

PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS POR *Aspergillus niger* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE

RENAN CARLOS FREITAS DE LIMA¹; IARA REBOUÇAS PINHEIRO^{2*}

¹Graduando em Engenharia Química. CCAE, UFES, Alegre-ES, renandelima02@gmail.com;

²Dr^a em Engenharia Química, Prof^a CCAE, UFES, Alegre-ES, iararp.ufes@gmail.com

Apresentado no
Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC'2018
21 a 24 de agosto de 2018 – Maceió-AL, Brasil

RESUMO: Este trabalho objetivou realizar a produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus niger*. A fim de caracterizar o material foram realizadas as análises de teor de umidade, fibras, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos. Para a fermentação em estado sólido, em frascos de erlenmeyers, realizou-se um estudo através do planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR), afim de, determinar as melhores condições de maximização da atividade enzimática com variações nos fatores: umidade (50 a 70%), o tempo de fermentação (48 a 168 horas) e a porcentagem de substrato (30 a 70%). Os valores de maximização para este estudo foram de 1,6818 para x1, 1,3454 para x2 e 1,6818 para x3 que corresponde à 70% de umidade, 156 horas e 70% de substrato, obtendo o valor máximo de 1380,91 U/MS, através da otimização em superfície de resposta.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação em estado sólido, amilases, *Aspergillus niger*, bagaço de malte.

PRODUCTION OF AMYLOLYTIC ENZYMES BY *Aspergillus niger* IN SOLID-STATE FERMENTATION USING BARLEY MALT BAGASSE.

ABSTRACT: This work aimed to produce the amylolytic enzymes through solid state fermentation, using *Aspergillus niger* fungus. The analyzes of moisture, fiber, proteins, lipids, ashes and carbohydrates were realized in order to characterize the material. For the solid-state fermentation, in flasks of erlenmeyers, a study was carried out through the experimental design of the central rotational compound (DCCR), in order to determine the best conditions to maximize the enzymatic activity with variations in the factors: humidity (50 to 70%), the fermentation time (48 to 168 hours) and the substrate percentage (30 to 70%). The maximization values for this study were 1.6818 for x1, 1.3454 for x2 and 1.6818 for x3 which corresponds to 70% of humidity, 156 hours and 70% of substrate, obtaining the maximum value of 1380.91 U / MS, through response surface optimization.

KEY WORDS: Solid-state fermentation, amylases, *Aspergillus niger*, malt bagasse.

INTRODUÇÃO

A partir do século XX, com as leis de legislação ambiental e fiscalização mais severas, as grandes empresas agroindustriais estão tomando ciência da importância do descarte consciente e responsável de seus resíduos (SANTAELLA *et al.*, 2014). Uma das alternativas para o correto descarte dos resíduos é o reaproveitamento destes para obtenção de novos produtos. Casca de café, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de mandioca e bagaço de malte de cevada, são exemplos de subprodutos, de baixo valor comercial, que têm grande potencial para reutilização como insumos na produção de energia e produtos de interesses.

A indústria cervejeira no Brasil cresce a cada ano e se destaca no cenário mundial. Segundo Marcusso e Miller (2017), o Brasil nos últimos anos vem desenvolvendo um enorme papel dentre os maiores produtores de cerveja global, chegando, em 2016, na marca de 138 milhões de hectolitros e se

tornando o terceiro maior produtor mundial. A produção de resíduo na indústria cervejeira é alta, atingindo cerca de 1/5 na proporção de quilo de bagaço de malte por litro de cerveja produzido (MUSSATTO; ROBERTO, 2016), tornando-o, assim, um rejeito atrativo para estudo.

Segundo Pandey (1991), o termo fermentação em estado sólido (FES) é caracterizado pela fermentação de microrganismos sobre ou dentro de partículas de uma matriz sólida, tendo condições de umidade necessária para que ocorra o desenvolvimento e crescimento celular no meio fermentativo. Destaca-se na FES, do ponto de vista industrial, a possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de baixo custo, como substratos para geração de produtos de maior valor agregado (RAIMBOUT, 1998; SANTOS, 2007; MACIEL, 2006).

As enzimas são produtos da FES e por sua vez são amplamente aplicadas na indústria. As enzimas amilolíticas hidrolisam o amido em cadeias menores de glicoses e são aplicadas em processos industriais como na indústria têxtil, indústria de papel, alimentos, bebidas entre outros. Com a finalidade de baratear os processos e resolver os problemas ambientais de legislação, esse tipo de enzima está cada vez mais substituindo reagentes químicos nocivos, que causam tantos problemas ambientais e danos aos equipamentos industriais.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de malte para produção de amilases por *Aspergillus niger*.

MATERIAL E MÉTODOS

• Substrato e suporte

O bagaço de malte foi obtido a partir de cervejeiros artesanais da cidade de Alegre – ES. Foi congelado e armazenado a -18°C . O preparo a FES foi realizado por secagem à 60°C durante 24 horas e o resíduo seco foi triturado, peneirado (12 mesh) e armazenado em recipiente fechado à temperatura ambiente. Caracterizou-se o bagaço de malte conforme sua composição centesimal (fibra, proteína, carboidrato, lipídio, cinzas e umidade) de acordo com as técnicas apresentadas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

O suporte utilizado na fermentação foi o bagaço de cana, cedido pela Usina Paineiras (Itapemirim-ES). Este foi triturado e peneirado para ajuste da granulometria em 10 mesh.

• Microrganismo

O fungo empregado foi o *Aspergillus niger*, isolado pelo Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Doenças e Pragas (NUDEMAFI), da UFES. Foi preservado em meio sólido composto de em bagaço de malte e bagaço de cana-de-açúcar.

• Fermentação em estado sólido

Inicialmente pesou-se as proporções pré-definidas de substrato (bagaço de malte) e suporte (bagaço de cana-de-açúcar) totalizando 10 gramas. Adicionou-se, então, os nutrientes necessários e autoclavou por 20 minutos à 120°C . Os frascos foram então inoculados com a adição de 10^7 esporos/grama de substrato. Manteve-se o meio fermentativo em estufa controlada a 30°C .

• Análise do substrato fermentado

Após as fermentações concluídas, foi retirado 1 grama de amostra para análise de umidade na balança de análise de umidade MOC63u. Em seguida realizou-se a etapa de extração das enzimas do meio sólido fermentado. Retirou-se uma amostra de 2 gramas e foi adicionado 40mL de tampão acetato pH 5,0 numa proporção de 1:20. A suspensão ficou em agitação por 60 minutos. O extrato foi centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade enzimática. A atividade de α -amilase foi determinada através da liberação de açúcares redutores (ART), dosados pelo método DNS (MILLER, 1959).

• Planejamento experimental

Foi realizado um DCCR com 3 fatores (x_1 , x_2 e x_3). Este planejamento foi utilizado para selecionar o ponto ótimo de produção de enzimas amilolíticas e gerar um modelo quadrático completo que descreva o processo, seguindo a Tabela 1. Para o estudo, nomeou-se os fatores: x_1 = umidade; x_2 = tempo; x_3 = porcentagem de substrato.

Tabela 1. Matriz do Planejamento experimental DCCR com os valores codificados e decodificados para os fatores x₁, x₂ e x₃.

Experimento	x ₁	x ₂	x ₃
1	54 (-1)	72 (-1)	38 (-1)
2	66 (1)	72 (-1)	38 (-1)
3	54 (-1)	144 (1)	38 (-1)
4	66 (1)	144 (1)	38 (-1)
5	54 (-1)	72 (-1)	62 (1)
6	66 (1)	72 (-1)	62 (1)
7	54 (-1)	144 (1)	62 (1)
8	66 (1)	144 (1)	62 (1)
9	50 (-1,6818)	108 (0)	50 (-1)
10	70 (1,6818)	108 (0)	50 (-1)
11	60 (0)	48 (-1,6818)	50 (0)
12	60 (0)	168 (1,6818)	50 (0)
13	60 (0)	108 (0)	30(-1,6818)
14	60 (0)	108 (0)	70 (1,6818)
15	60 (0)	108 (0)	50 (0)
16	60 (0)	108 (0)	50 (0)
17	60 (0)	108 (0)	50 (0)
18	60 (0)	108 (0)	50 (0)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **A análise da composição centesimal do bagaço de malte:**

Tabela 2. Composição química do bagaço de malte

Componente (%)	Presente estudo	Cordeiro, El-Aouar, Gusmão	Wilhelmsso, Lehtinen, Weyman	Mussatto e Roberto	Carvalho <i>et al.</i>	Meneses <i>et al.</i>
Carboidratos	65,78 ± 0,97	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
Celulose	N.D*	N.D*	16,8 – 25,4	16,78	21,9	21,7
Hemicelulose	N.D*	N.D*	21,8 – 28,4	28,42	29,6	19,2
Lignina	N.D*	N.D*	11,9 – 27,8	27,78	21,7	19,4
Cinzas	2,26 ± 0,01	1,31	2,4 – 4,6	4,6	1,2	4,2
Fibras	4,79 ± 0,15	4,15	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
Lipídeos	4,37 ± 0,89	2,49	3,9 – 10,6	5,82	N.D*	10,7
Proteína	16,13 ± 0,15	5,67	15,2 – 24,2	15,25	24,6	24,7
Grupo acetil	N.D*	N.D*	N.D*	1,35	1,2	N.D*
Umidade	6,66 ± 0,32	75,45**	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*

*N.D – não determinado. **A umidade foi obtida com o bagaço úmido.

Os valores determinados para o bagaço de malte apresentam resultados coerentes segundo os apresentados na literatura. Destaca-se, na composição centesimal, o alto valor de carboidratos presentes no bagaço de malte, uma vez que esses cereais são ricos em amidos, que no processo cervejeiro são convertidos em moléculas de glicose, o que se torna condizente com os valores encontrados para esse resíduo. Outro ponto em destaque é o valor de proteína que se encontrou realçado na composição centesimal. Esse valor está associado ao teor de proteína presente no cereal e nas enzimas α e β -amilases liberadas no processo de moagem do grão.

- **Análise do Planejamento experimental:**

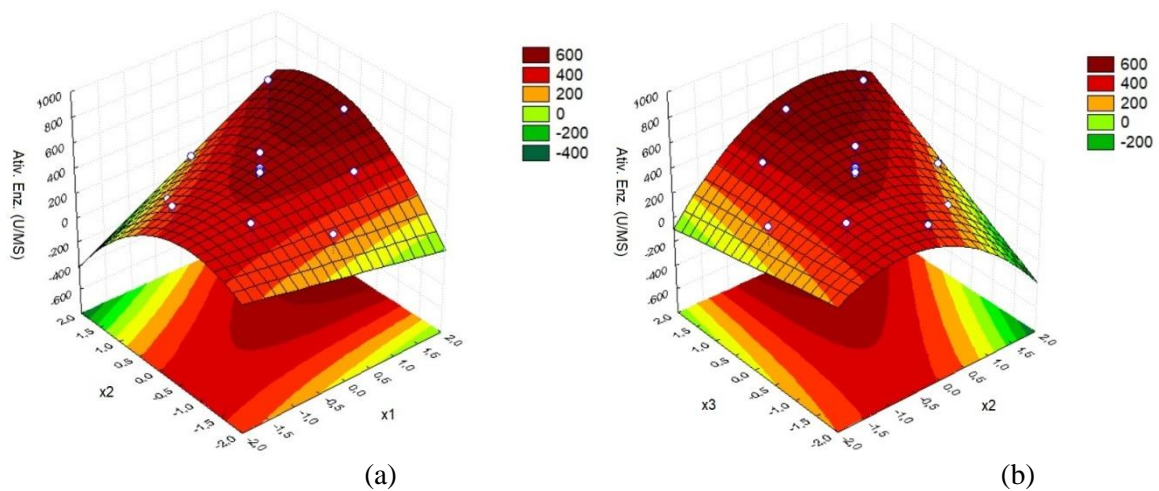
Os efeitos das variáveis independentes e das suas interações na formação do produto podem ser visualizados através da análise de superfície de resposta, conforme as Figuras 1a e 1b.

A atividade enzimática máxima de 1380,91 U/MS foi encontrada pelo modelo da superfície de resposta (Equação 1), obtendo-se os valores correspondente a 70% de umidade, 156 horas, e 70% de porcentagem de substrato. Os valores encontrados estão de acordo com a superfície de resposta, como

se observa na Figura 1a, a atividade enzimática máxima parece estar situada em torno do valor de 1,5 em x1 e na faixa entre 1,5 e 1,0 para x2.. A figura 1b apresenta a interação entre x2 e x3, indicando a atividade enzimática máxima no máximo de x3 e a faixa entre 1,0 e 0 para x2.

Esses resultados são os valores máximos para a região estudada, porém não o valor ótimo para essa FES. A região deverá ser estudada com mais precisão, aumentando os valores de umidade e porcentagem de substrato, para avaliação da nova região em estudo e, assim, obter o valor ótimo de produção de amilases.

Figura 1a e 1b. Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática como função das variáveis umidade- x1 e tempo-x2 (a); tempo -x2 e porcentagem de substrato -x3 (b)

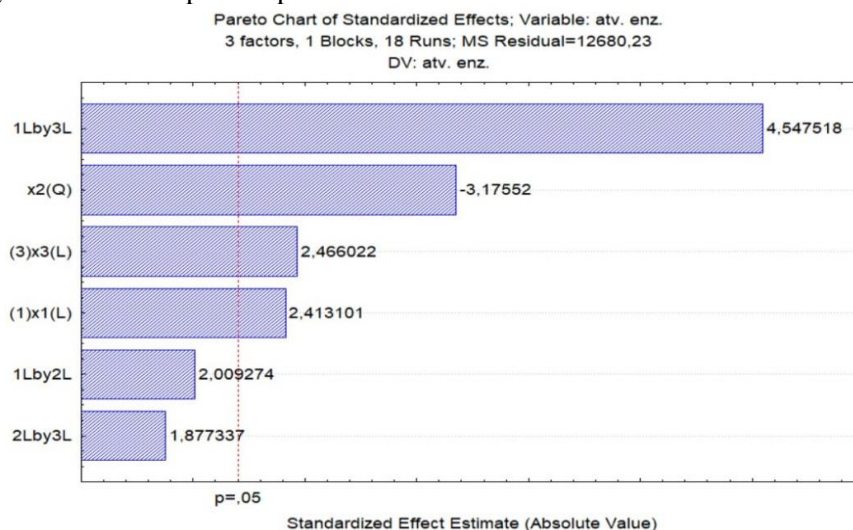


Foram estimados os parâmetros do modelo de superfície de resposta, ajustada conforme a Equação 1.

$$\hat{Y} = 443,95 + 73,53x_1 - 96,83x_2^2 + 75,14x_3 + 79,99x_1x_2 + 181,05x_1x_3 + 74,74x_2x_3 \quad (1)$$

Percebeu-se um bom ajuste do modelo através do $R^2=0,83$, uma vez que valores acima de 0,8 são aceitáveis para esse tipo de processo, pois existe uma aleatoriedade na FES e o difícil controle dos parâmetros operacionais.

Figura 4. Diagrama de Pareto para os parâmetros do modelo.



A significância dos parâmetros do modelo pode ser observada no diagrama de Pareto (Figura 2). Um estudo sobre a significância do modelo foi realizado pelo teste F da Anova, mostrando coerência na predição do modelo ao nível de 5% (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela Anova ao nível de 5% de significância.

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F _{cal} *	F _{tab}
Reg.	6	636925,1	106154,2	9,89*	2,92
Res.	13	139482,6	10729,43		
F.A	8	138330,5	17291,3	45,02*	4,82
Erro Puro	3	1152,1	384		
Total	19	776407,7			

* Significativo (p<0,05).

CONCLUSÃO

O bagaço de malte de cevada é um substrato promissor para o crescimento de microrganismos, uma vez que tem altas concentrações de carboidratos.

A partir dos dados obtidos e da análise do planejamento experimental obteve-se a melhor condição de produção para α -amilases: 70% de umidade, tempo de 156 horas e 70 % de proporção de substrato/suporte, com atividade enzimática máxima de 1380,91 U/MS.

REFERÊNCIAS

- CARVALHEIRO F.; ESTEVES, M. P.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol*, v 91, p.93-100, 2004.
- CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v 7, n 3, p. 20-22, 2012.
- MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de Xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
- MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. **A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>. Acesso em: 19 março 2018.
- MENESES, N. G. T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separ Purif Technol*, v 108, p. 152-158, 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, 1959, 426p
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v 81, p. 268-274, 2006.
- PANDEY, A. Aspects of Fermenter Design for Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*. v. 26, p. 335-361, 1991.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v 1, n 3, p. 1-15, 1998.
- SANTAELLA, S. T.; BRITO, A. E. R. M.; COSTA, F. A. P.; CASTILHO, N. M.; MIO, G. P.; FILHO, E. F.; LEITÃO, R. C.; SALEK, J. M. **Resíduos Sólidos e a Atual Política Ambiental Brasileira**. Fortaleza: UFC / LABOMAR / NAVE, 2014, 232p.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. Teste (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal, RN.