C. de; ARAÚJO, J. A. de; COSTA, F. G. P.; TEIXEIRA, E. N. M. Farelo de trigo e complexo enzimático na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 843 – 848, 2008.
- ARAÚJO, J. S. de P.; LOPES, C. A. **Produção de farinha de mandioca na agricultura familiar**. 13^a ed. Rio Rural, 2009.
- ARAÚJO, L. A. **Cinética da produção de amilases produzido por *Aspergillus* sp.** FSDE16 em bagaço de malte. João Pessoa, 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- ARAÚJO, L. de F.; AGUIAR, E. M. de.; COELHO, R. R. P.; LUCIANO, R. C.; FILHO, R. B.; NAVARRO, L. A. de O. Enriquecimento nutricional da casca da mandioca (*Manihot esculenta*) por processo biotecnológico destinado à alimentação animal. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 13, n. 1, p. 18 – 30, 2017.
- AVWIOROKO, O. J.; TONUKARI, N. J.; ASAGBA, S. O. Biochemical characterization of crude α -amylase of *Aspergillus* spp. associated with the spoilage of cassava (*Manihot esculenta*) tubers and processed products in Nigeria. **Advances in Biochemistry**, v. 3, p. 15 – 23, 2015.
- AYACHE, G. E. **Diagnóstico das condições socioeconômicas dos produtores de farinha de mandioca da colônia pulador, Anastácio – MS**. Campo Grande, 47 p. Dissertação (Mestrado em Produção e Gestão Agroindustrial - Programa de Pós-Graduação em Produção e Gestão Agroindustrial, Universidade Anhaguera-Uniderp, Campo Grande, 2015.
- AYANSINA, A. D. V.; ADELAJA, A. O.; MOHAMMED, S. S. D. Characterization of amylase from some *Aspergillus* and *Bacillus* species associated with cassava waste peels. **Scientific Research Publishing**, v. 7, p. 280 – 292, 2017.
- BABU, C. R.; KETANAPALLI, H.; BEEBI, S. K.; KOLLURU, V. C. Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v. 9, p. 21 – 27, 2018.
- BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. Natal, 141 p. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

BALKAN, B.; ERTAN, F. Production and properties of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 35, p. 169 – 178, 2005.

BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid-state fermentation by using some agricultural by-products. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 45, n. 4, p. 439 – 442, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Editora da Unicamp, 2001.

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, 2018.

BEZERRA, V. S. **Farinhas de Mandioca Seca e Mista**. 1ª. ed. Embrapa, 2006.

BOMTEMPO, F. V. S.; CARREIRO, S. C.; PIMENTA, R. S.; GUARDA, E. A. Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 7, n. 1, p. 26 – 44, 2017.

BÓZIC, N.; LONCAR, N.; SLAVIC, M. S.; VUJCIC, Z. Raw starch degrading α -amylases: na unsolved riddle. **Amylase**, v. 1, p. 12 – 25, 2017.

BRITO, R. G. **Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*)**. Coari, 54 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Coari, 2017.

CARBOUÉ, Q.; TRANIER, M-S.; PERRAUD-GAIME, I.; ROUSSOS, S. Production of microbial enzymes by solid-state fermentation for food applications. **Microbial Enzyme Technology in Food Applications**, p. 437 – 451, 2017.

CARVALHO, A. V. **Cultura da mandioca**. p. 244 – 257, Embrapa, 2016.

CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T. **Bioprospecção de fungos celulolíticos provenientes da agroindústria para produção de bioetanol**. João Pessoa, 198 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

CASTRO, A. M.; SANTOS, A. F. dos; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutriente medium production. **Current Developments in Biotechnology and bioengineering**, p. 185 – 210, 2018.

CECCATO, B. T. **Modelagem da cinética de secagem e caracterização físico-química do bagaço de malte da produção de cerveja artesanal**. Francisco Beltrão, 66 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Química) – Departamento Acadêmico de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2019.

CERVBRASIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2016**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 09/03/2020.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Rio de Janeiro, 183 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Trigo - Análise Mensal – Fevereiro/2020**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo>>. Acesso em: 12/03/2020.

CORDEIRO, L. G. **Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. João Pessoa, 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

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.

COSTA, S. S.; SANTOS, A. M.; SOUZA, R. R. de.; SILVA, C. F. Estudo do processo de sacarificação da crueira visando a produção de bioetanol. **Scientia Plena**, v. 12, n. 8, 084203, 2016.

CRUZ, E. A. MELO, M. C., SANTANA, N.B., FRANCO, M., SANTANA, R. S. M., SANTOS, L. S., GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas Saúde**, v. 13, n. 4, p. 245-249, 2011.

CRUZ, R.; RIBEIRA, H. H. P.; FERNANDES, A. R.; SILVA, C. A. B. da; **Processamento de mandioca**. Projetos de empreendimentos agroindustriais – Produtos de origem vegetal. 1ª ed. Editora UFV, 2003.

CUNHA, J. R. B., SANTOS, F. C. P., ASSIS, F. G. do V., LEAL, P. L. Cultivo de *Penicillium spp.* em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, v. 63, n.5, p. 597-504, 2016.

DHARANI AIYER, P. V. 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.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutriente medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger*B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2671 – 2678, 2007.

DOURADO, D. P.; MACÊDO, D. A.; TONANI, F. L.; MURAISHI, C. T. Caracterização bromatológica e classificação da casca da mandioca como fonte para alimentação animal. **Revista Integralização Universitária – RIU**, v. 12, n.16, p. 22 – 30, 2017.

EL-SHISHTWAY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 29, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Mandioca e Fruticultura**. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/mandioca/b1_mandioca.pdf>. Acesso em: 10/03/2020.

ERDAL, S.; TASKIN, M. Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 3, 2010.

ESCARAMBONI, B.; NÚÑEZ, E. G. F.; CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O. Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions. **Industrial Corps & Products**, v. 112, p. 368 – 377, 2018.

FARIA SILVA, L. A. de; CARVALHO, S. A. de; FILHO, D. F.; ALVES, M. F.; SILVA, N. L. T.; GOMES, J. R.; SANTOS, K. S. Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa. **Cad. Ciênc. Agrá.**, v. 9, n. 3, p. 49 – 53, 2017.

FERNANDES, E. S. **Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Rio Claro, 63 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, 2018.

FERREIRA, O. E.; MONTIJO, N. A.; MARTINS, E. da S.; MUTTON, M. J. R. Production of α -amylase by solid state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 622 – 628, 2015.

FORMELA, K.; HEJNA, A.; PISZCZYK, L.; SAEB, M. R.; COLOM, X. Processing and structure-property relationships of natural rubber/wheat bran biocomposites. **Cellulose**, v. 23, p. 3157 – 3175, 2016.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. da S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, p. 226 – 262, 2014.

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

GOSH, P.; DAS, A.; GAYEN, S.; MONDAL, K. C.; GOSH, U. Statistical optimization of α -amylase production from *Penicillium notatum* NCIM 923 and kinetics study of the purified enzyme. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 179 – 188, 2015.

GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. C.; LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, 2014.

GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. **Wheat: more than just a Plant.** “Future of flour” The comprehensive manual of practical information on cereals, flour and improvement. Disponível em: <http://mehlverbesserung.de/downloads-future-of-flour/FoF_Kap_02.pdf>. Acesso em: 12/03/2020.

HERA, E.; GOMEZ, M.; ROSELL, C. M. Particle size distribution of rice flour affecting the starch enzymatic hydrolysis and hydration properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 421 – 427, 2013.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939 – 945, 2015.

HUSSAIN, I.; SIDDIQUE, F.; MAHMOOD, M. S.; AHMED, S. I. A review of the microbiological aspect of α -amylase production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 5, p. 1029 – 1034, 2013.

HYSENI, B.; AYTEKIN, A. Ö.; NIKEREL, E. Solid State fermentation for enzyme production for food industry. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 7, n. 6, p. 615 – 622, 2018.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 55 – 64, 2012.

KAHIL, T.; HASSAN, H. M. Economic co-production of cellulase and α -amylase by fungi grown on agro-industrial wastes using solid-state fermentation conditions. **Middle East Journal of Applied**, v. 5, n. 1, p. 184 – 195, 2015.

KALAIARASI, K.; PARVATHAM, R. Optimization of process parameters for α -amylase production under solid-state fermentation by *Aspergillus awamori* MTCC 9997. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 74, p. 286 – 289, 2015.

KARAM, E. A.; WAHAB, W. A. A.; SALEH, S. A. A.; HASSAN, M. E.; KANSO, A. L.; ESAWY, M. A. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 694 – 703, 2017.

KARIM, K. M. R.; HUSAINI, A.; SING, N. N.; TASNIM, T.; SINANG, F. M.; HUSSAIN, H.; HOSSAIN, M. A.; ROSLAN, H. Characterization and expression in *Pichia pastoris* of a raw starch degrading glucoamylase (GA2) derived from *Aspergillus flavus* NSH9. **Protein Expression and Purification**, v. 164, 105462, 2019.

KARRI, S.; TALLA, S. G.; RENUKA; DHOLPURI, S. Screening and production optimisation of alpha amylase from *Aspergillus* strains by using solid state fermentation.

International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 3, n. 4, p. 623 – 631, 2014.

KONOPKA, D. N. **Avaliação nutricional de resíduos de casca de mandioca fermentados por *Yarrowia Lipolytica***. Laranjeiras do sul, 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2018.

LIMA, R. C. F. de. **Produção da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada**. Alegre, 98 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

LINHARES, L. DO L. **Avaliação do potencial de aproveitamento do bagaço de malte cervejeiro para obtenção de xarope de glicose**. Rio de Janeiro, 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 267 – 298, 2017.

LUFT, L. **Hidrólise enzimática do bagaço de malte usando tecnologias alternativas visando à obtenção de açúcares fermentescíveis**. Santa Maria, 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^a ed. IMESP, 1985.

MACHADO, A. R. G. **Elaboração de um produto de panificação à base de crueira e cogumelo comestível**. Manaus, 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

MAHAPTRA, S.; BANERJEE, D. Production and characterization of thermal acid amylase from *Aspergillus aculeatus* DBF9. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, p. 109 – 112, 2012.

MAO, L.; CONE, J. W.; HENDRIKS, H.; ANTON, S. M. Wheat bran addition improves *Ceriporiopsis subvermispura* and *Lentinula edodes* growth on wheat bran, but not delignification. **Animal Feed Science and Technology**, v. 259, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114361>, 2019.

MARTINEZ, D. G. **Produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos do processamento da mandioca**. Cascavel, 48 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, Universidade do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.

MASSARDI, M. M.; MASSINI, R. M. M.; SILVA, D. J. Caracterização química do bagaço de malte e avaliação do seu potencial para obtenção de produtos de valor agregado. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. 83 – 91, 2020.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Anuário da cerveja 2019**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2020/03/anuario-cerveja-WEB.pdf>. Acesso em: 09/03/2020.

MORAES, S. L. de; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P. da; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, p. 58 – 73, 2017.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potencial applicantions. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1 – 14, 2006.

NETO, A. A. de O.; SANTOS, C. M. R. **A cultura do trigo**. CONAB, 2017.

NEUMANN, É. R.; PEREIRA, C. R.; RESENDE, J. T. V. de; GOMES, A. C. S.; STOSKI, S. Doses de Potássio na Produção e Qualidade do Álcool de Bata Doce. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, p. 256 – 266, 2014.

NOUARDI, T.; MERAIHI, Z.; SHAHRAZED, D-D.; LEILA, B. Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 6, p. 155 – 162, 2010.

NUNES, R. de M.; ARAÚJO, R. F.; GUARDA, E. A. Avaliação do potencial de produção de etanol por hidrólise enzimática do licor negro gerado na produção de papel a partir do farelo de arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 4, p. 433 – 437, 2014.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F. da; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 16, n. 7323875, 2016.

ONA, J. I.; HALLING, P. J.; BALLESTEROS, M. Enzyme hydrolysis of cassava peels: treatment by amylolytic and cellulolytic enzymes. **Biocatalysis and Biotransformation**, DOI: 10.1080/10242422.2018.1551376, 2018.

ONIPE, O. O.; JIDEANI, A. I. O.; BESWA, D. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. **International Journal of Food Science and Techonology**, v. 50, p. 2509 – 2518, 2015.

ONOFRE, S. B.; ABATTI, D.; REFOSCO, D.; TESSARO, A. A.; ONOFRE, J. A. B.; TESSARO, A. B. Characterization of α -amylase produced by the endophytic strain of *Penicillium digitatum* in solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 28, p. 1511 – 1519, 2016.

PEREIRA, A. da S.; FONTAN, R. I. da C.; FRANCO, M.; JÚNIOR, E. C. de S.; VELOSO, C. M.; SAMPAIO, V. S.; BONOMO, P.; BONOMO, C. F. Study of alpha-amylase obtained by solid state fermentation of cassava residue in aqueous two-phase systems. **Brazilian of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 1141 – 1152, 2018.

PEREIRA, C. R.; RESENDE, J. T. V.; GUERRA, E. P.; LIMA, V. A.; MARTINS, M. D.; KNOB, A. Enzymatic conversion of sweet potato granular starch into fermentable sugars: Feasibility of sweet potato peel as alternative substrate for α -amylase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 231 – 238, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, G.; PEREIRA, E. M. de O.; PEREIRA FILHO, M.; BARBOSA, P. de S.; BRASIL, E. M.; SHIMODA, E. Parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui alimentados com rações contendo farinha de crueira de mandioca. **ACTA Biomedica Brasiliensia**, v. 4, n. 1, 2013.

PINHEIRO, L. R.; AMBROZIM, F. M.; OLIVEIRA, V. M. Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindústrias. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19056 – 19060, 2019.

POOJA, N. S.; SAJEEV, M. S.; JEEVA, M. L.; PADMAJA, G. Bioethanol production from microwave-assisted acid or alkali-pretreated agricultural residues of cassava using separate hydrolysis and fermentation (SHF). **3 Biotech**, v.8, n. 69, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1095-4>, 2018.

REIS, A. A. **Produção e caracterização de amilases bacterianas: α -amilase e Ciclodextrina Glucanotransferase (CGTase)**. São José do Rio Preto, 108 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

ROCHA, B. C. **Avaliação da termoestabilidade e das condições de extração das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte**. João Pessoa, 47 p. Monografia (Curso de Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

ROCHA, G. G. C.; SANTOS, A. M.; COSTA, S. S.; BISPO, D. F.; SOUZA, R. R.; PAGANO, R. L.; SILVA, C. F. Crueira: resíduo agroindustrial sólido rico em amido. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, 054209, 2016.

RODRIGUES, M. Â.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. M. de. **Jornadas de LÚPULO e CERVEJA, Novas oportunidades de negócio, Livro de atas**. Instituto Politécnico de Bragança, 2015.

RODRIGUES, M. L. F.; SILVA, E. A. da.; BORBA, C. E.; OLIVEIRA, A. C. D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, M. L. F.; STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 129 – 145, 2015.

RODRIGUES, P. de O. **Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. Dissertação, 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia de Biocombustíveis) - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Uberlândia, 2016.

RODRIGUEZ-ZÚNGA, U. F. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. São Carlos, 197

p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SAEKHOW, B.; CHOOKAMLANG, S.; NA-U-DOM, A.; LEKSAWASDI, N.; SANGUANCHAIWONG, V. Enzymatic hydrolysis of cassava stems for butanol production of isolated *Clostridium* sp. **Energy Reports**, v. 6, p. 196 – 201, 2020.

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

SANTOS, F. C. P. dos; CUNHA, J. R. B.; ASSIS, F. G. do v. de; LEAL, P. L. Enzyme production by soil filamentous fungi under solid-state fermentation in banana stalk. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 3, p. 424 – 431, 2017.

SANTOS, L. M.; ORLANDELLI, R. C. Xilanases fúngicas: aproveitamento do farelo de trigo em processos fermentativos e panificação. **Evidências**, v. 19, n. 2, p. 243 – 258, 2019.

SANTOS, P da S. **Prospecção, seleção e aplicação de bactérias provenientes de mandioca (*Manihot esculenta*) na produção de etanol por sacarificação e fermentação silmultâneas de manipueira com *Saccharomyces cerevisiae***. Salvador, 81 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr, A. C; R. de ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, 2018.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A de; MIRANDA, M. Z. de; LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211 – 222, 2011.

SELIM, A. E. I.; MOSTAFA, A. A.; EID, M. A. M. Amylase production by some local fungal isolates using some agricultural by-products via solid state fermentation. **J. Agric. Chem. and Biotechn**, v. 8, n. 9, p. 217 – 220, 2017.

SETHI, S.; GUPTA, S. Isolation, characterization and optimization of cultural conditions for amylase production from fungi. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 9, p. 3356 – 3363, 2015.

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. K.; DASMOHAPATRA, P. K.; SAHOO, S. L.; PATRA, J. K. Production of α -amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet and its structural characterization. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 639, 2016.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S.; SENA, S. Characterization of purified α -amylase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet as substrate. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, 1158902, 2016.

SILVA, L. E. B.; SANTOS, J. K. B. dos; BARBOSA, J. P. F.; LIMA, L. L. C.; SILVA, J. C. de S. Aspectos gerais e peculiaridades sobre mandioca. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 1, p. 13 – 23, 2018.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α - amylases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, p. 3 – 24, 2017.

SINHA, S.; VAKILWALA, M. Effect of various process parameters of fungal amylase from *Aspergillus* spp. **IJRSI**, v. 3, n. 5, p. 23 – 27, 2016.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDEBERGHE, L. P. de S. Recent developments and inovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52 – 71, 2017.

SODRÉ, L. F.; SANTOS, W. F.; ASCÊNCIO, S. D.; PELUZIO, J. M.; SILVA, R. M.; REINA, E. Divergência genética em milho para baixo e alto nitrogênio visando à produção de óleo e proteína. **Pesq. Agropec. Pernamb.**, v. 22, 2017.

SOUTO, L. R. F. **Utilização do amido da casca de mandioca na produção de vinagre: características físico-químicas e funcionais**. Goiânia, 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SOUTO, L. R. F.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S.; FIORDA, F. A.; GARCIA, M. C. Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 19 – 24, 2017.

SOUZA, F. V. de A.; RIBEIRO, S. da C. do A.; SILVA, F. L. da; TEODÓSIO, A. E. M. de M. Resíduos da mandioca em agroindústrias familiares no nordeste do Pará. **Revista Verde**, v. 4, n.1, p. 92 – 98, 2019.

SOUZA, L. C. F. **Hidrólise enzimática do resíduo de fabricação de pamonha**. Patos de Minas, 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Biocombustíveis) – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

SUNDARRAM, A.; PANDURANGAPPA, T.; MURTHY, K. α -amylase production and applications: A review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166 – 175, 2014.

TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K.; FATIMA, A. Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 2, p. 21 – 24, 2007.

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

TRABELSI, S.; SAHNOUN, M.; ELGHARBI, F.; AMERI, R.; MABROUK, S. B.; MESGHANI, M.; HMIDA-SAYARI, A.; BEJAR, S. *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 921 – 932, 2019.

UNAL, A. Production of α -amylase from some thermophilic *Aspergillus* species and optimization of its culture medium and enzyme activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 47, p. 3179 – 3183, 2015.

UZUN, U.; DEMIRCI, E.; AKATIN, M. Y. Purification and characterization of *Rhizoctonia solani* AG-4 strain ZB-34 α -amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. **Turk j. Biochem.** DOI: <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0159>, 2017.

VALERIANO, I. H.; MARQUES, G. L. L.; FREITAS, S. P.; COURI, S.; PENHA, E. das M.; GONÇALVES, M. M. M. Cassava pulp enzymatic hydrolysate as a promising feedstock for ethanol production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

VENTURIN, P. R. F. **Análise do aproveitamento energético do biogás obtido na biodigestão anaeróbia de manipueira em uma farinheira de mandioca.** Campo Mourão, 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental) – Departamento Acadêmico de Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2017.

VERDE, A de A.; CUCOLO, M. C.; OLIVEIRA, M. L. C.; CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P. Destino sustentável de resíduos de cervejaria artesanal: um estudo em uma granja de suínos. **Revista Valore**, v. 4, p. 83 – 93, 2019.

VILHALVA, D. A. A.; JÚNIOR, M. S. S.; CALIARI, M.; SILVA, F. A. da. Secagem convencional de casca de mandioca proveniente de resíduos de indústria de amido. **Pesq. Agropec. Trop**, v. 42, n. 3, p. 331 – 339, 2012.

WANG, J.; LI, Y.; LU, F. Molecular cloning and biochemical characterization of an α -amylase Family from *Aspergillus niger*. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 32, p. 55 – 62, 2018.

WANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, X.; SHANG, J.; LI, Y.; ZHANG, H.; LU, F.; LIU, F. Biochemical characterization and molecular mechanism of acid denaturation of a novel α -amylase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 222 – 231, 2018.

WESENDONCK, W. R. **Valor nutricional de diferentes subprodutos do trigo para suínos em crescimento.** Porto Alegre, 81 p. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

WISNIEWSKI, A. C. **Produção de α -amilase e glucoamilase por *Macrocybe titans* cultivado em resíduos sólidos agroindustriais.** Blumenau, 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

WISNIEWSKI, A. C., ALMEIDA, M. A. L., PALMA, M. B., TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo de processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 285-293, 2010.

XIAN, L.; WANG, F.; LUO, X.; FENG, Y-L.; FENG, J-X. Purification and characterization of a highly eficiente calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95, DOI: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1312944>, 2015.

YAN, X.; YE, R.; CHEN, Y. Blasting extrusion processing: The increase of soluble dietary fiber contente and extraction of soluble-fiber polysaccharides from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 180, p. 106 – 115, 2015.

YI, Z.; FANG, Y.; HE, K.; LIU, D.; LUO, H.; ZHAO, D.; HE, H.; JIN, Y.; ZHAO, H. Directly mining a fungal thermostable α -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter. **Microbial Cell Factories**, v. 17, 2018.

ZAFERANLOO, B.; BHATTACHARJEE, S.; GHORBANI, M. M.; MAHON, P. J.; PALOMBO, E. A. Amylase production by *Preussia mínima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secreto-me by LC-MS. **BMC Microbiology**, v. 14, 2014.

ZHAO, X.; YI, S.; LI, H. The optimized co-cultivation system of *Penicillium oxalicum* 16 and *Trichoderma reesei* RUT-C30 achieved a high yield of hydrolase applied in second-generation bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 136, p. 1028 – 1035, 2019.