



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

DIEGO GUEDES DE LIMA LEMOS

**UTILIZAÇÃO DE BAGAÇO DE MALTE DA
INDÚSTRIA CERVEJEIRA PARA
PRODUÇÃO DE AMILASE POR
AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* spp.
ISOLADOS DE AMOSTRAS DO SOLO DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Recife, 17 de agosto de 2021

DIEGO GUEDES DE LIMA LEMOS

**UTILIZAÇÃO DE BAGAÇO DE MALTE DA
INDÚSTRIA CERVEJEIRA PARA
PRODUÇÃO DE AMILASE POR
AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* spp.
ISOLADOS DE AMOSTRAS DO SOLO DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Cartlos Alberto Alves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosileide Fontenele

Recife, 17 de agosto de 2021

Ficha Catalográfica.

L557u

Lemos, Diego Guedes de Lima

Utilização de bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *Aspergillus* spp. isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco / Diego Guedes de Lima Lemos , 2021

62 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto Alves da Silva

Coorientadores: Hilário Jorge Bezerra de Lima, Rosileide Fontenele

Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2021.

1. Biotecnologia. 2. Amilases. 3. *Aspergillus*. I. Título.

CDU 574.6

Luciana Vidal CRB-4/1338

**UTILIZAÇÃO DE BAGAÇO DE MALTE DA
INDÚSTRIA CERVEJEIRA PARA PRODUÇÃO
DE AMILASE POR AMOSTRAS DE
ASPERGILLUS spp. ISOLADOS DE
AMOSTRAS DO SOLO DA CAATINGA DE
PERNAMBUCO**

DIEGO GUEDES DE LIMA LEMOS

Examinadores:



Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP



Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima (Membro interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. Dra. Luciana de Oliveira Franco (Membro externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Defendida em: 17/08/2021.

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Dedico esta dissertação àqueles que foram o mais importante alicerce
me mantendo de pé nos momentos difíceis,
meu maior bem: Minha Família.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus, acima de de tudo. Sua luz me indicou o caminho da sabedoria e do sucesso, também de todo livramento para ter a saúde e discernimento necessários para estar aqui.

Sou grato a minha família Maria Isabel de Lima Lemos, Davi de Lima Lemos, Ísia Maria Tavares de Lima Lemos e também, Nazide Guedes de Lima e Gilvan Carmo de Lima (filhos, esposa e pais respectivamente), por terem a devida paciência e sempre estarem ao meu lado em todos os momentos me amparando quando necessário.

Ao orientador do trabalho, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, que dedicou além do seu precioso tempo parte de sua saúde, para me direcionar sempre ao caminho certo, contribuindo mais uma vez para minha formação acadêmica, abrindo horizontes aos meus conhecimentos em prol dos meus ideais profissionais e humanos.

Agradeço aos meus coorientadores do Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima (no qual tenho como um irmão) e a Profa. Dra. Rosileide Fontenelle, que foram importantes suportes no processo de formação técnica e profissional.

Sou eternamente grato aos meus professores principalmente Prof. Dr. Sergio Carvalho de Paiva, Profa. Dra. Arminda Messias Sacone, Prof. Dr. Valdemir Alexandre, Profa. Dra. Leonie Sarubbo e Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, que estiveram presentes desde a graduação me apoiando tecnicamente para meu engradecimento profissional.

Agradeço a todo corpo de funcionários da Universidade Católica de Pernambuco, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão e sucesso do meu trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais (Unicap) em especial, Jaqueline dos Santos Marinho, Uiara Maria de Barros Lira Lins, Eduardo França e Ivan Lins, pelo companheirismo, apoio e auxílio durante o curso.

A todos os professores do programa, em especial ao Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima, aos quais nunca se furtaram em ajudar, orientar e contribuir de forma direta para os resultados obtidos nesse trabalho. Agradeço também aos membros da banca de qualificação e defesa pública que, contribuíram de forma decisiva para a qualidade do trabalho realizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de fomento à pesquisa para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I	14
1 INTRODUÇÃO	15
1. OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo Geral	18
1.2 Objetivos Específicos.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais.....	19
2.2 Produção de Biomassa de Malte	19
3.2.1 Malte Cervejeiro	19
3.2.2 Processo cervejeiro e geração de biomassa	23
3.2.3 Características do bagaço de malte (BSG)	25
2.3 Bioprospecção e Produção de Metabólitos Fúngicos	26
3.3.1 Importância biotecnológica do gênero <i>Aspergillus</i>	30
3.3.2 Enzimas e suas aplicações	33
3.3.3 Amilases	35
2.4 Validação Estatística de Dados	35
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II	51
Título e Aceite Artigo.....	52
Resumo	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	62
AGRADECIMENTOS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO III	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
CAPÍTULO IV	74
PERSPECTIVAS FUTURAS	75

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Mapa dos países exportadores de cevada no mundo.....	20
Figura 2 – Estrutura do grão de cevada	21
Figura 3 – Estrutura molecular do amido	22
Figura 4 – Esquema de obtenção do bagaço de malte através do processo cervejeiro	24
Figura 5 – Bagaço de malte utilizado na pesquisa.....	25
Quadro 1 – Fungos que ocorrem na Caatinga, suas principais características estruturais e ecológicas e seus efeitos benéficos e maléfic	27
Figura 6 – Conidióforo de um <i>Aspergillus</i> bisseriado (<i>Aspergillus ocraceus</i>) e terminologia das estruturas utilizadas em sua identificação e classificação	32

CAPÍTULO II

Figura 1 - Diagrama de Pareto para análise estatística do pH, temperatura e concentração do resíduo frente a atividade amilolítica após cultivo de <i>Aspergillus</i> spp. UCP1275 (cepa 1)	61
Figura 2 - Atividade enzimática em função temperatura e concentração de resíduo avaliado pelos gráficos de superfície resposta (A) e curva de contorno (B)	61
Figura 3 - Diagrama de Pareto para análise estatística da produção de biomassa após cultivo de <i>Aspergillus</i> spp. UCP1275 (cepa 1) em meio contendo bagaço de malte (MBM).....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Classificação internacional das enzimas	33
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Planejamento fatorial para avaliação do pH, temperatura e concentração do resíduo na atividade amilolítica pela cepa selecionada.....	56
--	----

Tabela 2 – Avaliação do potencial de cepas de <i>Aspergillus</i> spp. na produção de amilase em meio contendo amido solúvel.....	57
--	----

Tabela 3 – Seleção das cepas de <i>Aspergillus</i> spp. com maior potencial amilolítico em meio com bagaço de malte	58
---	----

Tabela 4 – Resultado da composição bromatológica do bagaço de malte.....	59
--	----

Tabela 5 – Avaliação do pH, temperatura e concentração do resíduo na atividade amilolítica pela cepa selecionada utilizando bagaço de malte como fonte de carbono	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSG - Do inglês Brewer's spent grain
- UCP - Colônia do banco Unicap
- FES – Fermentação em estado sólido
- FS – Fermentação submersa
- ZERI —Zero Emissions Research Initiative
- EC - Enzyme commission
- CV – Coeficiente de variação
- H0 = Hipótese zero
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- PIB – Produto interno bruto
- MBM – Meio bagaço de malte
- MCP – Meio padrão
- WFCC - World Federation for Culture Collections
- MS - Matéria seca
- MM - Matéria mineral
- NT - Nitrogênio total
- PT - Proteína total
- FDA - Fibra detergente ácido
- FDA – Food and Drug Administration
- GRAS – Geralmente reconhecido como seguro
- FDN - Fibra detergente neutro
- ENN - Extrato não nitrogenado
- FT - Fibra total
- EE - Extrato etéreo - %;
- AM – Amido
- UV-VIS – Espectroscopia ultravioleta
- V_m - Volume da mistura reacional

RESUMO

A produção de enzimas microbianas através de processos fermentativos tem passado por constante evolução técnico-científica, principalmente na aplicação de resíduos agroindustriais nestes bioprocessos. As amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos incluindo dextrinas e glicose. O bagaço de malte representa cerca de 85% do total de resíduos gerados em uma cervejaria. Os fungos filamentosos apresentam um elevado potencial de conversão de macromoléculas em produtos biotecnológicos, principalmente o gênero *Aspergillus*. A seleção foi realizada em amostras de *Aspergillus* spp. (UCP 1275, UCP 6119, UCP 1295 e UCP 1261) isolados de solos da Caatinga nordestina, através do processo de fermentação submersa em meio padrão: extrato de levedura 2 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, contendo amido como fonte de carbono (10 g/L), e também, em meio alternativo com resíduo de bagaço de malte (10 g/L) em substituição ao amido. Um planejamento fatorial completo 2^3 (12 condições), foi aplicado para avaliar os efeitos das variáveis independentes: pH inicial (5 a 7), temperatura (24 a 32 °C) e concentração de bagaço de malte (5 a 15 g/L), sobre a variável de resposta atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos durante 96 horas, 150 rpm e 28 °C com a cepa 1 (UCP 1275, previamente selecionada). O ensaio n.º 1 obteve a máxima atividade enzimática (7,59 U/mL). A cepa de *Aspergillus* spp. UCP 1275 foi a que apresentou maior potencial de bioconverter o resíduo do bagaço de malte em amilase, favorecendo a formulação de um novo meio de produção.

Palavras-chave: Biotecnologia. Resíduo Cervejeiro. Enzimas. Fermentação Submersa. Fungos filamentosos.

ABSTRACT

The production of microbial enzymes through fermentation processes has undergone constant technical-scientific evolution, mainly in the application of agro-industrial residues in these bioprocesses. Amylases are enzymes that hydrolyze starch molecules releasing several products including dextrans and progressively small polymers composed of glucose units. Malt bagasse represents around 85% of the total waste generated in a brewery. Filamentous fungi have a high potential for converting macromolecules into biotechnological products, especially the *Aspergillus* genus. The evaluation of the amylase production potential was carried out in *Aspergillus* spp. (UCP1275, UCP6119, UCP1295 and UCP1261) isolated from soils of the Northeastern Caatinga, through the process of submerged fermentation in standard medium (Adams, 1990): yeast extract 2 g/L; 1 g/L KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, containing starch as a carbon source (10g/L), and selection with an alternative medium with malt bagasse residue (10g/L) to replace starch. Strain 1 (UCP1275) selected in an alternative medium, was conducted to the experiments of the complete factorial design 2^3 (12 conditions), with the independent variables: initial pH (5 to 7), temperature (24 to 32°C) and malt bagasse concentration (5 to 15g/L). The tests were conducted for 96 hours, 150 rpm and 28°C. In condition 1, the maximum enzymatic activity (7.59 U/mL) was reached. Other response variables were also evaluated: biomass production (9.99 g/L) and final pH (increase in absolute value under all conditions). Condition 1 was used to study the kinetics of amylase enzymatic activity during 168h. The *Aspergillus* spp. UCP1275 was the one with the greatest potential to bioconvert malt bagasse residue into amylase, favoring the formulation of a new production medium.

Keyword: Biotechnology. Brewer Residue. Enzymes. Submerged Fermentation. Filamentous Fungi

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A geração de grandes quantidades de resíduos e subprodutos nos diversos setores industriais, é inerente a qualquer setor produtivo, entretanto, o setor agroindustrial e de alimentos produzem em quantidades bastante elevadas. Esses resíduos podem apresentar inúmeros problemas de disposição final e potencial produção de poluentes de diferentes estruturas químicas (ALVES et al., 2019).

Os resíduos provenientes das indústrias alimentícias, têm sido bastante utilizados na elaboração e formulação de meios alternativos de produção, pois são uma alternativa viável, pois a maioria desses resíduos apresenta um elevado valor nutricional, que pode ser assimilado por diversos micro-organismos, produtores de metabólitos de alto valor agregado, reduzindo, assim, os custos de produção de inúmeros compostos biotecnológicos (NASCIMENTO et al, 2014). A utilização do desses resíduos também vem sendo estudada nos processos biotecnológicos empregando-os como substratos ou suportes para fermentações e produções de enzimas (DE LIMA, 2019).

O setor cervejeiro é um dos mais relevantes para a economia brasileira e sua extensa cadeia produtiva é responsável por 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) e 14% da indústria de transformação nacional (CERVBRASIL, 2016). Ao final de 2018, 210 novas fábricas de cervejas abriram as portas no Brasil, fazendo o número total de cervejarias instaladas no país chegar ao número de 889 fábricas abertas (MARCUSO; MÜLLER, 2019).

O principal subproduto gerado pela produção de cervejas é o bagaço de malte, com produção estimada entre 14 e 20 kg para cada 100 litros de cerveja processada. Portanto, é estimado que entre 1,96 milhões e 2,8 milhões de toneladas de bagaço de malte sejam produzidas anualmente no Brasil, tornando o bagaço de malte um excelente resíduo agroindustrial para ser utilizado como substrato para produção de enzimas e outros bioprodutos (OLIVEIRA et al., 2016).

A produção de enzimas através de processos fermentativos, pode ocorrer de duas formas: por fermentação submersa (FS) e por fermentação em estado sólido (FES). A técnica apresentada de FS, principalmente devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura e por ser fácil a recuperação das enzimas extracelulares. No processo fermentativo líquido, o desenvolvimento de micro-organismos ocorre na presença de água livre e as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95%. Já na FES, o cultivo dos micro-organismos é feito em substrato sólido contendo umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo (RODRIGUES; AMARAL et al., 2017).

As amilases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas com aplicações industriais. Estas enzimas são responsáveis pela degradação da molécula de amido, e podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica, papel e celulose, sucroalcooleira, dentre outras, sendo responsáveis por cerca de 25% da produção mundial de

enzimas, ocupando o segundo lugar em importância econômica, logo após as proteases. Devido às vantagens que a produção enzimática microbiana oferece, como a facilidade de produção e o amplo espectro de aplicações, a amilase microbiana tem sido a preferida em relação às outras fontes para produção (ARAÚJO; MARTINS, 2018).

A importância da utilização das enzimas nos diversos setores industriais, pode ser avaliada considerando o elevado aumento na produção em larga escala das empresas comerciais. Assim a ampla utilização dessas enzimas se torna reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalizadores, porém as enzimas com o mesmo perfil de atuação sob o mesmo substrato, podem apresentar um bom funcionamento no pH, na temperatura e em diferentes concentrações iônicas (FRANÇA, 2021).

Entre as amilases, destacam-se as α -amilases, responsáveis pelo rompimento das ligações no interior do substrato (endoamilases), as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilase), e as glucoamilases (amiloglicosidases) que liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato. É uma categoria enzimática com papel fundamental no mercado industrial de enzimas, podendo ser utilizadas em processos como: i) alimentos panificados; ii) diversos tipos de fermentações; iii) detergentes; iv) liquefação de amido; v) indústrias têxteis e de papel; vi) aplicação bioenergética, sendo utilizada na hidrólise do amido para a produção de etanol (BATISTA et al., 2018).

As amilases são amplamente distribuídas entre micro-organismos e esses micróbios são geralmente aplicados para a produção industrial de amilase. Entre os micro-organismos, os fungos são capazes de produzir uma variedade de amilases em quantidades consideráveis em comparação com as bactérias (YAHYA et al., 2021).

Nas últimas décadas, um grande número de micro-organismos não patogênicos, capazes de produzir substâncias biotecnológicas de alto valor agregado, tem sido pesquisado nos diversos ramos industriais (NASCIMENTO et al., 2014). No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos, dos quais 13.800 existiriam no Brasil (BARRETO et al., 2021). A Caatinga é um ecossistema brasileiro, que costuma estar associado à seca, pobreza e baixa biodiversidade biológica, mas ele tem importante valor biológico e econômico (SILVA et al., 2020; FREIRE et al., 2018).

A Caatinga brasileira está concentrada no Nordeste do país e é uma das maiores regiões de floresta seca do mundo, cobrindo uma área de cerca de 900.000 km² (quase 8% do território brasileiro). Muito de seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em qualquer outro lugar do planeta, com muitas espécies de microrganismos, plantas e animais adaptados exclusivamente para a vida nesta região semi-árida (SILVA et al., 2020; DA ROCHA et al., 2019; DRECHSLER-SANTOS et al., 2010). Os fungos da caatinga têm papel reconhecido na produção de medicamentos, bebidas e alimentos, como a penicilina, cerveja e queijo (SILVA et al., 2020; SIMOES et al., 2019).

Os microrganismos isolados deste ecossistema representam uma fonte valiosa de biomoléculas com atividades biológicas potencialmente novas; flutuações extremas em

temperatura, umidade e alta salinidade do solo, acompanhado por baixos níveis de nutrientes e alta irradiação UV, exigiria que os microrganismos tenham a capacidade genética de adaptar seu metabolismo para sobreviver. Estas cepas microbianas têm uma influência importante na produção industrial biotecnológica, incluindo fatores como tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação, maior rendimento e viabilidade econômica (DA ROCHA et al., 2019).

Os fungos filamentosos são micro-organismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, o processo de ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (NASCIMENTO et al, 2014). Acredita-se que o gênero *Aspergillus* tenha um enorme potencial para a produção comercial de amilase (YAHYA et al., 2021).

A descrição e a nomenclatura inicial do gênero *Aspergillus* foram creditadas a Micheli (1729), Haller (1768) e Fries (1832), que propuseram um nome genérico para um grupo de fungos com características morfológicas semelhantes. O exame microscópico revelava uma estrutura de suporte formada por hifas simples ou ramificadas de onde são originados os conídios, com morfologia semelhante a um aspersório (no inglês: aspergillum), objeto utilizado pelos sacerdotes em igrejas católicas para aspergir água benta (TROMBINI, 2019; VADLAPUDI et al., 2017). O gênero *Aspergillus* compreende mais de 350 espécies catalogadas de fungos filamentosos, exibindo uma grande variação no estilo de vida (habitat) e nas propriedades metabólicas (BRANDL; ANDERSEN, 2017; KOCSUBÉ et al., 2016).

Ele representa um dos gêneros de fungos mais comuns no ambiente, sendo fungos filamentosos onipresentes e cosmopolitas com impactos profundos em diferentes ecossistemas, bem como na saúde humana, animal e vegetal, e de alto interesse econômico. O *Aspergillus spp.* possuem alta capacidade de produzir metabólitos secundários, capazes de causar efeitos prejudiciais como doenças em eucariontes superiores (i.e. seres humanos, animais e plantas), mas, muito além disso, são capazes de produzir um vasto número de compostos bioativos e benéficos para a saúde humana (TROMBINI, 2019; SOLTANI, 2016).

Os fungos deste gênero são degradadores de matéria orgânica, deteriorantes de alimentos e patogênicos de plantas, do homem e de outros animais (PEREIRA, 2015). Estes fungos são considerados uma excelente fonte biológica produtora de amilases, enzimas que atuam transformando a cadeia longa de amido em polímeros menores, facilitando a obtenção de energia para funções metabólicas desses organismos. Os fungos do gênero *Aspergillus*, são promissores na produção de biocompostos de grande importância econômica, utilizados em processos industriais (DA SILVA; DOS SANTOS, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir a enzima amilase em fermentação submersa, utilizando como substrato o resíduo do bagaço de malte, proveniente da indústria cervejeira artesanal, por amostras de *Aspergillus spp.* isolado de solo da Caatinga do estado de Pernambuco.

2.2 Objetivos Específicos

Destacam-se como objetivos específicos os seguintes itens:

- Identificar o potencial de amostras de *Aspergillus spp* na produção de amilase em fermentação submersa utilizando meio padrão;
- Selecionar a cepa de *Aspergillus spp.* em cultivo submerso utilizando meio de cultivo formulado com resíduo bagaço de malte;
- Investigar a influência de parametros fisico-quimicos na atividade amilolitica da amostra de *Aspergillus spp.* selecionada utilizando planejamento fatorial;
- Caracterizar o bagaço de malte;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais

Resíduos sólidos são normalmente tratados como subprodutos obtidos a partir do processamento industrial de alimentos e de bebidas alcólicas. O tratamento destes subprodutos industriais vem desde a década de 1970, no qual consistia no reaproveitamento dos resíduos, principalmente formados por cascas de certas frutas como matéria-prima a fim de produzir alimentos perfeitamente passíveis de serem incluídos na alimentação humana. Com o aumento da quantidade de resíduos gerados, que pode chegar a muitas toneladas, agregar valor a este subproduto, tem sido de interesse econômico e ambiental, porém existe a necessidade de intensificação de pesquisas científica e tecnológica que possibilitem sua utilização eficiente, econômica e segura nos processos fermentativos empregados (KUMAR et al., 2020; DO NASCIMENTO FILHO, 2015).

Os processos industriais geram múltiplas saídas de materiais em forma de resíduos não incorporados no produto final, que geralmente são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Desta forma, milhares de toneladas de resíduos agroindustriais são gerados no processamento de matérias-primas de diversas culturas. Grande parte deste resíduo não tem aplicação, gerando contaminação ambiental originada do tratamento inadequado, como queima a céu aberto, descarte ou enterro desses resíduos. Por conta disso, nos últimos anos tem se intensificado o estudo do aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais de origem vegetal, tais como polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, etc (MARTINS et al., 2020; DE SOUSA, 2019; INFANTE et al., 2013).

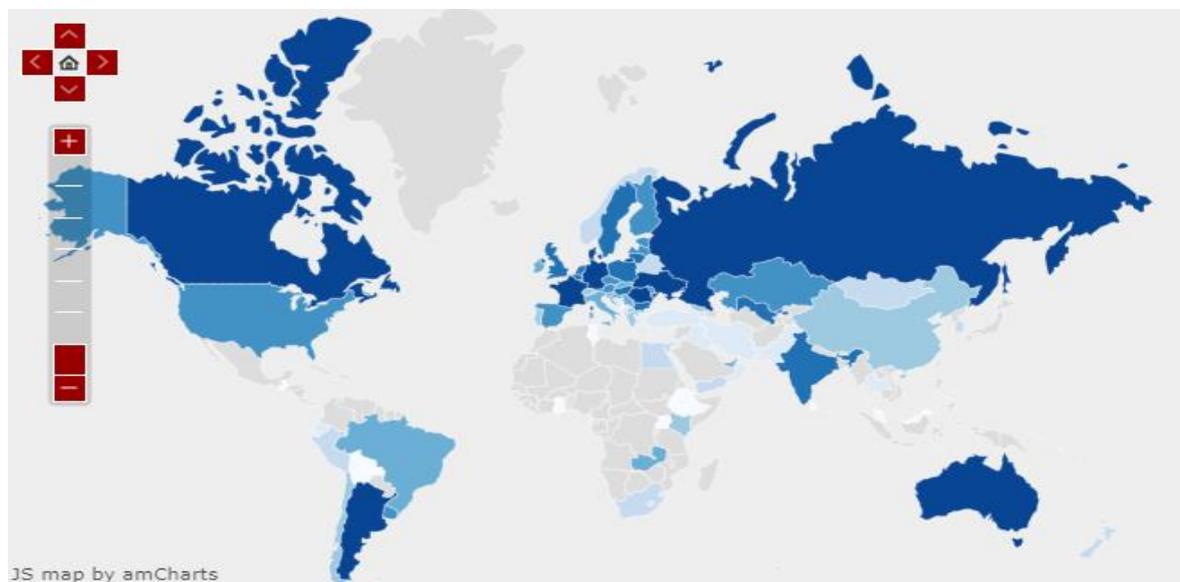
Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas e ácidos orgânicos, gerando produtos de grande valor econômico e atendendo à proposta ZERI —Zero Emissions Research Initiativell, que estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. Essa estratégia objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos (TACIN et al., 2019; DE MELO, 2016; MANERA et al., 2011).

3.2 Produção de Biomassa de Malte

3.2.1 Malte cervejeiro

A cevada (*Hordeum vulgare. sp. vulgare*) é uma das principais fontes de alimento no mundo. A cevada é o quarto cereal de maior importância no mundo, ficando atrás do milho, do trigo e do arroz. Sua produção está concentrada principalmente nas regiões temperadas da Europa, da Ásia e da América do Norte, mas também é cultivada em ambientes subtropicais como o Sul do Brasil, a Argentina, o Uruguai e a Austrália (DO NASCIMENTO, 2020). Os principais exportadores (figura 1) de cevada incluem: Austrália, Ucrânia, União Européia, Canadá e Rússia, enquanto os principais mercados para a importação de cevada são a Arábia Saudita, Japão e China (ACTUALITIX, 2016). No Brasil, para a safra 2020, a área semeada foi estimada em 122,8 mil de hectares nos estados do sul do Brasil, com produção estimada no Brasil de 418,6 mil toneladas. O grão é utilizado na industrialização de bebidas, na composição de farinhas ou flocos para panificação e na formulação de produtos dietéticos e de sucedâneos do café. A cevada é ainda empregada em alimentação animal como forragem verde e na fabricação de ração. No que tange ao Brasil, é utilizada sobretudo na malteação, área ainda carente de expansão, visto que o país só produz 43% da demanda da indústria cervejeira (DO NASCIMENTO, 2020; CAIERÃO, 2008).

Figura. 1 Mapa dos países exportadores de cevada no mundo



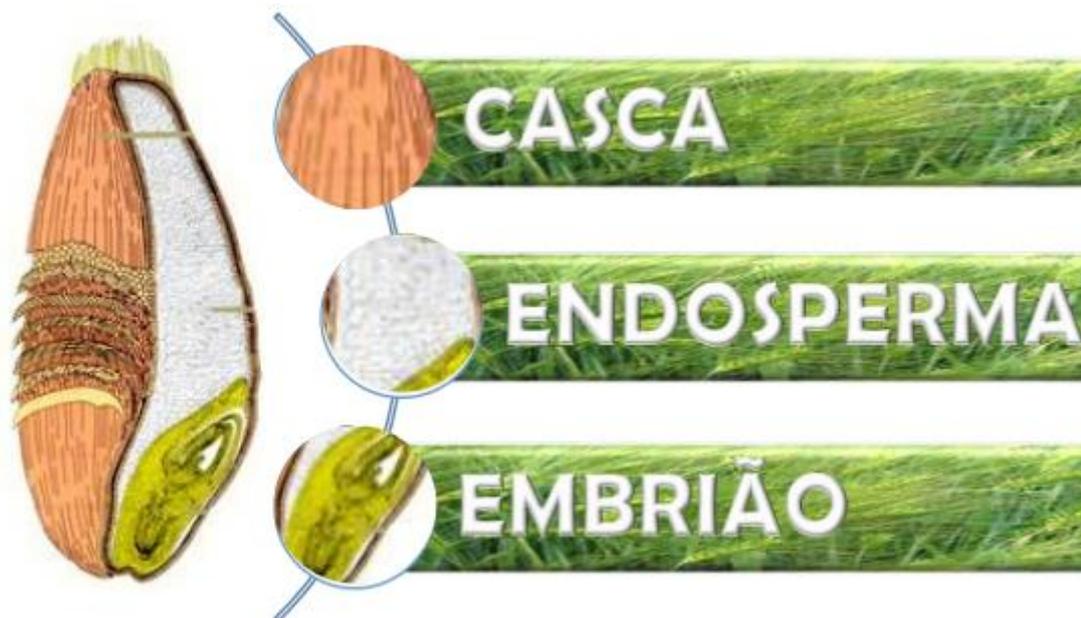
Fonte: (ACTUALITIX, 2016)

Originalmente, a cevada era principalmente cultivada e utilizada na alimentação humana, mas hoje ela é usada principalmente para alimentação animal e para a produção de

malte, com pequenas quantidades de sementes e utilizados para consumo humano direto. A cevada também é usada para a produção de fécula, seja para alimentação ou para a indústria química. Além disso, a cevada tem alguns subprodutos úteis, o mais valioso é a palha que é usada principalmente para a compostagem nos países desenvolvidos, mas também para alimentar animais nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (AKAR et al, 2004; CORDEIRO, 2011).

A cevada é um grão com características organolépticas atraentes (cor, sabor, odor e textura). É semelhante a espigas do trigo, embora seja ligeiramente mais clara na cor. O grão de cevada é composto, basicamente, por três porções: casca, embrião e endosperma (figura 2). A casca é a parte exterior da semente, camada resistente e tem a função de proteção, contém fibras, antioxidantes, minerais e vitaminas do complexo B. A cevada difere de muitos grãos, pois a fibra está distribuída na semente inteira e não apenas na camada externa (MAYER, 2007).

Figura. 2 Estrutura do grão de cevada fonte

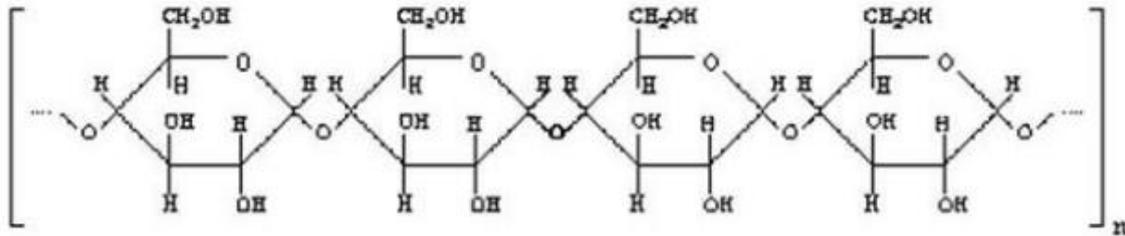


Fonte: (BARROS; GHESTI, 2016)

O embrião da semente, contém vitaminas do complexo B, algumas proteínas, minerais e lipídeos. O endosperma é a fonte de nutrientes do embrião sendo a parcela da semente que contém maior quantidade de carboidratos, proteínas e quantidades pequenas de minerais e vitaminas (MAYER, 2007). O amido é a substância mais abundante, cerca de 55%-65%. É um polissacarídeo composto por 2 tipos de moléculas: amilose e amilopectina, e é constituído de monômeros de glicose. As moléculas de amilose são relativamente pequenas (de 60 a

2000 monômeros), solúveis, formadas por várias moléculas de glicose com ligações α 1,4 e tem uma estrutura linear (figura3) (BARROS; GHESTI, 2016).

Figura. 3 Estrutura molecular do amido



Fonte: (BARROS; GHESTI, 2016)

As proteínas também compõem o grão de cevada (em torno de 10%), são compostas por aminoácidos. Quanto maior o peso molecular da proteína, mais insolúvel ela é. Assim como os açúcares, as proteínas também serão degradadas durante o processo cervejeiro através das enzimas. Os subprodutos de degradação das proteínas de médio peso molecular fixam o CO_2 , durante as etapas de fermentação e maturação. Já subprodutos de decomposição da proteína de baixo peso molecular, servirão como nutrição para levedura. A maior parte das proteínas no grão cevada, não é solubilizada durante o processo na maltaria e nem na cervejaria sendo eliminada por meio do bagaço na etapa de filtração do mosto (BARROS; GHESTI, 2016).

Hemicelulose e substâncias gomosas estão em torno de 10% do grão, são carboidratos não fermentescíveis. As hemiceluloses são insolúveis e as substâncias gomosas, solúveis. Essas substâncias são apenas degradadas durante a malteação (92%). A celulose está presente no grão de cevada numa faixa de 3,5% a 7%, é a principal parte componente da casca e não se modifica durante os processos de malteação e brassagem. A mesma será eliminada, como bagaço, após o processo de filtração do mosto (BARROS; GHESTI, 2016).

As substâncias minerais são caracterizadas na faixa de 2,5% a 3,5%. A maior parte é formada por fosfatos de potássio. Zn, Mn e Cu tem papel importante para a levedura no processo fermentativo. Estas substâncias podem funcionar como cofatores enzimáticos. Eles não estão ligados às enzimas permanentemente, mas a ausência dessas moléculas inorgânicas pode deixar as enzimas inativas. Substâncias graxas e lipídicas estão presentes entre 2% e 3%, estruturalmente as substâncias graxas são os ácidos graxos e a glicerina. (BARROS; GHESTI, 2016).

As principais enzimas que atuam no processo estão as β - glucanases, que são responsáveis pela hidrólise dos β -glucanos e as amilases, que são enzimas que desdobram

o amido. A enzima α -amilase quebra a molécula de amilopectina (ramificada) entre as suas ramificações desdobrando em dextrinas. A β -amilase ao contrário, só é capaz de atacar as cadeias retilíneas da amilose, e as extremidades das ramificações da amilopectina. Ela retira dessas cadeias retilíneas 2 unidades de glicose de cada vez formando assim o açúcar maltose. As hemicelulases desdobram as hemiceluloses (constituintes principais das paredes celulares) e as gomas (hemiceluloses solúveis em água). As enzimas proteolíticas (peptidases ou proteases) desdobram proteínas até os aminoácidos. As peptidases, em grande parte, são inativadas na secagem do malte, além do seu pH ótimo que é em torno de 8, fazendo com que não tenha ação na fabricação do mosto. As proteases têm atividade máxima a temperatura de 45°C a 50°C; mesmo a 60°C elas são ainda muito ativas, mas dão origem a uma proporção maior de matérias nitrogenadas mais complexas (BARROS; GHESTI, 2016).

3.2.2 Processo cervejeiro e geração de biomassa

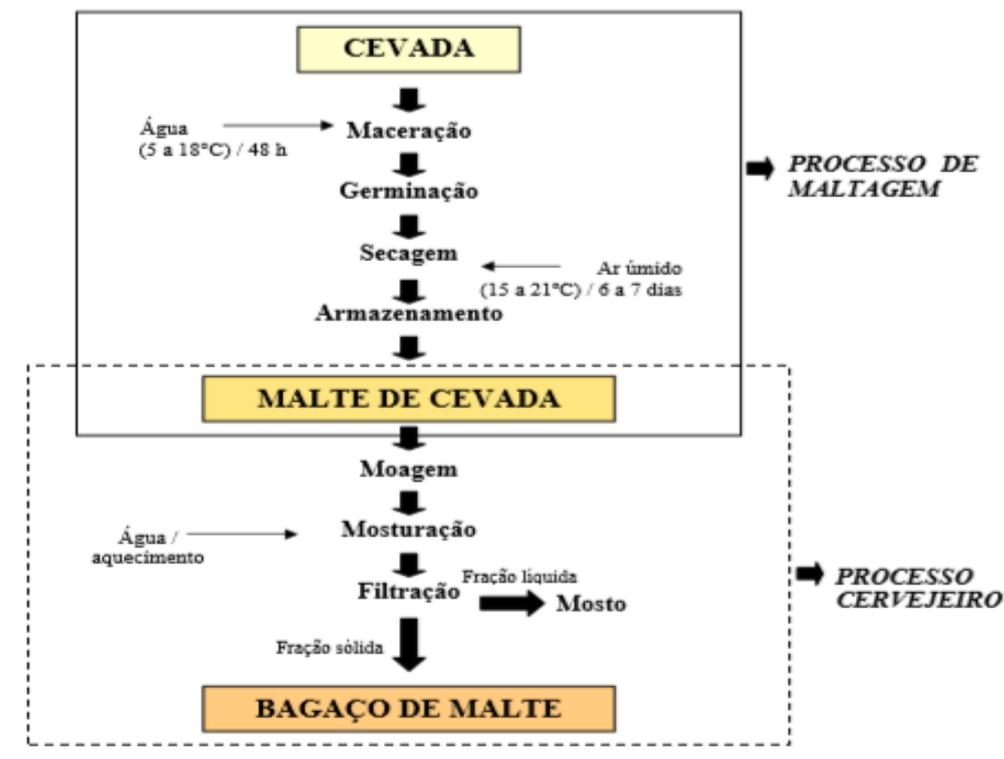
Antes de ser utilizada no processo cervejeiro, a cevada obtida nos campos é submetida a um processo de maltagem, o qual serve para elevar o conteúdo enzimático dos grãos. O processo de malteação consiste em três etapas: maceração, germinação e secagem. Durante a maceração, os grãos limpos de cevada são colocados em tanques com água (temperatura entre 5 e 18°C) onde são mantidos por um período de aproximadamente dois dias, sendo realizadas sucessivas trocas de água a cada 6 a 8 horas. Após 2 dias a cevada atinge um teor de umidade de 42 a 48% (DRAGONE, 2007).

Nesta etapa, o metabolismo da semente é ativado através da hidratação, induzindo a germinação. Em seguida, a cevada macerada é colocada para germinar em compartimentos apropriados que permitem a passagem de um fluxo de ar úmido através do leito de cevada, mantendo a temperatura dos grãos na faixa de 15 a 21°C. Nesta segunda etapa ocorrem mudanças físico-químicas e estruturais do grão, sendo formadas e ativadas as principais enzimas do malte (amilases, proteases, glucanases, entre outras). Ao término da germinação (processo que dura de 6 a 7 dias), o malte de cevada obtido é secado em uma temperatura de 40 a 60°C até obter um teor de umidade de 4 a 5%, para evitar a contaminação microbiana e desenvolver o sabor característico do malte (DRAGONE, 2007; BARROS; GHESTI, 2016).

O processo cervejeiro inicia-se com o preparo das matérias-primas água e malte. É importante que a água possua uma boa qualidade antes de ser inserida no processo. O controle de características como pH, turbidez, quantidade de minerais e padrões microbiológicos aceitáveis são de suma importância para a obtenção de cervejas de qualidade (CECCATO, 2019). O malte de cevada é moído e em seguida submetido a um processo de

mosturação, onde os grãos moídos da cevada malteada são misturados com água e a mistura obtida é aquecida em vários níveis de temperatura (aumentados lentamente de 37 a 78°C). Este processo tem como objetivo promover a hidrólise enzimática dos constituintes do malte, principalmente do amido, que é convertido em açúcares fermentáveis (maltose e maltotriose) e não-fermentáveis (dextrinas). Posteriormente, é realizada uma filtração para separar a fração líquida, denominada mosto, a qual é empregada como meio de fermentação para a produção da cerveja. A fração sólida obtida é composta pelo bagaço do malte de cevada. A figura 4, é uma representação esquemática do processo de obtenção do bagaço de malte a partir da cevada natural obtida nos campos (DRAGONE, 2007).

Figura. 4 Esquema de obtenção do bagaço de malte através do processo cervejeiro



Fonte: (DRAGONE, 2007)

O processo de fermentação é uma etapa fundamental, senão a mais importante do processo cervejeiro. É nesta etapa que há o consumo dos carboidratos fermentáveis por parte da levedura, e a transformação em etanol e CO₂. A principal espécie de levedura cervejeira é a *Saccharomyces cerevisiae*, porém existem inúmeras cepas diferentes. Muitos são os parâmetros que devem ser levados em conta nesta etapa para se obter a cerveja desejada, como um nível de sanitização adequado, a escolha da cepa, nível de atenuação

desejado, quantidade de células, temperatura controlada e o tipo de fermentação escolhida. Devido à complexibilidade deste processo, a forma mais simples de controle para verificar se o processo está acontecendo conforme o planejado é a medida da densidade do meio. Com isto, é possível obter uma estimativa da quantidade de açúcar que há no meio, bem como a

3.2.3 Características do bagaço de malte (BSG)

O resíduo da indústria cervejeira, conhecido como bagaço de malte ou BSG (do inglês Brewer's spent grain), é o coproduto mais abundante na produção cervejeira. A sua destinação, em grande parte, é para a alimentação de ruminantes, em especial de bovinos. A indústria cervejeira gera entre 14 e 20 kg de bagaço de malte de cevada por litro de cerveja produzida (CORDEIRO; EL-AOUAR; GUSMÃO, 2012; MAIONE, 2019). A produção de cerveja no Brasil foi estimada de 140.000 mil hL, sendo o terceiro maior produtor do mundo. Portanto, a produção de BSG de cevada é aproximadamente 2,38x10⁸ toneladas de bagaço por ano (MAIONE, 2019).

O bagaço de malte é o principal resíduo da indústria cervejeira, representando cerca de 85% do total dos subprodutos gerados. Rico em fibras e proteínas é considerado um material lignocelulósico contendo aproximadamente 17% de celulose, 28% de hemicelulose e 28% de lignina. A composição química do bagaço de malte pode variar de acordo com a variedade e época de colheita da cevada, condições de moagem do malte e tipo de adjuntos (milho, arroz, trigo e sorgo) adicionados ao processo de fermentação. Além da composição química, as fibras do bagaço de malte podem ser caracterizadas quanto à suas propriedades funcionais, com o objetivo de direcionar estes materiais para as mais diferentes aplicações na indústria, por ter um importante papel no preparo, processamento ou estocagem dos produtos (MELLO, L.R.P.F.; VERGÍLIO, R.M.; MALI, 2013; ZANUTTO; SILVA, 2016) (figura 5).

Figura. 5 Bagaço de malte utilizado na pesquisa



Fonte: Autor 2020

Quando comparado com outros resíduos industriais, o bagaço de malte possui quantidades menores de celulose e maiores de hemicelulose, com quantidades de lignina semelhantes (MUSSATTO, 2014; MAIONE, 2019). É rica também em proteínas e fibras dietéticas sendo muitas vezes usado e estudado para o uso em alimentação humana (PIERRE et al., 2011; MAIONE, 2019). Uma das grandes inviabilidades das biorrefinarias frente as refinarias de petróleo é a disponibilidade sazonal de biomassas. (MENON; RAO, 2012; CHEN; ZHANG, 2015; MAIONE, 2019).

3.3 Bioprospecção e Produção de Metabólitos Fúngicos

O Brasil é um país favorecido devido à enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, apresentando a maior biodiversidade do planeta de fonte de biocatalisadores. O semiárido, que faz parte do bioma brasileiro Caatinga, tem uma enorme diversidade em microrganismos, porém as espécies são pouco conhecidas (MELO; VOLTOLINI, 2019). Este ecossistema brasileiro muito promissor, porém, ainda pouco explorado (VASCONCELOS et al., 2021). A Caatinga apresenta um acentuado processo de desertificação, ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais, o qual resulta na redução de produção vegetal e mudanças nas interações que ocorrem no solo, com a consequente, e muitas vezes irreversível, perda da biodiversidade (MELO; VOLTOLINI, 2019; COELHO; SOUSA; GRANDE, 2018; PAREYN, 2010).

O bioma Caatinga é habitado por uma comunidade muito bem adaptada às condições edafoclimáticas locais, conforme discutido anteriormente. A maioria dos vegetais superiores ocorrentes no ambiente natural se associa com uma grande diversidade de microrganismos, os quais desempenham uma série de papéis ecológicos que podem auxiliar no estabelecimento dos vegetais no ambiente natural ou cultivado, colaborando, assim, para a seleção das espécies que terão sucesso na colonização do ambiente. Dessa forma, os microrganismos nativos também foram selecionados ao longo dos anos e apresentam diversas adaptações às condições edafoclimáticas locais, o que permite a realização de estudos visando ao isolamento e à seleção da microbiota nativa com o intuito de aplicá-la no campo em conjunto com culturas de interesse (MELO; VOLTOLINI, 2019)

Dentre as diversas espécies fungicas características do bioma caatinga, estão destacadas no Quadro1 os grupos mais encontrados com os seus benefícios e malefícios em

destaque.

Quadro 1 - Fungos que ocorrem na Caatinga, suas principais características estruturais e ecológicas e seus efeitos benéficos e maléficos.

Fungos – Grupos Espécie	Características	Benefícios	Malefícios
<p>Ascomicetos <i>Penicillium sp.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Espécie conhecida como mofos ou bolores. - São seres microscópicos, possuem geralmente coloração verde ou preta. - Estão presentes no solo, plantas, alimentos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contribuem para a decomposição de matéria orgânica vegetal e deixam os solos mais férteis. - Usados na produção de medicamentos como antibióticos (penicilina), antifúngicos e antitumorais; - Produção de queijos. 	<p>Atuam na decomposição de alimentos diversos, deixando-os mofados ou embolorados.</p>
<p>Ascomiceto <i>Saccharomyces</i> <i>Cerevisiae</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Espécie conhecida como levedura de cerveja - São seres unicelulares e microscópicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contribuem para a decomposição de matéria orgânica vegetal e deixam os solos mais férteis. - Usados na produção de medicamentos como antibióticos (penicilina), antifúngicos e antitumorais; - Produção de queijos; - Podem ser usados em processos industriais diversos como a produção de alimentos como cerveja, de pães; - Podem ser usados na produção de biocombustíveis, como bioquerosene e biodiesel. 	
<p>Basidiomiceto <i>Agaricus</i> <i>bisporus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Espécie forma cogumelos chamados de champignon. - São macroscópicos, podem ser cultivados com 	<ul style="list-style-type: none"> - Usados na alimentação e na produção de conservas. - Nutritivos por serem ricos em proteínas, fibras e vitaminas do complexo B. 	

	uso de compostos orgânicos.		
Basidiomiceto <i>Podaxis pistillaris</i>	Espécie macroscópica forma cogumelos. Formados na matéria orgânica em decomposição.	- Realiza decomposição de matéria orgânica vegetal. - Pode ser usado na alimentação humana por ser rico em proteínas.	
Basidiomiceto <i>Pycnoporus Sanguineus</i>	Espécie macroscópica de cor laranja, que ocorre em troncos em decomposição. Conhecida como orelha de pau ou urupê, que, na língua guarani, significa sangue de madeira.	- Realiza decomposição de vegetais e ciclagem de nutrientes. - Contribui para a degradação de substâncias. - Usada para tratar resíduos da indústria têxtil, produção de papel, de pesticidas; - Tem propriedades medicinais.	Destrói madeira e objetos de madeira, como toras para marcenaria, cercas, bancos, portas.
Deuteromiceto <i>Oidium sp.</i>	Espécie microscópica. Encontrada em plantas, principalmente mais jovens.		- Causa doença nas folhas das plantas, mofo e manchas pardas; - Retira nutrientes da planta e provoca nanismo.
Deuteromiceto <i>Alternaria sp.</i>	Espécie microscópica. Encontrado no solo, água, objetos, construções;		- Causa doença de planta, caracterizada pela presença de manchas escuras nas folhas, desfolhamento.

			- Causa alergia em humanos.
Deuteromiceto <i>Colletotrichum</i> sp.	Espécie microscópica. Encontrado em ramos, folhas e frutos de plantas.		Causa a antracnose, doença de planta, caracterizada pela presença de manchas nas folhas, desfolhamento, diminuição da produção vegetal.
Glomeromicetos Fungos <i>micorrízicos</i> <i>arbusculares</i>	Fungos microscópicos que vivem associados às raízes das plantas, numa simbiose chamada micorriza arbuscular. Ajudam as raízes no processo de absorção.	- Aumentam a absorção de água e sais minerais pelas plantas. - Aumentam a resistência das plantas à estresse ambiental e aos patógenos.	
Líquens fungos ascomicetos associados a algas	Visíveis a olho nu, o uso de lupa de mão ajuda na visualização. Em ambientes naturais, crescem sobre folhas, cascas de árvore rochas, solos. Ocorrem em ambientes diversos, até em locais com temperaturas extremas.	- Produção de perfumes e medicamentos; - Transformação de rocha em solo; - Sua presença é uma indicação de não contaminação por produtos químicos em um ambiente; - Servem de alimento para alguns animais, como cupins e outros.	
Zigomicetos <i>Pilobolus</i> sp. Visível	Visível a olho nu; o uso de lupa de mão ajuda na visualização. Na natureza crescem sobre folhas, cascas de árvore, rochas,	Realizam a decomposição de excrementos (fezes e esterco) de animais, e contribuem para a nutrição	Podem causar doenças em animais, humanos e plantas.

	solos, fezes. Ocorrem em ambientes diversos, inclusive com temperaturas extremas.	do solo e a ciclagem de nutrientes.	
--	---	-------------------------------------	--

Fonte: (SILVA et al., 2020)

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização de microrganismos na busca de soluções nas áreas alimentícia, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial. Frente a isso, a produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos. Esses biocatalisadores possuem características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade. O potencial catalítico das enzimas é utilizado industrialmente, não só nos clássicos processos de fermentação, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância industrial (SAWARKAR; SHARMA; GAUTAM, 2019; COELHO; SOUSA; GRANDE, 2018; JR; JAN; PARRY, 2016; BON; FERRARA, 2008).

Os fungos filamentosos apresentam grande distribuição na natureza, e hoje caracterizam-se por uma grande importância comercial. As pesquisas para identificação e isolamento de microrganismos capazes de produzir celulasas, tem crescido nos últimos anos, e os estudos tem utilizado fungos filamentosos como *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* (XU; QIN, 2019; YAN, 2018; DE MELO, 2016; GUPTA et al., 2016).

3.3.1 Importância biotecnológica do gênero *Aspergillus*

Aspergillus são deuteromicetos que têm distribuição mundial, isolados de diversos substratos orgânicos, sendo que muitas espécies são oportunistas e causam patologias, tanto para humanos como para outros animais. Muitas espécies, no entanto, apresentam importância biotecnológica, sendo úteis na indústria de alimentos, na produção de detergentes e também no melhoramento ambiental e na área da saúde (PRADO et al., 2017).

O gênero *Aspergillus*, possui grande importância econômica e industrial na produção de enzimas, ácidos orgânicos e na produção de alimentos asiáticos. Este é muito utilizado na indústria alimentar para a manufatura de produtos de consumo humano seguros e, por isso, o seu potencial é reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos da América). Dentre as espécies do gênero *Aspergillus* mais utilizadas em processos

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

biotecnológicos para a produção enzimática, podem-se mencionar *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus*, e *A. versicolor*. Evidenciando as espécies da seção Nigri, as quais são mais estudadas devido ao seu potencial na produção de amilase, celulase, pectinase, protease e fitase (FELIPE et al., 2019).

A espécie *Aspergillus niger* possui grande interesse em vários setores econômicos, para indústria química e principalmente para a indústria alimentícia. Consequentemente, *A. niger* tem sido relatada como promissora para a produção de poligalacturonases a nível industrial e apresenta um importante potencial na produção industrial de ácidos orgânicos como o ácido cítrico; sendo um dos fungos filamentosos mais utilizados, por desempenhar uma alta produção do ácido e uma mínima produção de metabólitos secundários. O *Aspergillus oryzae* teve sua aplicação autorizada pelo Ministério de Saúde da Dinamarca (MSD) através de uma permissão para o seu uso na produção de enzimas. O MSD considerou que este organismo cumpre com os requisitos para Good Industrial Large Scale Practice Organisms (FELIPE et al., 2019).

As enzimas β -glucosidases são produzidas eficientemente por fungos do gênero *Aspergillus*. β -glucosidases de *Aspergillus* são preferidas em relação as de bactérias devido a sua capacidade de produzirem alta atividade enzimática. O desempenho dos fungos na produção e secreção de enzimas complexas pode ser devido ao seu sistema de secreção eficiente, não encontrado em bactérias, o que as torna difíceis ou inviáveis para serem projetadas para produção destas enzimas em grandes quantidades (OLIVEIRA et al., 2018).

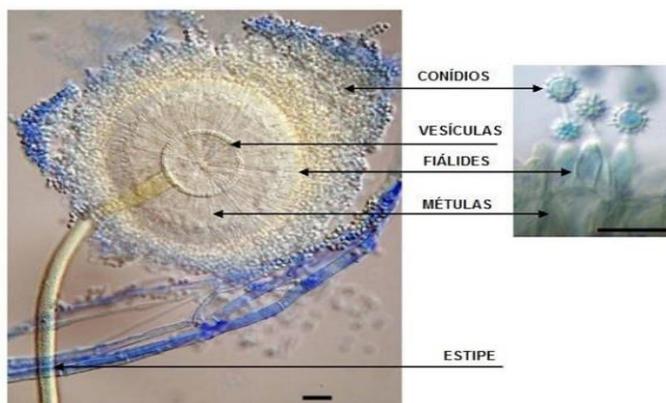
O FDA reconhece a utilização de tais microrganismos na produção de enzimas e também considera que os produtos derivados destes podem ser utilizados para o consumo humano de forma segura. Algumas espécies até detêm o estatuto de “Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS), por apresentar baixa toxicidade e por apresentar um histórico de uso no preparo e na produção de alimentos e bebidas (ex.: cerveja) (MAIA; FRAGA, 2017). Alguns gêneros de *Aspergillus* têm grande importância na área médica por serem responsáveis por doenças graves em pacientes imunodeprimidos atuando como oportunistas, se aproveitando do estado imunodeprimido do hospedeiro e se fixando em locais do corpo, principalmente as vias aéreas superiores (PAZ JUNIOR et al., 2020).

O gênero *Aspergillus* representa um anamorfo de ascomicetos pertencente à ordem Eurotiales, ou seja, caracteriza-se pela produção de esporos assexuais. A coloração das colônias é a característica principal macroscópica para a diferenciação das seções de *Aspergillus*. Eles possuem vários tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza. As espécies pertencentes a esse gênero tipicamente produzem um conidióforo, asseptado e com

a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O 5 conidióforo estende-se a partir da célula pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula, na qual as células conidiógenas métulas e fiálides são formadas. As vesículas podem ter várias formas características. Em algumas espécies o conídio é diretamente ligado às fiálides; essa característica pertence às espécies denominadas de unisseriadas. As fiálides produzem conídios enfileirados ou em cadeia, com diferentes pigmentação e ornamentação. Outras espécies apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides, designadas métulas, e a presença destas estruturas caracteriza estas espécies como bisseriadas (KLICH, 2002).

Para a sua classificação, é muito importante a análise de suas estruturas morfológicas como exemplificado na Figura 6. Em geral, as colônias têm crescimento rápido e exuberante, sendo inicialmente brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. Um aspecto notável das espécies pertencentes a este grupo é o fato de produzirem o “aspergillum” ou cabeça aspergillar, que consiste de uma haste (estipe) asseptada que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem as células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídios com diferentes pigmentações e ornamentações. Quando simples, a cabeça aspergillar denominada uniseriada consiste em uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídios. Já a cabeça aspergillar bisseriada apresenta antes da camada de fiálides, uma camada de células que as geraram, denominadas de métulas. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estipe) e a célula pé é chamada de conidióforo (PEREIRA, 2015)

Figura. 6 Conidióforo de um *Aspergillus* bisseriado (*Aspergillus ocraceus*) e terminologia das estruturas utilizadas em sua identificação e classificação



Fonte: (PEREIRA, 2015; SERRA, 2005)

3.3.2 Enzimas e suas aplicações

Os primeiros estudos sobre a natureza das enzimas, aconteceram no século XVIII quando foram estudadas as secreções do estômago na digestão da carne. No século seguinte, começaram os primeiros estudos da conversão do amido em açúcar pela saliva. Em 1831, um pesquisador químico sueco Jöns Jacob Berzelius constatou que certas substâncias tinham uma “força catalítica” que lhes permitia acelerar certas reações (NELSON; COX, 2018). No ano de 1833, os famosos químicos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz encontraram uma substância que perdia suas propriedades com a temperatura no precipitado do álcool, extrato de malte, que convertia amido em açúcar. Primeiramente, foi chamada de diástase, mas atualmente é denominada por amilase (MORAN et al., 2015).

As enzimas, por definição, são proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros por ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente, que apresentam atividade catalítica (NELSON; COX, 2018). Atualmente, são catalogados mais de 6000 tipos de enzimas que ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples aos mais desenvolvidos (EXPASY, 2020; DE LIMA, 2019). Devido à ambiguidade e à grande quantidade de enzimas que são descobertas com o passar tempo, por meio de um acordo internacional, adotou-se o sistema de classificação de enzimas. Dividiu-se as enzimas em seis grandes grupos e subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam, apresentados no Quadro 1.

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hídrido ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água).
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de

		ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

Fonte: (NELSON; COX, 2018)

A cada enzima foi atribuído um “código EC” (Enzyme Commission) que contém 4 números separados por pontos (EC. W.X.Y.Z), em que W, X e Y representam, respectivamente, à classe, subclasse, sub-sub-classe e o número Z é específico de cada enzima (EXPASY, 2020; DE LIMA, 2019).

Produtos biotecnológicos eram produzidos há muito tempo, por meio da utilização de enzimas em técnicas artesanais, desconhecendo os mecanismos envolvidos nos processos de fabricação, seja ela para produção de alimentos (queijo, cerveja, vinho e vinagre) ou mercadorias como couro, índigo e linho. Somente a partir do século XVII, iniciaram-se os estudos da biotecnologia esclarecendo os fenômenos que ocorriam nas produções e possibilitando o avanço da ciência e aplicabilidade das enzimas em processos industriais (FONSECA et al., 2018; VITOLO et al., 2015; KIRK et al., 2002).

Após os antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica. As aplicações das enzimas ocorrem em diversos setores industriais. Na panificação, laticínios, fabricação de cerveja e vinicultura, por séculos, e sua aplicação mantém o pão macio e fresco por mais tempo. Além disso, as enzimas são usadas para reduzir a concentração de álcool e calorias na cerveja. Em enologia, o teor de enxofre pode ser reduzido, e a clareza da cor do vinho pode ser mantida, sabores e a capacidade de filtração podem ser melhorados. Na fabricação de ração animal, as enzimas são usadas principalmente para aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais (FONSECA et al., 2018; SPOHNER et al., 2015; YI; PARK, 2013).

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois através dela ocorre o melhoramento da qualidade de um produto ou torna mais fácil a obtenção do mesmo. Essa capacidade se deve ao fato de que as enzimas atuam sobre as substâncias que compõem um determinado produto, sendo que, para cada substância, existem enzimas específicas que a degradam (FONSECA et al., 2018; MILTON et al., 2011; LIMA, 2001).

As enzimas podem ser produzidas por via ou processos fermentativos, mais comumente por fermentação submersa e fermentação no estado sólido. A fermentação em estado sólido (FES) é um processo caracterizado pela ausência de água livre no meio, tendo condições de umidade necessária para que ocorra o desenvolvimento e crescimento celular no meio fermentativo. O microrganismo pode crescer sobre ou dentro de partículas de uma matriz sólida, enquanto a fermentação submersa (FS) é caracterizado pela atividade dos microrganismos submergidos e que realizam suas etapas metabólicas em um meio aquoso (VIEIRA; DELERUE-MATOS, 2020; DE LIMA, 2019; LIU; KOKARE, 2017).

3.3.3 Amilases

As amilases são um grupo de hidrolases que catalisam as ligações α -glicosídicas em amido e classificam-se em α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase. A α -amilase quebra ligações α (1,4) dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união α -1,4. A β -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão. Por fim, a amiloglucosidase, é uma enzima extracelular que rompe as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glucose. As amilases estão entre as enzimas de maior importância para a biotecnologia, encontrando demanda industrial crescente e destaca-se por suas aplicações na indústria de celulose, durante o acabamento final do papel, na produção de pães, melhorando a cor e a maciez do produto final, e na produção de cervejas claras. As amilases podem ser obtidas de diferentes fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, sendo os fungos filamentosos e as bactérias os principais produtores (VIEIRA; DELERUE-MATOS, 2020; SHARMA; AMARAL et al., 2017; SATYANARAYANA, 2013).

3.4 Validação Estatística de Dados

A estatística tem sido utilizada na pesquisa científica nas mais variadas áreas do conhecimento, visando à otimização de recursos econômicos e de processos de produção, bem como ao aumento da qualidade e produtividade, nas questões judiciais, na medicina, em pesquisas envolvendo levantamentos por amostragem, em previsões de safras e em muitos outros contextos. Trata-se de uma ciência multidisciplinar, empregada nos diferentes ramos do conhecimento, entre eles, a agronomia, biologia, direito, economia, engenharia, farmácia, física, geologia, hidrologia, matemática, medicina, nutrição, odontologia, psicologia, química e sociologia (IGNÁCIO, 2010).

A medição é algo comum no mundo da engenharia. Em geral, o resultado da medição é uma aproximação (estimativa) do valor da grandeza medida afastando-se do valor verdadeiro dessa grandeza por uma quantidade denominada erro de medição. Os erros de medição podem ser classificados como sistemáticos ou aleatórios. Os primeiros são geralmente causados pelo aparelho de medida, observador e/ou condições ambientais. Por sua vez, nestes últimos, os valores medidos estão dispersos em torno do valor médio. É frequentemente assumido que a incerteza de medição é constante ou é uma função linear do valor medido (RAMOS, 2017).

A avaliação da variabilidade pode ser uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de projetos relacionados a métodos de interpolação e metodologias estatísticas para validar a correlação entre as características estudadas no experimento (SANTOS et al., 2020).

Experimentos confiáveis requerem a avaliação dos resultados pela verificação da precisão deles próprios, que pode ser realizada pelos valores dos coeficientes de variação (CV) ou pela diferença mínima significativa. O CV permite a comparação de resultados de diferentes experimentos, envolvendo uma mesma variável ou espécie, permitindo, assim, quantificar a precisão de suas pesquisas. O CV é uma medida importante sobre a variabilidade dos resultados experimentais, podendo ser útil na definição do número de repetições do ensaio, necessário para detectar uma diferença entre médias de tratamentos com uma dada probabilidade, visto que os CV estão estritamente relacionados ao erro residual nas análises de variância (SCHMILDT et al., 2017). O coeficiente de variação é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão de experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média.

Conforme define (RESENDE et al., 2011; DA COSTA, 2018) o coeficiente de variação (CV) como a medida linear de dispersão dos dados proporcionalmente à média, em porcentagem. O coeficiente de variação é a medida da precisão experimental, ou seja, coeficientes menores indicam maior confiabilidade nos dados experimentais (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). Ao avaliar um experimento com um número maior de

repetições, desde que esse número seja expressivo, em relação a outro, mesmo que este último experimento apresente um CV menor, o primeiro, provavelmente, será mais preciso em comparação ao segundo, devido ao maior número de repetições, que provocará um menor erro padrão da média do tratamento. Além do mais, a experimentação e a teoria demonstram que, na quase totalidade dos casos, o coeficiente de variação decresce quando aumenta o tamanho das parcelas (DA COSTA, 2018; ROSSETTI, 2001). O coeficiente de variação (CV) é medido através da fórmula:

$$CV(\%) = 100. \left(\frac{\sqrt{QMR}}{\bar{X}} \right)$$

Onde: QMR : é o quadrado médio do resíduo; \bar{X} : é a média das características.

Outra importante ferramenta que é frequentemente encontrada nos modelos estatísticos para descrever e prever fenômenos observados em experimentos, é a regressão linear. A regressão é utilizada para analisar relações entre variáveis contínuas. A regressão descreve a relação entre uma variável preditora, representada graficamente no eixo X, e uma variável resposta, representada no eixo Y. Neste contexto, as técnicas de modelagem apresentam alternativas eficientes que fornecem subsídios para a otimização de informações advindas do campo, tornando possível a integração destes dados, sendo que a técnica da regressão busca obter equações matemáticas a partir das medições efetuadas em campo (LISBOA et al., 2018).

Eventualmente em uma massa de dados há valores que foram coletados em condições anormais (falha de equipamento, queda de energia, erro do operador, erro de leitura, erro de digitação etc.). Esses valores, principalmente quando estão muito afastados dos demais (para mais ou para menos), infelizmente podem afetar de forma substancial o resultado das análises estatísticas. São as chamadas observações discrepantes ou outliers. Assim sendo, é útil que tenhamos disponível um critério de detecção de observações discrepantes. Uma vez detectada a presença de uma observação discrepante, poderá ser tomada a decisão de repetir aquele experimento, ou meramente expurgar aquele dado da amostra (ou até mesmo mantê-lo, se for encontrada uma explicação plausível para aquela discrepância) (PINHEIRO et al., 2009).

A identificação de outliers desempenha um papel importante na análise estatística, pois tais observações podem conter informações importantes em relação às hipóteses do estudo. Se modelos estatísticos clássicos são cegamente aplicados a dados contendo valores atípicos, os resultados podem ser enganosos e decisões equivocadas podem ser tomadas. Além disso, em situações práticas, os próprios outliers são muitas vezes os pontos especiais

de interesse e sua identificação pode ser o principal objetivo da investigação (BARBOSA et al., 2018).

O erro tipo I ocorre quando o teste estatístico (oriundo de uma amostra) determina a rejeição da hipótese de nulidade, entretanto, na população (verdade) a hipótese de nulidade não deve ser rejeitada. Esse é o nível de significância que estabelece um limite acima do qual, não se rejeita H_0 . A redução do nível de significância, por exemplo de 5% para 1% (probabilidade de se incorrer no erro tipo I) vem acompanhada do acréscimo da probabilidade de ocorrência do erro tipo II (não rejeitar H_0 quando na verdade, ela é falsa). O fato é que a rejeição de H_0 sempre ocorrerá diante de uma possibilidade de que esta seja uma decisão errada uma vez que se está trabalhando com uma dentre tantas amostras possíveis. Como somente há controle do nível de significância, a única conclusão possível é a rejeição de H_0 já que a não rejeição de H_0 apenas nos informa que esta amostra não sustenta a rejeição, mas não há quantificação da probabilidade de erro tipo II (ALVES, 2017).

Obtidos os dados, eles devem ser cuidadosamente criticados, à procura de possíveis falhas e imperfeições, a fim de não incorrerem em erros grosseiros ou de certo vulto, que possam influir sensivelmente nos resultados. Segundo a RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017). “A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”.

REFERÊNCIAS

ACTUALITIX. Países Exportadores de Cevada. Disponível em: <<https://pt.actualitix.com/pais/wld/cevada-paises-exportadores.php>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. Mycopathologia, v. 112, p. 35–37, 1990.

AKAR, T.; AVCI, M.; DUSUNCELI, F. Barley: Post-harvest Operations. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 1–64, 2004.

ALVES, M. C. Teste t de Student. Proc Univariate: Testando a normalidade. São Paulo. 2017.

ALVES, M. F. et al. Produção de enzimas por fungos filamentosos. Hig. alim., p. 652–656, 2019.

AMARAL, L. et al. Produção de amilase por fungo filamentoso endofítico em fermentação submersa. Caderno de Ciência Agrária, v. 9, n. 3, p. 49–53, 2017.

ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 55, DE 14 de Novembro de 2012, 2012.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências Official Diary of the Union, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>

ARAÚJO, A.S.; MARTINS, E. DA S. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. Nucleus, v. 15, n. 2, p. 583–592, 2018.

BARBOSA, J. J.; PEREIRA, T. M.; OLIVEIRA, F. L. P. DE. Uma proposta para identificação de outliers multivariados. *Ciência e Natura*, v. 40, p. 40, 2018.

BARRETO, A.; OLIVEIRA, J.; SIILVA, L.; RHODEN, S. Fungos, diversidade e prospecção no Brasil. *Metodologias e Aprendizado*, v. 4, p. 149–163, 3 fev. 2021.

BARROS, C.; GHESTI, G. F. MALTE : essência da cerveja. 1. ed. Brasília: Instituto de Química de Brasília, 2016.

BATISTA, E. et al. Evaluation of amylase and proetase production by bacteria from Antarctica. p. 13–29, 2018.

BRANDL, J.; ANDERSEN, M. R. Aspergilli: Models for systems biology in filamentous fungi. *Current Opinion in Systems Biology*, v. 6, p. 67–73, dez. 2017.

CAIERÃO, E. Cevada. In: EMBRAPA-TRIGO (Ed.) Embrapa ALICE. Embrapa-Trigo,. p. 178–184, 2008.

CALADO, VERONICA.; MONTGOMERY, D. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. ed. 1, p. 260, 2003.

CECCATO, B. T. Modelagem da cinética de secagem e caracterização físico-química do bagaço de malte da produção de cerveja artesanal. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

CERVBRASIL. Anuário. In: Anuário. p. 63, 2016.

CHEN, H. G.; ZHANG, Y. H. P. New biorefineries and sustainable agriculture: Increased food, biofuels, and ecosystem security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 47, p. 117–132, 2015.

COELHO, G. D.; SOUSA, J. P. DE; GRANDE, C. Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. p. 286–297, 2018.

CORDEIRO, L. G. Caracterização e Viabilidade Econômica do Bagaço de Malte Oriundo de Cervejarias para Fins Energéticos. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização Do Bagaço De Malte Oriundo De Cervejarias. Revista Verde, v. 7, n. 3, p. 20–22, 2012.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012.

DA COSTA, W. G. Meta-análise das estimativas de parâmetros em genótipos de arroz irrigado em Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, 2018.

DA ROCHA, W. R. V. et al. Screening and optimizing fermentation production of I-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. Journal of Applied Microbiology, v. 126, n. 5, p. 1426–1437, 2019.

DA SILVA, C.D.D; DOS SANTOS, D. A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2. Ponta Grossa. 2021.

DE LIMA, R. C. F. Produção da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizado bagaço de malte de cevada. Universidade Federal do Espírito Santo, 2019.

DE MELO, B. CAVALCANTI A. Produção de celulasas por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia sp.*) utilizando *Trichoderma reesei*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DE SOUSA, W. M. ET AL. Elaboração e análise de cor da farinha de resíduos agroindustriais. Fórum de Integração Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação

Tecnológica do IFRR. 2019.

DO NASCIMENTO, C. S. Prospecção de produtos inovadores com a utilização do bagaço de malte na fabricação de gelatos. Universidade Federal de Alagoas, 2020.

DO NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Potential assessment of waste produced through the agro-industrial processing in Brazil. *Revista Virtual de Quimica*, v. 7, n. 6, p. 1968–1987, 2015.

DRAGONE, S. I. M. Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos. Universidade de São Paulo, 2007.

EICHLER, P. Cultivo em estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para produção de lipases. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.

EXPASY. Enzyme nomenclature database. Disponível em: <<https://enzyme.expasy.org/>>. Acesso em: 21 abr. 2020.

FELIPE, M.T.; BEZERRA, J.; MOTTA, C.S.; SANTOS, C. A importância da liofilização na preservação de espécies do gênero *Aspergillus* de interesse biotecnológico. *Revista UNINGÁ*, v. 34, n. 2, p. 1–15, 2019.

FONSECA, T. C. S. . et al. Amylase production by *Aspergillus tamaris* (UCP 1261) through submerged fermentation using alternative media containing agro-industrial residues. In: PRESS, B. W. (Ed.). . *Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology*. 1. ed. Florida: [s.n.]. p. 120–124.

FRANÇA, I.B.; DA SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 5, p. 51331–51345, 2021.

FREIRE, N.C.F.; MOURA, D.C.; SILVA, J.B.; MOURA, A.S.; MELO, J.I.M.; PACHECO, P. Atlas das caatingas: o único bioma exclusivamente brasileiro.

Recife: Fundação Joaquim Nabuco, 2018.

GUPTA, V. K. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. Trends in Biochemical Sciences, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

IGNÁCIO, S. A. Importância Da Estatística Para O Processo De Conhecimento E Tomada De Decisão. Revista Paranaense De Desenvolvimento, p. 175–192, 2010.

INFANTE, J. et al. Agroindustriais De Frutas Tropicais. n. April 2015, p. 87–91, 2013.

JAN, S.; PARRY, J. A. Approaches to heavy metal tolerance in plants. Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants, p. 1–110, 2016.

JR, N. P.; BON, E.; FERRARA, M. Tecnologia de bioprocessos. ed. Séries em Biotecnologia, v. 1, p. 593, 2008.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KLICH, M. . Identificação de espécies comuns de *Aspergillus*. ed. CBS. p. 116, 2002.

KOCSUBÉ, S. et al. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. Studies in Mycology, v. 85, p. 199–213, set. 2016.

KUMAR, R. P. et al. Agro-Industrial Waste Valorization to Energy and Value Added Products for Environmental Sustainability. Biomass Valorization to Bioenergy, ed. SPRINGER NATURE , Singapura, p. 226, 2020.

LEMOS, D. G. L; SELVA, FILHO, A. A. P.; BARRETO, G. C. M.; BATISTA, C. M.; PAIVA, S. C.; MESSIAS, A. S. Use of alternative residues for adsorption of chemical

elements from river sediment. International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2020.

LIMA, U. A. . ET AL. Biotecnologia Industrial Vol.3, ed. 1, p.616, 2001.

LISBOA, G. S. et al. Avaliação das condicionantes de regressão na estimativa de diâmetro da copa para *Araucaria angustifolia*. BIOFIX Scientific Journal, v. 3, n. 2, p. 279, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. ed. Elsevier Inc., p. 267–298, 2017.

MAIA, T. F.; FRAGA, M. E. Bioprospecting *Aspergillus* section Nigri in Atlantic Forest soil and plant litter. Arquivos do Instituto Biológico, v. 84, 17 nov. 2017.

MAIONE, N. R. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte (BSG) visando a produção de etanol de segunda geração. Universidade Federal de Goiás, 2019.

MANERA, A. P. et al. Use of agroindustrial residues in biotechnological process by betagalactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Acta Scientiarum - Technology, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2011.

MARTINS, L. H. DA S. et al. Análise físico-química de diferentes resíduos agroindustriais para possível utilização na indústria. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 2, p. 6936–6948, 2020.

MAYER, E. T. Caracterização bromatológica de grãos de cevada e efeito da fibra alimentar na resposta biológica de ratos. Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MELLO, L.R.P.F.; VERGÍLIO, R.M.; MALI, S. Caracterização química e funcional do resíduo fibroso da indústria cervejeira. BBR – Biochemistry and Biotechnology

Reports. Londrina: Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2013

MELO, R.; VOLTOLINI, T. V. Agricultura familiar depende de chuva no semiárido. n.4, v. 1, p.470, 2019.

MENDOZA, S. L. Y. Estudo da produção de inulinase por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o resíduo úmido cervejeiro e o melaço de cana-de-açúcar. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MILTON, C. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina , Brasil. Evidência, v. 11, n. 2, p. 15–28, 2011.

MORAN, L. A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. Bioquímica. São Paulo, ed. 5, p. 832, 2015.

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

NASCIMENTO, K.B.M.; MARTINS, A.G.R.; TAKAKI, G.M.C.; DA SILVA, C.A.A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus sp.* isolado do solo da caatinga De Pernambuco, Brasil. e-xacta, v. 1, n. 1, p. 95–103, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre, ed. 7, p. 1312, 2018.

OLIVEIRA, C. F. D. DE et al. Bagaço de malte como substrato para produção de

biopigmentos produzidos por *Monascus Ruber* Cct 3802. *Journal of Neotropical Agriculture*, v. 3, n. 3, p. 6–9, 2016.

OLIVEIRA, J. B. DE; NUNES-SILVA, C. G.; SANTA-ROSA, P. S. Determinação das características físico-químicas da atividade β -glucosidase presente no complexo enzimático de *Aspergillus versicolor*. p. 94–103, 2018.

PAREYN, F. G. C. O Papel do Manejo Florestal Sustentável. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. p. 99–113, 2010.

PAZ JUNIOR, F. B. DA et al. Caracterização morfológica e proteolítica de *Aspergillus Niger* isolado da biblioteca do IFPE - Campus Recife. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 8, p. 63959–63966, 2020.

PERA, J.; PARLADÉ, J.; ÁLVAREZ, I. Eficacia del inóculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: "*Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*", en contenedor. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, v. 7, n. 1, p. 139–154, 1998.

PEREIRA, C. R. Produção de amilases por *Aspergillus niger*: Potencial de aplicação na hidrólise do amido granular da batata doce. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2015.

PIERRE, G. et al. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, v. 54, n. 3, p. 305–310, 2011.

PINHEIRO, J. I.; CUNHA, S. B.; CARVAJAL, S. R.; GOMES, G. C. Estatística Básica. A arte de Trabalhar com Dados. Rio de Janeiro: CAMPUS, 2009.

PRADO, F. B. et al. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, v. 12, n. 1, p. 37–47, 2017.

RAMOS, S. Simulação de Monte Carlo na avaliação de incertezas de medição. Boletim Sociedade Portuguesa de Estatística. Gráfica So ed. Lisboa, p. 32–35, 2017.

RESENDE, M. D. V.; PIRES, I. E.; SILVA, R. L.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. Genética Florestal. Viçosa: Embrapa, 2011.

ROCHA, B. C. Avaliação da termoestabilidade e das condições de extração das amilases produzidas por *Aspergillus sp.* FSDE16 em bagaço de malte. Universidade Federal da Paraíba, 2019.

RODRIGUES, E. M. G. Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. Bioenergia em Revista: Diálogos, v. 11, n. 1, p. 46–57, jan. 2021.

ROSSETTI, A. G. Precisão experimental e tamanho da área de experimentos de função da unidade experimental e do número de repetições. Revista Brasileira Fruticultura, v. 1, p. 704–708, 2001.

SANTOS, J. J. DOS et al. Modelagem geoestatística de elementos maiores dos solos de Feira de Santana-Ba Brasil. *Physis Terrae* - Revista Ibero-Afro-Americana de Geografia Física e Ambiente, v. 2, n. 1, p. 63–86, 2020.

SAWARKAR, A.; SHARMA, R. K.; GAUTAM, V. Bioprospecting : Creating value for biodiversity. The Pharma Innovation Journal, v. 8, n. 4, p. 256–265, 2019.

SCHMILDT, E. R. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. Revista Agro@Mambiente on-Line, v. 11, n. 4, p. 290, 2017.

SERRA, R. M. . Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina. [s.l.] Universidade do Minho de Portugal, 2005.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 2, p. 201–211, 2013.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, n. 2, p. 235–251, 2019.

SILVA, E. G. DA. Fermentação de licor de hemicelulose advindo do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte com as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Pachysolen tannophilus* para produção de etanol 2G. Universidade Federal de Goiás, 2019.

SILVA, I. E. B. DA et al. Fungolândia: jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da Caatinga. *Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)*, v. 15, n. 6, p. 52–99, 2020.

SIMOES, A. O. et al. Conhecendo a biodiversidade. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, n. 26, p. 196, 2019.

SOLTANI, J. Secondary metabolite diversity of the genus *Aspergillus*: recent advances. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, p. 275–292, 2016.

SPOHNER, S. C. et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, v. 202, p. 118–134, 2015.

TACIN, M. V. et al. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus sp.* from Amazon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 17, n. November 2018, p. 369–378, 2019.

TROMBINI, C. B. Bioprospecção de composto citotóxico derivado de extratos

fúngicos do gênero *Aspergillus*. Universidade Federal da Integração Latino-Americana, 2019.

VADLAPUDI, V. et al. *Aspergillus* secondary metabolite database, a resource to understand the secondary metabolome of *Aspergillus* genus. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 7325, 4 dez. 2017.

VASCONCELOS, A.F.; CHAMY, M.N.C.L.; DA COSTA, A.B.P.L.; COSTA, B.K.B.S.; LIMA, U.O.; PRÁ, A.C.D.; REIS, R.S.; BRITO, R. G. DE. Avaliação de amilases por fermentação submersa de fungo *Aspergillus aculeatus*. A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2. Atena Editora,. p. 1–13, 2021.

VIEIRA, F. E.; DELERUE-MATOS, C. Microorganisms for Sustainability 11. Microbial Enzymes : Roles and Applications in Industries. v. 11, n. 4, p. 331, 2020.

VITOLLO, M.; PESSOA JUNIOR, A.; MONTEIRO, G. ET AL. Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial. São Paulo, ed. 1, p. 420, 2015.

YAHYA, S.; MUHAMMAD, F.; SOHAIL, M.; KHAN, S. A. Amylase production and growth pattern of two indigenously isolated aspergilli under submerged fermentation: Influence of physico-chemical parameters. Pakistan Journal of Botany, v. 53, n. 3, p. 1147–1155, 2021.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 102, n. 15, p. 6279–6298, 2018.

YI, Y. L.; PARK, Z. D. β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 : cloning , purification , and properties. World Journal of Microbiology and Biotechnology, p. 865–873, 2013.

ZANUTTO, A.; SILVA, B. C. DA. Avaliação do bagaço de malte como biossorvente do corante amarelo Reafix B2R. Universidade Tecnológica Federal do Paraná,

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

50

2016.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE AMILASE POR *ASPERGILLUS* SPP. EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUO DE BAGAÇO
DE MALTE

Artigo aceito: International Journal of Development Research
Qualis B1

PRODUÇÃO DE AMILASE POR *ASPERGILLUS SPP.* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUO DE BAGAÇO DE MALTE

Diego G. De L. Lemos¹, Rosileide F. S. Andrade¹, Hilário J. B. Lima Filho², Carlos A. A. da Silva¹

¹ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Engenharia Química – DEQ, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

O objetivo do trabalho foi utilizar o resíduo bagaço de malte cervejeiro como indutor da produção de amilase por cepas de *Aspergillus spp.* (UCP 1275, UCP 6119, UCP 1295 e UCP 1261) em fermentação submersa. Inicialmente, a produção foi investigada em meio de cultura padrão (MCP) contendo amido como única fonte de carbono. Em seguida, as cepas foram testadas quanto ao potencial de bioconversão em novo meio de cultivo contendo o bagaço de malte (MBM). Para definir as condições ideais de cultivo e produção foi aplicado planejamento fatorial com a cepa selecionada variando o pH inicial (5 a 7), temperatura (24 a 32 °C) e concentração do resíduo bagaço de malte (5 a 15 g/L). Conforme os resultados, todas as cepas de *Aspergillus spp.* testadas demonstraram atividade amilolítica no meio padrão. No meio alternativo contendo bagaço de malte (MBM), a cepa 1 (*Aspergillus spp.* UCP 1275) foi selecionada pelo elevado potencial na produção da amilase (2,264 U/mL). Na condição 1 do planejamento (pH 5, temperatura 28°C e 5 g/L do resíduo de bagaço de malte) esta cepa produziu 7,59 U/mL amilase. A partir dos dados obtidos o *Aspergillus spp.* UCP 1275 demonstrou ser micro-organismo promissor para produção de amilase em fermentação submersa em meio de cultivo sustentável.

Palavras-Chave: Enzimas. Fungos. Resíduos. Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Os resíduos produzidos por industriais de alimentos possuem elevado teor de matéria orgânica e são ricos em nutrientes. Quando esses resíduos industriais não são tratados corretamente, causam sérios problemas de poluição ambiental. Além disso, esses resíduos quando descartados no meio ambiente representam perda de nutrientes valiosos (KUMAR et al., 2020).

O principal resíduo gerado pela indústria cervejeira é o bagaço de malte. O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo e, portanto, um dos maiores geradores de bagaço de malte (MAIONE, 2019). O bagaço de malte de cevada é resultante do processo inicial da fabricação da cerveja, gerado a partir da filtração do mosto antes da fervura. Este bagaço é constituído basicamente pelas cascas do grão de cevada malteado. Sua utilização vem sendo estudada nos processos biotecnológicos (RODRIGUES, 2021).

Segundo Mussatto (2006) e Silva (2019) o bagaço de malte corresponde a biomassa lignocelulósica rica por possuir cerca de 20 - 30 % de proteínas e de 70- 80 % de fibras com a hemicelulose, celulose e lignina como os principais componentes destas fibras. Uma das aplicações deste resíduo é a utilização como substrato para fermentações e a produção de enzimas por fungos filamentosos (ALVES et al., 2019).

Os fungos filamentosos são microrganismos que apresentam grande facilidade de cultivo, elevado potencial de produção enzimática e secretam elevado número de enzimas extracelulares com potencial para inúmeras aplicações industriais e biotecnológicas (NASCIMENTO et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* destaca-se entre os demais gêneros de fungos por possuir a capacidade de sobreviver em diversas condições e produzir metabólitos que podem decompor resíduos agroindustriais em bioprodutos, com satisfatória eficiência nesse processo de conversão (GUSMÃO et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi identificar o potencial de diferentes cepas de *Aspergillus spp.* na produção de amilase a partir da bioconversão do resíduo de bagaço de malte utilizando fermentação submersa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 4 amostras de *Aspergillus spp.* (UCP 1275, UCP 6119, UCP 1295 e UCP 1261) obtidas da coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco – UCP, registrada no World Federation for Culture Collections - WFCC. Estas amostras de *Aspergillus spp.* foram isoladas do solo da Caatinga pernambucana.

O substrato utilizado foi o resíduo de cervejaria (bagaço de malte) adquirido da indústria de cerveja artesanal localizada no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. O substrato (bagaço de malte) foi seco em estufa com circulação de ar, à 60 °C+72 horas, conforme LEMOS et al. (2020), para análise bromatológica, com os seguintes parâmetros: Matéria seca - MS %; Matéria mineral - MM %; Nitrogênio total - NT %; Proteína total - PT %; Fibra detergente ácido - FDA %; Fibra detergente neutro - FDN %; Extrato não nitrogenado - ENN %; Fibra total - FT %; Extrato etéreo - EE %; Amido – AM %; Sódio – Na⁺ %; Potássio – K⁺ %; Cálcio – Ca²⁺ %; Magnésio – Mg²⁺ %, conforme Official Methods of Analysis (AOAC, 2007). O material seco foi triturado manualmente e peneirado para uniformização do tamanho de partícula em 0,5mm.

As cepas de *Aspergillus spp.* foram aclimatadas em meio Sabouraud suplementado com bagaço de malte (0,2%). O inóculo foi realizado a partir dos micélios das cepas fúngicas crescidas em meio Sabouraud suplementado com bagaço de malte (0,2%). Após 72 horas de crescimento a 28°C, 20 discos de 8mm foram obtidos e utilizados como inóculo no meio de produção (PERA et al., 1998).

A produção de amilase foi investigada nas cepas de *Aspergillus spp.* cultivadas no meio padrão conforme (ADAMS, 1990), e no meio alternativo (meio padrão com a substituição do amido pelo bagaço de malte na mesma concentração). A atividade amilolítica foi realizada pelo método DNS de acordo com a metodologia (ANVISA, 2012; FRANÇA, 2021). Este método é baseado na quantificação dos açúcares redutores liberados pela reação de hidrólise do amido catalisada por amilases. Para tanto, os tubos foram constituídos pela mistura de 1,5 mL de amido solúvel (1% p /v), solução tampão pH 6 de citrato-fosfato 0,05 M, e 1,5 mL da solução enzimática bruta. A reação foi realizada a 50 °C por 15 minutos. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico. A mistura foi fervida durante 5 min e a solução foi esfriada em

temperatura ambiente. Adicionalmente, 15 mL de água destilada também foram adicionados. A absorbância foi lida a 550 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária que catalisou a liberação de açúcar redutor equivalente a 1µmol de D-glicose por minuto nas condições de ensaio. Os resultados da atividade amilolítica foram expressos em U/mL min. ⁻¹ conforme a Equação 1. Os experimentos foram realizados em triplicata com os valores estatisticamente validados pelo: R², coeficiente de variação (CV), outlier (OUT) e T_{student} a 95%.

$$\text{Atividade Amilolítica [UA.mL}^{-1}.\text{min.}^{-1}] = \frac{C \cdot V_m}{T_r} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

C=Concentração de açúcares redutores na amostra (µmol mL⁻¹)

V_m = Volume da mistura reacional

T_r = Tempo de reação

A máxima produção da amilase foi investigada com a cepa selecionada variando o pH, temperatura e a concentração do resíduo de bagaço de malte através de um planejamento fatorial. Para tanto, no planejamento foram definidos os níveis mínimos (-1), máximos (1) e intermediários (0) e 4 repetições no ponto central conforme descrito na Tabela 1. As variáveis independentes do planejamento foram: pH inicial, temperatura (°C) e a concentração do resíduo de bagaço de malte (g/L). As variáveis respostas do planejamento foram: Atividade Enzimática Amilase (U/mLmin), pH final e Rendimento da biomassa (g). O software Statistica12 foi utilizado para suportar a execução desta etapa.

Tabela 1- Planejamento fatorial para avaliação do pH, temperatura e concentração do resíduo na atividade amilolítica pela cepa selecionada

Condições	Variáveis independentes		
	pH ₀	Temperatura (°C)	Conc. Resíduo (g/L)
1	5 (-1)	24 (-1)	5 (1-)

2	7 (+1)	24 (-1)	5 (-1)
3	5 (-1)	32 (+1)	5 (-1)
4	7 (+1)	32 (+1)	5 (-1)
5	5 (-1)	24 (-1)	15 (+1)
6	7 (+1)	24 (-1)	15 (+1)
7	5 (-1)	32 (+1)	15 (+1)
8	7 (+1)	32 (+1)	15 (+1)
9	6 (0)	28 (0)	10 (0)
10	6 (0)	28 (0)	10 (0)
11	6 (0)	28 (0)	10 (0)
12	6 (0)	28 (0)	10 (0)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O amido solúvel foi utilizado no meio de cultura padrão (MCP) como única fonte de carbono para investigação das cepas de *Aspergillus spp.* quanto ao potencial de produção da amilase em fermentação submersa (FS). Os resultados desta investigação de microorganismos estão descritos na Tabela 2. Todas as cepas de *Aspergillus spp.* testadas demonstraram atividade amilolítica. A máxima atividade amilolítica no meio com amido solúvel (meio padrão- MCO) após 96h de fermentação foi de 0,760 U/mL com a cepa 2 (*Aspergillus spp.* UCP6119) e a mínima atividade foi com a cepa 3 (*Aspergillus spp.* UCP1295). A análise do coeficiente de variação com os resultados obtidos com a cepa 2 foi estatisticamente significativa com grau de confiança de 95% e R^2 de 0,9829. Os resultados das réplicas da cepa 2 (*Aspergillus spp.* UCP6119) foram considerados estatisticamente válidos, devido à ausência de distorções estatísticas através dos valores de outliers obtidos.

Tabela 2- Avaliação do potencial de cepas de *Aspergillus spp.* na produção de amilase em meio contendo amido solúvel

Cepas de <i>Aspergillus spp.</i>	Meio cultura	Índice Enzimático (U/mL)	Coef. Variação (CV)	Outlier			Intervalo de Confiança (95%)
				Rep1	Rep2	Rep3	

Cepa1 (UCP1275)	MCP	0,410	0,26	1,122	0,798	0,324	0,144 +/- 0,0945
Cepa2 (UCP6119)	MCP	0,760	0,30	1,137	0,394	0,743	0,213 +/- 0,3132
Cepa3 (UCP1295)	MCP	0,004	0,30	0,429	0,714	1,143	0,063 +/- 0,0522
Cepa4 (UCP1261)	MCP	0,500	0,30	0,551	0,604	1,154	0,161 +/- 0,1413

*Meio padrão (MCP)

*CV $\leq 0,1$ → baixa dispersão; $0,1 < CV \leq 0,2$ → média dispersão; $0,2 < CV \leq 0,3$ → alta dispersão; CV $> 0,3$ → descarte de dados ou repetição. E Out ≤ 2 , valor sem discrepância (LEMOS et al., 2020)

As cepas de *Aspergillus spp.* capazes de assimilar o amido solúvel presente no meio padrão (MCP) foram testadas em novo meio de cultivo contendo o bagaço de malte (MBM) como única fonte de carbono em substituição ao amido solúvel, para selecionar a cepa de maior potencial amilolítico. De acordo com os dados obtidos, a cepa 1 (*Aspergillus spp.* UCP1275) foi eficaz na bioconversão dos nutrientes presentes no bagaço de malte para produção da enzima amilase resultando em atividade amilolítica de 2,264 U/mL (Tabela 3). Adicionalmente, esta cepa apresentou aumento de mais de 500% no valor da atividade amilolítica. A análise do coeficiente de variação dos dados obtidos em todos os experimentos em meio com bagaço de malte (MBM) foram estatisticamente significativos com grau de confiança de 95% e R^2 de 0,9467. Os resultados das réplicas da cepa 1 (*Aspergillus spp.* UCP1275) foram considerados estatisticamente válidos, devido à ausência de distorções estatísticas através dos valores de outliers obtidos.

Tabela 3- Seleção da cepa de *Aspergillus spp.* com maior potencial amilolítico em meio com bagaço de malte

Cepas de <i>Aspergillus spp.</i>	Meio de cultura	Índice Enzimático (U/mL)	Coef. Variação (CV)	Outlier			Intervalo de Confiança (95%)
				Rep1	Rep2	Rep3	
Cepa1 (UCP1275)	MBM	2,264	0,17	1,135	0,385	0,750	0,512 +/- 0,2174

Cepa2 (UCP6119)	MBM	2,253	0,27	0,334	0,791	1,124	0,510 +/- 0,3425
Cepa3 (UCP1295)	MBM	1,252	0,17	1,130	0,772	0,358	0,311 +/- 0,1320
Cepa4 (UCP1261)	MBM	1,979	0,06	1,069	0,913	0,156	0,456 +/- 0,0690

* Meio Bagaço de Malte (MBM).;

*CV ≤ 0,1 → baixa dispersão; 0,1 < CV ≤ 0,2 → média dispersão; 0,2 < CV ≤ 0,3 → alta dispersão; CV > 0,3 → descarte de dados ou repetição. E Out ≤ 2, valor sem discrepância (LEMOS et al., 2020)

De acordo com a Tabela 4 o bagaço de malte demonstrou ser excelente fonte de carbono para o *Aspergillus spp.* UCP1275 (cepa 1) devido a rica constituição nutricional em fonte de carbono (amido), fonte de nitrogênio (proteína total) e minerais presentes no resíduo do bagaço de malte. Os resíduos cervejeiros utilizados nos trabalhos de Eichler (2018) e de Mendoza (2021) demonstram valores percentuais de proteína inferiores aos obtidos neste estudo.

Tabela 4 – Resultado da composição bromatológica do resíduo do bagaço de malte

COMPONENTES	QUANTIDADE (%)	MÉTODO
Matéria seca – MS	78,30	
Matéria mineral - MM	34,22	
Nitrogênio total - NT	3,90	
Proteína total - PT	24,37	
Fibra detergente ácido – FDA	28,83	
Fibra detergente neutro - FDN	50,30	AOAC 2007
Extrato não nitrogenado - ENN	43,16	
Fibra total - FT	24,13	
Extrato etéreo - EE	04,12	
Amido – AM	07,46	
Sódio – Na ⁺	00,03	

Com o objetivo de maximizar a atividade amilolítica foi aplicado planejamento fatorial de 2³ (Tabela 5) com a cepa selecionada (*Aspergillus spp.* UCP1275). De acordo com a

variável resposta atividade amilolítica, a condição 1 do planejamento (pH 5, temperatura 28°C e 5g/L do resíduo bagaço de malte) resultou na máxima atividade amilolítica (7,59U/mL). Nesta condição do planejamento o pH final apresentou valores levemente alcalinos e o crescimento microbiano não foi significativo provando que não houve relação do crescimento com a produção da amilase.

Comparando os elevados níveis de atividade enzimática deste estudo, com outros trabalhos onde são aplicados as mesmas metodologias de produção (fermentação submersa com *Aspergillus*) é possível comprovar que os valores da atividade enzimática para amilase obtidos neste estudo (Tabela 5) são superiores aos citados na literatura (VASCONCELOS et al., 2021), 0,91 U/mL (FRANÇA et al., 2021), $7,062 \times 10^{-2}$ U/mL (YAHYA et al., 2021).

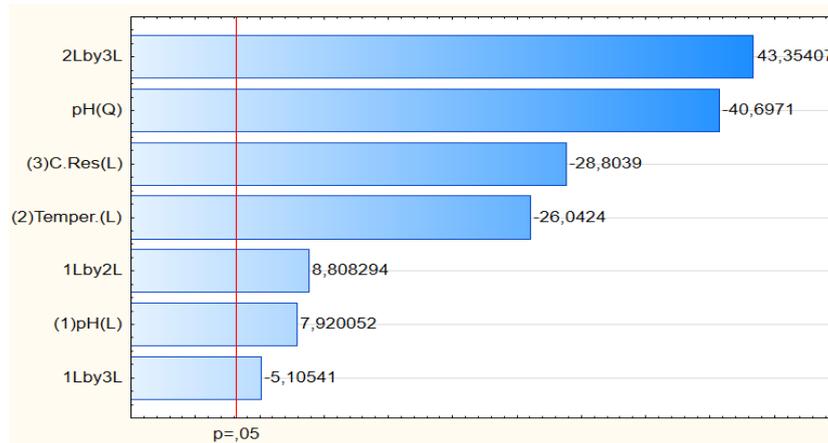
Tabela 5 - Avaliação do pH, temperatura e concentração do resíduo na atividade amilolítica pela cepa selecionada utilizando bagaço de malte como fonte de carbono

Condições	Variáveis independentes			Variáveis respostas		
	pH ₀	Temperatura (°C)	Conc. Resíduo (g/L)	Atividade Enzimática (U/mL)	pH final	Biomassa (g)
1	5 (-1)	24 (-1)	5 (-1)	7,59	7,86	0,2272
2	7 (+1)	24 (-1)	5 (-1)	6,85	8,33	0,3371
3	5 (-1)	32 (+1)	5 (-1)	2,09	8,28	0,2483
4	7 (+1)	32 (+1)	5 (-1)	4,34	8,76	0,086
5	5 (-1)	24 (-1)	15 (+1)	2,74	7,71	0,999
6	7 (+1)	24 (-1)	15 (+1)	3,37	8,33	0,803
7	5 (-1)	32 (+1)	15 (+1)	4,21	8,19	0,838
8	7 (+1)	32 (+1)	15 (+1)	3,90	8,63	0,6063
9	6 (0)	28 (0)	10 (0)	6,36	8,18	0,6166
10	6 (0)	28 (0)	10 (0)	6,50	8,06	0,4333
11	6 (0)	28 (0)	10 (0)	6,34	8,18	0,4920
12	6 (0)	28 (0)	10 (0)	6,48	8,18	0,6798

A Figura 1 demonstra estatisticamente a influência do pH, temperatura e

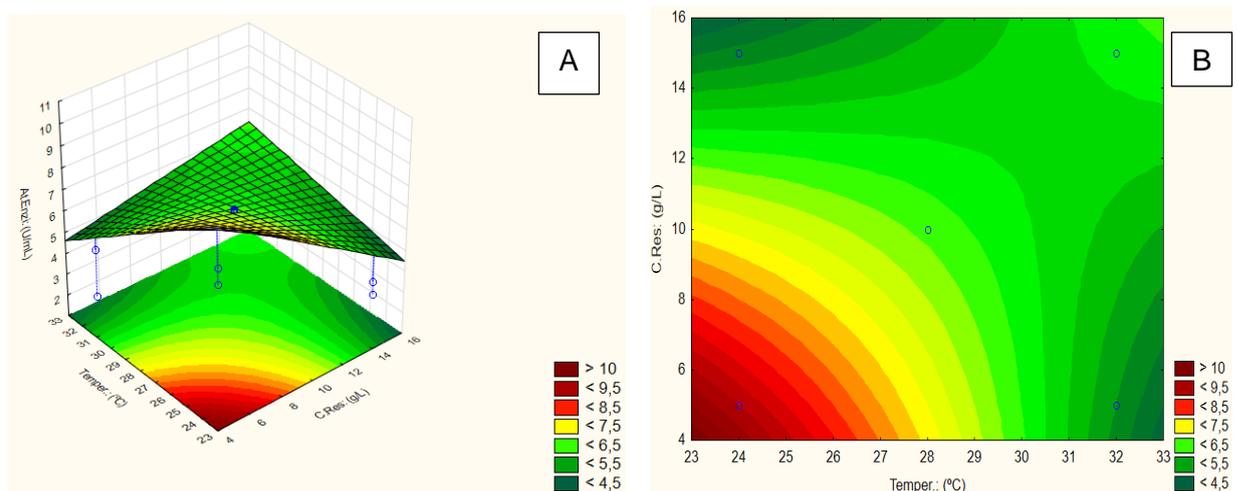
concentração do resíduo de bagaço de malte na atividade amilolítica. De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 1) é possível identificar que todas as variáveis independentes foram significativas com valores acima de p . favorecendo a produção da amilase. A relação entre a concentração do resíduo de bagaço de malte e a variação da temperatura foi a que mais contribuiu com o aumento da atividade enzimática.

Figura. 1 Diagrama de Pareto para análise estatística do pH, temperatura e concentração do resíduo frente a atividade amilolítica após cultivo de *Aspergillus spp.* UCP1275 (cepa 1)



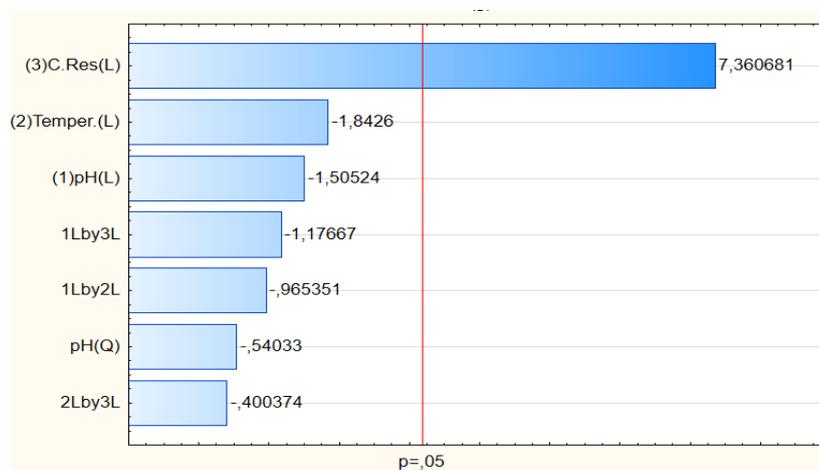
Os efeitos das variáveis independentes e suas interações para a variável resposta atividade enzimática são comprovados nos gráficos de duas (Figura 2A) e três dimensões (Figura 2B) e estatisticamente informam que valores de concentração de resíduo de bagaço de malte de 4,0 g/L, pH 6 e temperatura 23°C induzem ao máximo a produção da amilase pela cepa 1 (*Aspergillus spp.* UCP1275).

Figura 2- Atividade enzimática em função temperatura e concentração de resíduo avaliado pelos gráficos de superfície resposta (A) e curva de contorno (B)



A influência do pH, temperatura e concentração do resíduo frente a produção de biomassa pelo *Aspergillus spp.* UCP1275 (cepa 1) também foi analisada estatisticamente (Figura 3). De acordo com os resultados obtidos no Diagrama de Pareto (Figura 3) a variável independente que mais influenciou no crescimento foi a variável concentração do bagaço de malte. Associando esta informação aos dados da Tabela 5 é possível identificar que o nível máximo do resíduo do bagaço de malte (15g/L) favoreceu o máximo crescimento do fungo e consequente rendimento máximo de biomassa.

Figura. 3 Diagrama de Pareto para análise estatística da produção de biomassa após cultivo de *Aspergillus spp.* UCP1275 (cepa 1) em meio contendo bagaço de malte (MBM)



CONCLUSÃO

Todas as cepas de *Aspergillus spp.* estudadas demonstraram potencial biotecnológico para produção de amilase no meio padrão (MCP) contendo amido solúvel. Por outro lado, no meio alternativo contendo bagaço de malte (MBM) a cepa do *Aspergillus spp.* UCP1275 demonstrou máximo potencial de metabolização do resíduo bagaço de malte para produção de amilase em cultivo submerso. Os dados obtidos foram estatisticamente validados com valor do R^2 demonstrando robustez do modelo matemático.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FACEPE, CAPES e a UNICAP, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTUALITIX. **Países Exportadores de Cevada**. Disponível em:

<<https://pt.actualitix.com/pais/wld/cevada-paises-exportadores.php>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, p. 35–37, 1990.

AKAR, T.; AVCI, M.; DUSUNCELI, F. Barley: Post-harvest Operations. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 1–64, 2004.

ALVES, M. C. **Teste t de StudentProc Univariate: Testando a normalidade**. São Paulo: [s.n.].

ALVES, M. F. et al. Produção de enzimas por fungos filamentosos. **Hig. alim.**, p. 652–656, 2019.

AMARAL, L. et al. Produção de amilase por fungo filamentoso endofítico em fermentação submersa Production of amylase by endophytic filamentous fungi by submerged fermentation. **Caderno de Ciência Agrária**, v. 9, n. 3, p. 49–53, 2017.

ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 55, DE 14 de Novembro de 2012**, 2012.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017**.

Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências Official

Diary of the Union, 2017. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>

ARAÚJO, ALINE SILVA; MARTINS, E. DA S. PRODUÇÃO DE α -AMILASES POR *Rhizomucor miehei* E *Syncephalastrum racemosum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES FERMENTATIVAS. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583–592, 2018.

BARBOSA, J. J.; PEREIRA, T. M.; OLIVEIRA, F. L. P. DE. Uma proposta para identificação de outliers multivariados. **Ciência e Natura**, v. 40, p. 40, 2018.

BARRETO, ALAINE; OLIVEIRA, JULIANO; SIILVA, LUCAS; RHODEN, S. Fungos, diversidade e prospecção no Brasil. **Metodologias e Aprendizado**, v. 4, p. 149–163, 3 fev.

2021.

BARROS, C.; GHESTI, G. F. **MALTE : essência da cerveja**. 1. ed. Brasília: Instituto de Química de Brasília, 2016.

BATISTA, E. et al. EVALUATION OF AMYLASE AND PROTEASE PRODUCTION BY BACTERIA FROM ANTARCTICA. p. 13–29, 2018.

BRANDL, J.; ANDERSEN, M. R. Aspergilli: Models for systems biology in filamentous fungi. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 67–73, dez. 2017.

CAIERÃO, E. Cevada. In: EMBRAPA-TRIGO (Ed.). . **Embrapa ALICE**. [s.l.] Embrapa-Trigo, 2008. p. 178–184.

CALADO, VERONICA.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. 1. ed. [s.l: s.n.].

CECCATO, B. T. **MODELAGEM DA CINÉTICA DE SECAGEM E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO- QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE DA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL**. [s.l.] UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2019.

CERVBRASIL. Anuário. In: **Anuário 2016**. [s.l: s.n.]. p. 63.

CHEN, H. G.; ZHANG, Y. H. P. New biorefineries and sustainable agriculture: Increased food, biofuels, and ecosystem security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 117–132, 2015.

COELHO, G. D.; SOUSA, J. P. DE; GRANDE, C. Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. p. 286–297, 2018.

CORDEIRO, L. G. **Caracterização e Viabilidade Econômica do Bagaço de Malte Oriundo de Cervejarias para Fins Energéticos**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2011.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização Do Bagaço De Malte Oriundo De Cervejarias. **Revista Verde**, v. 7, n. 3, p. 20–22, 2012.

CRUZ, COSME DAMIÃO; REGAZZI, ADAIR JOSÉ; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012.

DA COSTA, W. G. **META-ANÁLISE DAS ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS EM GENÓTIPOS DE ARROZ IRRIGADO EM MINAS GERAIS**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2018.

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. 65

DA ROCHA, W. R. V. et al. Screening and optimizing fermentation production of l-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426–1437, 2019.

DA SILVA, C.D.D; DOS SANTOS, D. . **A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2**. Ponta Grossa: [s.n.].

DE LIMA, R. C. F. **PRODUÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE POR *Aspergillus niger* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE DE CEVADA**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2019.

DE MELO, B. CAVALCANTI A. **PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM RESÍDUO DE ACEROLA (*Malpighia sp.*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei***. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DE SOUSA, W. M. ET AL. **ELABORAÇÃO E ANÁLISE DE COR DA FARINHA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**. Fórum de Integração Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação Tecnológica do IFRR. **Anais...**2019

DO NASCIMENTO, C. S. **Prospecção de produtos inovadores com a utilização do bagaço de malte na fabricação de gelatos**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2020.

DO NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Potential assessment of waste produced through the agro-industrial processing in Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968–1987, 2015.

DRAGONE, S. I. M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

EICHLER, P. **Cultivo em estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para produção de lipases**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2018.

EXPASY. **Enzyme nomenclature database**. Disponível em:

<<https://enzyme.expasy.org/>>. Acesso em: 21 abr. 2020.

FELIPE, M.T.; BEZERRA, J.; MOTTA, C.S.; SANTOS, C. A importância da liofilização na preservação de espécies do gênero *Aspergillus* de interesse biotecnológico. **Revista UNINGÁ**, v. 34, n. 2, p. 1–15, 2019.

FONSECA, T. C. S. . et al. Amylase production by *Aspergillus tamaris* (UCP 1261) through

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

66

submerged fermentation using alternative media containing agro-industrial residues. In:

PRESS, B. W. (Ed.). . **Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied**

Microbiology. 1. ed. Florida: [s.n.]. p. 120–124.

FRANÇA, I.B.; DA SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian**

Journal of Development, v. 7, n. 5, p. 51331–51345, 2021.

FREIRE, N.C.F.; MOURA, D.C.; SILVA, J.B.; MOURA, A.S.; MELO, J.I.M.; PACHECO, P.

Atlas das caatingas: o único bioma exclusivamente brasileiro. Recife: Fundação Joaquim Nabuco, 2018.

GUPTA, V. K. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste

Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

IGNÁCIO, S. A. Importância Da Estatística Para O Processo De Conhecimento E Tomada De Decisão. **Revista Paranaense De Desenvolvimento**, p. 175–192, 2010.

INFANTE, J. et al. Agroindustriais De Frutas Tropicais. n. April 2015, p. 87–91, 2013.

JAN, S.; PARRY, J. A. Approaches to heavy metal tolerance in plants. **Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants**, p. 1–110, 2016.

JR, N. P.; BON, E.; FERRARA, M. Tecnologia de bioprocessos. In: **Séries em**

Biotecnologia. [s.l: s.n.]. v. lp. 593.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KLICH, M. . Identificação de espécies comuns de *Aspergillus*. In: CBS (Ed.). .

Identificação de espécies comuns de Aspergillus. [s.l: s.n.]. p. 116.

KOCSUBÉ, S. et al. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 199–213, set. 2016.

KUMAR, R. P. et al. Agro-Industrial Waste Valorization to Energy and Value Added

Products for Environmental Sustainability. In: SPRINGER NATURE (Ed.). . **Biomass**

Valorization to Bioenergy. Singapura: [s.n.]. p. 226.

LEMOS, D. G. L; SELVA, FILHO, A. A. P.; BARRETO, G. C. M.; BATISTA, C. M.; PAIVA,

S. C.; MESSIAS, A. S. Use of alternative residues for adsorption of chemical elements from river sediment. **International Journal of Research Studies in Science, Engineering and**

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

67

Technology, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2020.

LIMA, U. A. . ET AL. **Biotecnologia Industrial Vol.3**. 1. ed. [s.l: s.n.].

LISBOA, G. S. et al. AVALIAÇÃO DAS CONDICIONANTES DE REGRESSÃO NA ESTIMATIVA DE DIÂMETRO DE COPA PARA *Araucaria angustifolia*. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 3, n. 2, p. 279, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 267–298.

MAIA, T. F.; FRAGA, M. E. Bioprospecting *Aspergillus section Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 17 nov. 2017.

MAIONE, N. R. **PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE (BSG) VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2019.

MANERA, A. P. et al. Use of agroindustrial residues in biotechnological process by betagalactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2011.

MARTINS, L. H. DA S. et al. Análise físico-química de diferentes resíduos agroindustriais para possível utilização na indústria. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 6936–6948, 2020.

MAYER, E. T. **Caracterização Bromatológica De Grãos De Cevada E Efeito Da Fibra Alimentar Na Resposta Biológica De Ratos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MELLO, L.R.P.F.; VERGÍLIO, R.M.; MALI, S. **Caracterização Química e Funcional do Resíduo Fibroso da Indústria Cervejeira**. BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports. **Anais...**Londrina: Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2013

MELO, R.; VOLTOLINI, T. V. **Agricultura familiar depende de chuva no semiárido**. [s.l: s.n.]. v. 1

MENDOZA, S. L. Y. **Estudo da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido utilizando como substrato o Resíduo Úmido Cervejeiro e o Melaço de cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da industria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. 68

chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MILTON, C. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina , Brasil. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 15–28, 2011.

MORAN, L. A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: [s.n.].

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

NASCIMENTO, KATARINA BOTELHO DE MELO; MARTINS, ALEX GABRIEL RODRIGUES; TAKAKI, GALBA MARIA DE CAMPOS; DA SILVA, CARLOS ALBERTO ALVES; OKADA, K. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para Produção De Tanase Por *Aspergillus Sp* Isolado Do Solo Da Caatinga De Pernambuco, Brasil Utilization Agro-Industrial Residues for Tannase Production By *Aspergillus Sp* Isolated From Soil Pernambuco Caatinga, Brazi. **e-xacta**, v. 1, n. 1, p. 95–103, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: [s.n.].

OLIVEIRA, C. F. D. DE et al. Bagaço De Malte Como Substrato Para Produção De Biopigmentos Produzidos Por *Monascus Ruber* Cct 3802. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 6–9, 2016.

OLIVEIRA, J. B. DE; NUNES-SILVA, C. G.; SANTA-ROSA, P. S. Determinação das Características Físico-químicas da Atividade β -glucosidase presente no Complexo Enzimático de *Aspergillus versicolor*. p. 94–103, 2018.

PAREYN, F. G. C. O Papel do Manejo Florestal Sustentável. In: AMBIENTE, M. DO M. (Ed.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. [s.l: s.n.]. p. 99–113.

PAZ JUNIOR, F. B. DA et al. Caracterização Morfológica E Proteolítica De *Aspergillus Niger* Isolado Da Biblioteca Do Ifpe - Campus Recife. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 63959–63966, 2020.

PERA, J.; PARLADÉ, J.; ÁLVAREZ, I. Eficacia del inóculo micelial de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: "Pinus pinaster, Pinus radiata

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da industria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

69

y *Pseudotsuga menziesii*”, en contenedor. **Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales**, v. 7, n. 1, p. 139–154, 1998.

PEREIRA, C. R. **PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus niger* : POTENCIAL DE APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO AMIDO GRANULAR DA BATATA-DOCE.** [s.l.]

Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2015.

PIERRE, G. et al. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 3, p. 305–310, 2011.

PINHEIRO, J. I.; CUNHA, S. B.; CARVAJAL, S. R.; GOMES, G. C. **Estatística Básica. A arte de Trabalhar com Dados.** Rio de Janeiro: CAMPUS, 2009.

PRADO, F. B. et al. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 12, n. 1, p. 37–47, 2017.

RAMOS, S. Simulação de Monte Carlo na avaliação de incertezas de medição. In:

ROSADO, F. (Ed.). . **Boletim Sociedade Portuguesa de Estatística.** Gráfica So ed. Lisboa: [s.n.]. p. 32–35.

RESENDE, M. D. V.; PIRES, I. E.; SILVA, R. L.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. **Genética Florestal.** Viçosa: Embrapa, 2011.

ROCHA, B. C. **AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus sp.* FSDE16 EM BAGAÇO DE MALTE.** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2019.

RODRIGUES, E. M. G. Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 11, n. 1, p. 46–57, jan. 2021.

ROSSETTI, A. G. Precisão Experimental E Tamanho Da Área De Experimentos De Função Da Unidade Experimental E Do Número De Repetições. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 1, p. 704–708, 2001.

SANTOS, J. J. DOS et al. Modelagem Geoestatística de Elementos Maiores dos Solos de Feira de Santana-Ba Brasil. **Physis Terrae - Revista Ibero-Afro-Americana de Geografia Física e Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 63–86, 2020.

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

70

SAWARKAR, A.; SHARMA, R. K.; GAUTAM, V. Bioprospecting : Creating value for biodiversity. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 4, p. 256–265, 2019.

SCHMILDT, E. R. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. **Revista Agro@Mambiente on-Line**, v. 11, n. 4, p. 290, 2017.

SERRA, R. M. . **Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina.** [s.l.] Universidade do Minho de Portugal, 2005.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 201–211, 2013.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235–251, 2019.

SILVA, E. G. DA. **FERMENTAÇÃO DE LICOR DE HEMICELULOSE ADVINDO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE COM AS LEVEDURAS *Scheffersomyces stipitis* E *Pachysolen tannophilus* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G** **Dissertação.** [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2019.

SILVA, I. E. B. DA et al. Fungolândia: jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da Caatinga. **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 15, n. 6, p. 52–99, 2020.

SIMOES, A. O. et al. **Conhecendo a biodiversidade.** [s.l.: s.n.].

SOLTANI, J. Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.** [s.l.] Elsevier, 2016. p. 275–292.

SPOHNER, S. C. et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 118–134, 2015.

TACIN, M. V. et al. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus sp.* from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. November 2018, p. 369–378, 2019.

TROMBINI, C. B. **Bioprospecção de Composto Citóxico Derivado de Extratos**

LIMA, D.G.L. Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *aspergillus spp.* Isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil.

71

Fúngicos do Gênero Aspergillus. [s.l.] Universidade Federal da Integração Latino-Americana, 2019.

VADLAPUDI, V. et al. Aspergillus Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of Aspergillus genus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7325, 4 dez. 2017.

VASCONCELOS, AMANDA FARIAS DE; CHAMY, MICHEL NASSER CORRÊA LIMA; DA COSTA, ANA BEATRIZ PEREIRA LELIS; COSTA, BIANCA KYNSENG BARBOSA DA SILVA; LIMA, UATYLA DE OLIVEIRA; PRÁ, ALEXANDRE COLI DAL; REIS, RENATO DOS SANTOS; BRITO, R. G. DE. AVALIAÇÃO DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO ASPERGILLUS ACULEATUS. In: **A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2.** [s.l.] Atena Editora, 2021. p. 1–13.

VIEIRA, F. E.; DELERUE-MATOS, C. **Microorganisms for Sustainability 11.** [s.l.: s.n.]. v. 11

VITOLO, M.; PESSOA JUNIOR, ADALBERTO; MONTEIRO, G. ET AL. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial.** 1. ed. São Paulo: [s.n.].

YAHYA, SAIRA; MUHAMMAD, FAIZ; SOHAIL, MUHAMMAD; KHAN, S. A. Amylase production and growth pattern of two indigenously isolated aspergilli under submerged fermentation: Influence of physico-chemical parameters. **Pakistan Journal of Botany**, v. 53, n. 3, p. 1147–1155, 2021.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6279–6298, 2018.

YI, Y. L.; PARK, Z. D. b -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 : cloning , purification , and properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 865–873, 2013.

ZANUTTO, A.; SILVA, B. C. DA. **Avaliação do Bagaço de Malte como Biossorbente do corante amarelo Reafix B2R.** [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos apresentados nesse trabalho obtiveram as seguintes conclusões:

- I. Este trabalho demonstrou a valorização dos substratos agroindustriais atendendo aos requisitos da sustentabilidade transformando o descarte (bagaço de malte) em matéria - prima para a produção de amilase;
- II. As cepas de *Aspergillus spp.* 1 (UCP1275) e 2 (UCP UCP 6119) se destacaram na capacidade em biosintetizar a amilase através do processo de fermentação submersa;
- III. A composição nutricional do bagaço de malte apresentou resultados consistentes e totalmente alinhados as necessidades nutricionais do *Aspergillus spp.*, com este substrato foi possível realizar a seleção das cepas;
- IV. O planejamento experimental fatorial foi fundamental para demonstrar a significância das variáveis independentes investigadas, relacionadas a variável de resposta atividade enzimática;
- V. As ferramentas estatísticas foram determinantes para garantir a representatividade dos dados encontrados.

CAPÍTULO IV

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudos envolvendo o planejamento experimental por delineamento do composto central rotacional, serão aplicados para otimizar a produção máxima obtida da atividade enzimática;
- Novos ensaios serão realizados de forma a comparar os resultados da fermentação submersa com fermentação em estado sólido, de forma a se obter a melhor condição de produção de amilase;
- Serão investigados a produção de amilase através de outros resíduos agroindustriais com a cepa selecionada neste estudo;
- Serão investigados com o bagaço de malte, a produção de outras enzimas com as cepas utilizadas neste estudo;
- A cinética de produção de amilase será mais amplamente estudada para analisar a variação do biocomposto ao longo do tempo de fermentação;
- Serão realizados ensaios de estabilidade de produção da amilase, visando o aumento de escala de produção.