UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – DCT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE JEQUIÉ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROMÁRIO ALVES SANTANA

Aplicações de Lipase obtida de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o Bagaço de Malte de Cevada como Substrato: Produção de compostos fenólicos antioxidantes e síntese de ésteres de aroma

Jequié – BA

Dezembro de 2019

ROMÁRIO ALVES SANTANA

Aplicações de Lipase obtida de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o Bagaço de Malte de Cevada como Substrato: Produção de compostos fenólicos antioxidantes e síntese de ésteres de aroma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Gildomar Valasques Junior

Jequié – Ba

Dezembro de 2019

S232a Santana, Romário Alves.

Aplicações de Lipase obtida de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o bagaço de malte de cevada como substrato: produção de compostos fenólicos antioxidantes e síntese de ésteres de aroma / Romário Alves Santana.- Jequié, 2019.

87f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior e coorientação do Prof. Dr. Gildomar Valasques Junior)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

ROMÁRIO ALVES SANTANA

"Aplicações de Lipase obtida de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o Bagaço de Malte de cevada como Substrato: Produção de Compostos Fenólicos Antioxidantes e Síntese de Ésteres de Aromas"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior - Orientador
(UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, 2008)

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior - Coorientador
(UEFS, Feira de Santana - BA, 2014)

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira
(UFBA, Salvador – BA, 2014)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(UFMG, Minas Gerais- MG, 2012)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 13 / 12 / 2019

Ao meu bondoso Deus, meu criador, que tanto me segurou nessas horas difíceis, me amou e que tantas vezes fui ingrato e esqueci de agradecer.

A minha família, namorada, amigos e todos aqueles que me apoiaram e acreditaram em mim.

A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade"

Nikola Tesla

AGRADECIMENTOS

Em primeiros lugar a Deus por me dar o ar da vida, por me segurar em todos os momentos que eu não acreditei em mim mesmo, que pensei em desistir. Por me levantar todas as vezes, para continuar tentando.

A meus pais por sempre estarei ao meu lado mesmo distantes, por acreditarem em mim, confiarem e sempre estarem me apoiando.

A minha namorada Sâmela por sempre estar ao meu lado, acreditando em mim, me apoiando e sempre me incentivando.

A todos os amigos que eu fiz nessa jornada, sejam no laboratório, como Gleiza, Pamala, Tátilla, Gabriel, dentre outros.

A minha IC Maisla, que me ajudou e deu suporte na produção deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte do meu processo de formação.

A professora coordenadora do laboratório Maira.

Ao meu orientador Prof. Dr. Baraquizio que aceitou me orientar neste trabalho, por todo suporte e apoio.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Gildomar por todos os ensinamentos, suporte e apoio.

A UESB, e ao Programa de Pós-graduação em Química.

A CAPES pela ajuda financeira.

Aos membros da banca

RESUMO

O bagaço de malte é quantitativamente o principal resíduo agroindustrial do processo cervejeiro, sendo gerado em torno de 391,6 mil toneladas de malte até agosto de 2019. A produção de bagaço é 32% a mais do que a quantidade de cevada inicial. Este trabalho busca investigar a eficiência destes resíduos como fonte de nutrientes para microrganismo *Aspergillus niger* ATCC 1004 na produção de lipase e compostos fenólicos. O *Aspergillus niger* foi utilizado por conta de sua robustez em comparação com outros gêneros. Os resultados demonstram que este resíduo quando inoculado pelo fungo filamentoso, se demonstra um excelente fonte de carbono e nutrientes e um alto potencial para meio de cultura não necessitando de suplementos para a fermentação. Além da presença de vários metabólicos secundários do fungo filamentoso, como os fenólicos que possuem uma alta taxa de atividade antioxidante, obteve-se enzimas com destaque para a lipase como metabólico majoritário no extrato enzimático. Aplicou-se um delineamento experimental do tipo Doehrlet na produção da lipase e compostos fenólicos. A lipase foi purificada por meio de coluna cromatográfica de Sephadex G-100 e posteriormente caracterizada. Testando seu pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, parâmetros cinéticos e por fim esta foi imobilizada com alginato de cálcio e aplicada na produção de ésteres.

Palavras-chaves: *Aspergillus*, lipase, resíduo cervejeiro.

SUMÁRIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA 1

CAPITULO 1- Produção de biocompostos pelo gênero *Aspergillus* utilizando resíduos agroindustriais 15

Resumo 15

1.1Resíduos agroindustriais 15

1.2 *Aspergillus niger* 17

1.3 Fermentação em Estado Sólido 19

1.4 Substâncias Fenólicas 21

1.5 Enzimas 23

1.6 Lipases 25

1.7 Metodologias de Superfície de Resposta 27

1.8 Referências 28

CAPÍTULO 2- Potenciais Atividades do Bagaço de Malte Fermentado com *Aspergillus niger* ATCC 1004: Fenólicos totais, atividade antioxidante e avaliação de citotóxidade. 39

Resumo 39

2.1 INTRODUÇÃO 39

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 41

2.2.1 Preparo de amostras 42

2.2.2 Planejamento de Misturas 42

2.2.3 Condição ótima de extração dos fenólicos totais 42

2.2.4 Fermentação em estado sólido 42

2.2.4.1. Perfil da fermentação 43

2.2.4.2. Planejamento experimental Doehlert e análise estatística para a fermentação em estado sólido 43

2.2.5 Determinação de fenólicos totais 44

2.2.6. Determinação da atividade antioxidante 44

2.2.7 Determinação da Atividade Citotóxica 45

2.2.7.1 Produtos Testados 45

2.2.7.2 Eritrócitos humanos 45

2.2.7.3 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos 45

2.2.7.4 Análise estatística 46

2.3. Resultados e discussão 46

2.3.1 Aplicação de designer experimental para a extração de fenólicos totais 46

2.3.1.1 Planejamento de mistura centroide-simplex 46

2.3.2 Planejamento Doehrlet de três níveis para as condições ótimas de extração . 48
2.3.3 Efeito da fermentação em estado sólido no teor de fenólicos totais de bagaço de malte 52
2.3.4 Atividade antioxidante dos fenólicos totais 54
2.3.5 Determinação da Atividade Citotóxica 57
2.4. Conclusão 58
2.5. Referências 58
CAPÍTULO 3- Produção, caracterização físico-química de lipase extracelular de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o Bagaço de Malte como substrato e sua aplicação na síntese de ésteres de aroma 66
Resumo 66
3.1. INTRODUÇÃO 66
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 67
3.2.1 Substrato 67
3.2.2 Micro-organismo e inoculo 67
3.2.3 Fermentação em estado sólido (FES) 68
3.2.4 Planejamento experimental Doehlert para a otimização das condições de produção da lipase fúngica 69
3.2.5 Determinação das atividades das lipases 69
3.2.6 Determinação da concentração de proteína 70
3.2.7 Purificação da lipase 70
3.2.7.1 Passo 1: precipitação com sulfato de amonia 70
3.2.7.2 Passo 2: cromatografia de Sephadex G-100 70
3.2.8 Temperatura e pH ótimos 70
3.2.9 Influência De Sais 71
3.2.10 Termoestabilidade 71
3.2.11 Km e Vmax 71
3.2.12 Imobilização da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004 71
3.2.12.2 Reticulação da lipase em glutaradeído 72
3.2.12.3 Eficiência da imobilização 72
3.2.13 Aplicação da lipase purificada 72
3.3. Resultados e discussão 73
3.3.1. Condições ótimas de fermentação 73
3.3.2. Purificação da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004 76
3.3.3. pH e temperatura ótimas 77
3.3.4. Termoestabilidade 79

3.3.5. Influência de íons 80
3.3.6. Parâmetros cinéticos da lipase purificada 81
3.3.7. Imobilização da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004..... 82
3.4. Conclusão..... 84
3.5. Referências..... 84

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1-*Aspergillus niger*ATCC 1004.....17

Figura 2- Exemplo de compostos fenólicos.....21

Capítulo 2

Figura 1- Influência das variáveis expressa no gráfico de Pareto.....46

Figura 2 - Superfície de resposta temperatura versus velocidade de agitação.....48

Figura 3- Gráfico de Pareto para otimização da extração dos fenólicos totais.....49

Figura 4- Superfície de resposta temperatura versus tempo de fermentação.....51

Figura 5 – Gráfico de Pareto para a fermentação do bagaço de malte.....52

Figura 6-Atividade citotóxica do extrato de bagaço de malte fermentado por *Aspergillus niger* ATCC 1004.....55

Capítulo 3

Figura 1- Superfície de resposta esporos versus tempo.....72

Figura 2- Superfície de resposta de pH e temperatura ótimos da lipase.....76

Figura 3- Termoestabilidade da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.....78

Figura 4- Influência de íons metálicos na atividade da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.....76

Figura 5- Curva de Lineweaver-Burk para parâmetros cinéticos.....80

Figura 6- Análise da esterificação do acetato de isoamila e acetato de butila em função do tempo.....81

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Planejamento de misturas aplicado na extração de fenólicos totais..... 44

Tabela 2- ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do conteúdo de fenólicos totais do resíduo de cervejaria.....45

Tabela 3- Planejamento experimental Doehrlent para determinação das condições ótimas de extração de compostos fenólicos totais.....47

Tabela 4-Planejamento Doehlert para as condições ótimas de fermentação.....50

Tabela 5- Atividade antioxidante por ABTS e DPPH.....53

Capítulo 3

Tabela 1- Planejamento experimental para a otimização da produção de lipases por *Aspergillus niger* ATCC1004.....72

Tabela 2- ANOVA para otimização da produção da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.....73

Tabela 3 – Purificação da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.....74

Tabela 4- pH e temperatura ótimos da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS-(2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonicacid) diammoninumsalt)

CAZymes - Carbohydrate-Active Enzymes (Banco de dados de enzimas ativas para carboidratos)

DPPH-2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EPP- Extractable polyphenols (Polifenóis extraíveis)

FES- Fermentação em estado sólido

GRAS- Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)

K_m- Constante de Michaelis

MSR- Metodologia de superfície de resposta

NEPP- Non Extractable Polyphenols (Polifenóis não extraíveis)

p-NPP – Paranitrofenol

Rpm – Rotação por minuto

R^2 – Coeficiente de Determinação

Trolox- (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico)

VCEAC- Ácido ascórbico

V_{max} – Velocidade máxima de reação

CAPITULO 1- Produção de biocompostos pelo gênero *Aspergillus* utilizando resíduos agroindustriais

Resumo

Este capitulo traz uma revisão de compostos sintetizados por micro-organismos com foco na fermentação em estado sólido. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é amplamente empregado em processos fermentativos, pois traz vantagens, tais como: menor tempo de produção de enzimas, alta produção de fenólicos e fármacos, dentre outros, além de sua alta resistência a temperatura e contaminações, tendo em vista o aproveitamento dos macronutrientes e micronutrientes oriundo dos resíduos agroindústrias como substrato para a produção de compostos fenólicos e enzimas. O bagaço de malte é um dos resíduos agroindústrias que apresentam diversos usos, porém são muito mal aproveitados, sendo o produto majoritário no processo de fabricação da cerveja. A produção de lipases é um dos principais produtos da fermentação dos fungos do gênero *Aspergillus*, essa enzima microbiana apresenta diversas vantagens sobre outras obtidas de diferentes fontes, tais como sua cinética, termoestabilidade, dentre outros fatores.

Palavras chaves: *Aspergillus niger*, resíduos de cervejaria, lipase, metabólicos.

1.1 **Resíduos agroindustriais**

A indústria de alimentos e bebidas é um importante setor em diversos países, com um peso significativo em termos de emprego e produto interno bruto. Junto com sua importância econômica surge os impactos ambientais gerados pelos resíduos durante os processos de produção. Entre eles está o uso e a poluição da água, o consumo de energia, surgindo a eminente preocupação com a gestão e minimização recursos e impactos ambientais. Em particular, o setor de bebidas alcoólicas possui uma grande produção mundial, na qual são geradas altas quantidades de resíduos (águas residuais, lúpulo excedente, torta de filtro, matérias-primas usadas, etc.). Esses resíduos precisam ser tratados para evitar aterros ou manuseio incorreto que possa resultar em maiores emissões de gases de efeito estufa e outras formas de poluição, como obstrução dos poros do solo.

Devido à grande variedade de produtos disponíveis e à complexidade dos resíduos gerados, existem muitas técnicas de processamento usadas atualmente para tratar estes resíduos. Os processos mais simples e conhecidos são a compostagem, alimentação de gado ou processos biológicos para o tratamento destes resíduos gerados no setor de alimentos e bebidas (De Diego-Díaz et al., 2018; Garcia-Garcia et al., 2018).

Resíduos agrícolas são ricos em diversos macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos, tais como os substâncias fenólicas, que não são aproveitados durante os processos industriais. Esses resíduos podem ser usados como fonte alternativa para a produção de diferentes produtos como biogás, biocombustível, cogumelo e o super alimento vegano tempeh, além de serem usados como matéria-prima em várias pesquisas e indústrias. O uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima pode ajudar a reduzir o custo de produção e também reduzir a carga poluidora do meio ambiente. Por meio dos processos fermentativos, como a fermentação em estado sólido (FES), os resíduos agroindustriais são usados na fabricação de biocombustíveis, enzimas, vitaminas, antioxidantes, ração animal, antibióticos e outros produtos químicos. Uma variedade de micro-organismos é usada para a produção desses valiosos produtos através de processos FES (Sadh et al., 2018). Dentre os resíduos agroindustriais temos os cereais que apresentam alto valor proteico, destacando-se no uso da fermentação em estado sólido, podendo ser aplicado na produção de uma gama de produtos, um exemplo disso é o milho amplamente utilizado na produção de diversos produtos químicos (Gladis et al., 2015).

As indústrias cervejeiras produzem milhões de toneladas de resíduos, o que representa uma questão de gestão do ponto de vista ecológico e econômico. O acúmulo de enormes quantidades dessa biomassa a cada ano leva à degradação ambiental e, principalmente, à perda significativa de material valioso que poderia ser explorado como alimento, combustíveis e uma grande variedade de aditivos. A valorização dos subprodutos da fermentação pode ser alcançada por meio da extração de componentes de alto valor, como proteínas, polissacarídeos, fibras, compostos de sabor e fitoquímicos, que podem ser reutilizados como ingredientes nutricionalmente e farmacologicamente funcionais (Del Rio, et al., 2013; Socaci et al., 2017).

Entre os resíduos gerados pela indústria cervejeira estão o bagaço do malte oriundo do processo de mosturação, sendo o produto majoritário. (Rodrigues et al., 2019), o bagaço do malte ou polpa cervejeira tem mais aplicações do que os resíduos do lúpulo, devido a seu maior teor de macro e micro nutrientes, podendo ser empregado em substituição de gorduras de alimentação humana, aumentando o teor proteico do

alimento, atividade antioxidante, sem alterar os parâmetros sensoriais dos alimentos (Saraiva et al., 2019). Além de poder ser integrado na alimentação humana e animal, este se destaca devido a seu alto valor nutricional, sendo considerado uma rica fonte de fibras, proteínas e compostos fenólicos. Os ácidos fenólicos presentes nos resíduos do malte são os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico), que possuem muitas biofunções, como atividades antioxidante, anticarcinogênica, antiaterogênica e anti-inflamatória (Ikram et al., 2017).

O bagaço de malte é tão versátil em suas aplicações que pode ser utilizado como um biossorvente no processo de absorção de corantes em efluentes, sendo um promissor biossorvente (Junchen et al., 2018). Também pode ser utilizado em produção de materiais verdes devido as suas propriedades como baixa densidade aparente e maior absorção e porosidade de água, propriedades isolantes. Com base nessas características ele pode ser aplicado como isolante térmico, purificador de águas, dentre outros (Farias et al., 2017). Este estudo traz alguns dos principais compostos dos resíduos de cervejaria e sua aplicação na produção de novos compostos por meio de fermentação em estado sólido.

1.2 *Aspergillus niger*

Os fungos filamentosos são microrganismos multinucleados que conseguem viver em uma faixa de pH entre 1,5 e 11, variando de pHs ácidos a alcalinos. Apresentam características físicas pulverulentas, aveludadas ou algodonosas. Secretam vários compostos que compreendem um conjuntos altamente dinâmicos de proteínas, incluindo enzimas ativas com múltiplos carboidratos (CAZymes) que são capazes de hidrolizar polissacarídeos da biomassa vegetal em produtos de interesse biotecnológico, como açúcares fermentáveis. Nos últimos anos, a proteômica tem sido utilizada para identificar e quantificar polipeptídeos enzimáticos e não enzimáticos presentes em diversas espécies de fungos. Os fungos filamentosos realizam a degradação da biomassa através da produção de uma ampla gama de hidrolases, que quando secretadas degradam a celulose, xilana, galacto (gluco) manana, pectina e outros compostos presente na parede celular das plantas. Com essa ampla secreção de enzimas hidrolases, estes microrganismos ofereceram novas perspectivas para aplicações biotecnológicas (Cologna et al., 2018).

Os fungos são organismos hiperdiversos e se agrupam em comunidades complexas, caracterizadas por altos níveis de riqueza, rotatividade e endemismo de

espécies. No entanto, as origens e a manutenção de uma diversidade tão alta e o papel que os ambientes desempenham na adaptação dos fungos ainda não são bem estabelecidos devido a esses fatores (Branco, 2019). O gênero de fungos filamentosos *Aspergillus* compreende um grupo diversificado de espécies com base em caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, que afetam significativamente a biotecnologia por conta de sua robustez, resistência e diversidade em produção de compostos. Desta forma e amplamente utilizado na produção de alimentos, ambientes internos e saúde humana. O *Aspergillus* foi tradicionalmente associado a nove gêneros de teleomorfos, mas dados filogenéticos sugerem que, junto com gêneros como *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* e *Cristaspora*, o Aspergillus forma um clado monofilético estreitamente relacionado ao *Penicillium* (Samson et al., 2014).

Desde que Pier Antonio Micheli descreveu e publicou o gênero *Aspergillus* em Nova Plantarum Genera em 1729, o gênero atraiu um imenso interesse. O gênero atualmente contém mais de 340 espécies aceitas, e sua importância econômica e histórica faz com que permaneça no centro do palco em futuras discussões sobre nomenclatura e diversidade micológica (Abdel-Azeem et al. 2019).

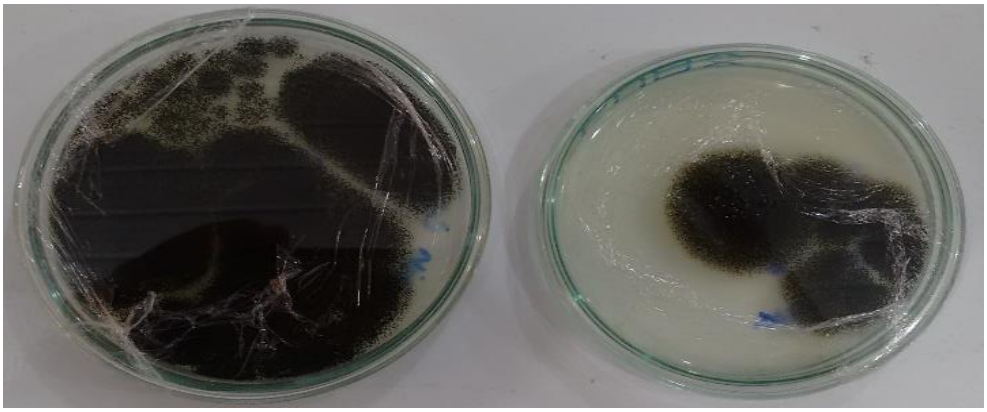
As diversas espécies de *Aspergillus* produzem diversos metabólicos, onde vários deles apresentam princípios ativos como as substâncias fenólicas que podem ser obtidos por meio de várias espécies de *Aspergillus*, dentre elas estão o *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus candidus*, estes fungos filamentosos podem melhorar as atividades destes compostos por meio de biotransformações, mudando suas estruturas (Li and Wang, 2017). Além de substâncias fenólicas estes produzem diversos ácidos, como o ácido itacônico produzido pelo *Aspergillus terreus* (Komáromy et al., 2019).

Na indústria alimentícia, um dos exemplos é a utilização do *A. oryzae* aplicado na fermentação da soja para a produção de seu molho. O *A. carbonariusé* é capaz de decompor o plástico por meio de uma membrana produzida a partir do mesmo (Isik et al., 2019). Do ponto de vista ambiental, pode ser um bioadsorvente útil para desintoxicar e descolorar as amostras de águas residuais (Uchida et al., 2018).

Outros metabólicos produzidos com grande demanda e interesse industrial são as enzimas, o gênero *Aspergillus* produz diversas enzimas tais como amilases, celulases, lipases, pectinases, dentre outras (Asrat e Gimar, 2018, Maftukhah and Abdullah, 2018, Mehta et al., 2018, Sandri e Da Silveira, 2018).

Dentro do gênero *Aspergillus* se destaca o *A. niger*, um fungo filamentoso descoberto pelo químico de alimentos James Currieem 1917 quando este constatou que qualquer cepa do fungo filamentoso *Aspergillus niger* produziria altas concentrações de ácido cítrico quando cultivada em meio de açúcar (Cairns et al., 2018). Figura 1 ilustra uma cepa do *Aspergillus niger* ATCC 1004 em duas forma diferentes, uma em crescimento e outra preenchendo completamente a placa de petri. Cem anos se passaram desde a descoberta do *Aspergillus niger*, durante esse tempo foi descoberto diversos outros metabólicos de interesse industrial, além do ácido cítrico, como metabólicos que possuem atividades anticâncer, atividade antioxidante, capazes de sequestrarem radicais livres, como os polifenólicos (Nadumane et al., 2016, Torres-Leona et al., 2019). Entre os metabólicos do *Aspergillus niger* os que mais se destacam são as enzimas por conta do seu potencial industrial, fácil e rápida obtenção, sendo obtidos por meio de diferentes meios de cultura, seja por fermentação em estado sólido ou submerso (Costa et al., 2017). Dentro das diversas enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* temos as amilases, celulases, glucoamilases, lipases, dentre outras como está expresso em seu genoma (Izmirlioglu e Demirci, 2015, Schäpeet al., 2018).

Figura 1- *Aspergillus niger ATCC 1004.*



Fonte: Autoral

1.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo trifásico heterogêneo, compreendendo fases sólidas, líquidas e gasosas, o que oferece potenciais benefícios para o cultivo microbiano e o desenvolvimento de bioprocessos e produtos (Thomas et al., 2013). Nas últimas duas décadas, a FES ganhou atenção significativa para o

desenvolvimento de bioprocessos industriais, particularmente devido à menor necessidade de energia associada ao maior rendimento do produto e menor produção de águas residuais com menor risco de contaminação bacteriana (Costa et al., 2018). Além disso, é ecologicamente saudável, pois utiliza principalmente resíduos sólidos agroindustriais como substrato (fonte de carbono). Os processos de FES têm um enorme potencial para muitas novas aplicações, usando a bioconversão de resíduos agroindustriais em biocombustíveis e outros produtos de alto valor agregado. A FES oferece benefícios potenciais em frentes econômicas e ambientais, com sustentabilidade (Manan e Webb, 2017). A fermentação em estado sólido pode produzir para a indústria alimentícia produtos com alto rendimento com a utilização de novos microrganismos (isolados ou recombinantes) como conservantes, agentes aromatizantes e corantes, bebidas e condimentos alimentícios, sem a necessidade de sínteses químicas, de maneira confiável (Rosales et al., 2018).

Uma população global em crescimento leva a uma demanda crescente por produção de alimentos e à indústria de processamento associada a ela, consequentemente, leva à geração de grandes quantidades de resíduos alimentares. Este problema é intensificado devido ao lento progresso no desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão de resíduos e medidas para o tratamento e eliminação adequados dos resíduos (Ravindran e Jaiswal, 2016). Atualmente, o setor agrícola está passando por uma expansão global, especialmente em relação às culturas utilizadas para a produção de energia, como estratégia para reduzir a dependência do petróleo e mitigar os efeitos das mudanças climáticas (Farinas 2015). Consequentemente para a valorização desses resíduos surge a fermentação em estado sólido como forma eficaz de produção de metabólicos comercialmente importantes, este processo nos fornece enzimas fúngicas extracelulares, além de diversos outros produtos por meio da FES, como o ácido cítrico, polifenólicos, dentre outros metabólicos de interesse industrial, destacando a produção de enzimas pois estas tem uma ampla aplicação industrial (Haile e Kang, 2019; Ozcirak e Ozturk et al., 2017; Pathania et al., 2018).

A produção de enzimas por micro-organismos, com a utilização da fermentação em estado sólido surgi como uma forma de estimular de forma agressiva à demanda de se livrar dos resíduos agroindustriais e fortalecer o consumo de recursos renováveis por meio da biotecnologia. Embora técnicas bem desenvolvidas para a produção de enzimas por fermentação submersa tenham sido encontradas com grande sucesso nos setores industriais; fermentação em estado sólido ajuda a superar as questões de custo de

produção e alto rendimento. Além disso, a disponibilidade do substrato com uma taxa muito econômica pode compensar as despesas econômicas gerais que promovem a aplicação da fermentação em estado sólido no nível industrial (Coradi et al., 2012, Koyania e Rajput. 2015).

Embora o FES ofereça certas vantagens exclusivas, também sofre de algumas desvantagens. Como o controle de pH, transferência de oxigênio, transferência de massa e calor, substrato e gradientes de umidade. Durante o processo fermentativo pode haver distribuição desigual da massa celular, nutrientes, temperatura, pH, umidade. Bem como a aeração constante em todo o substrato é difícil, pois o calor derivado do metabolismo e crescimento do micro-organismo aumenta a temperatura do substrato sólido e causa perda de umidade ou geração de substrato aquoso no meio de cultura, dentre outros. Porém a FES traz um ambiente com pouca água, próximo ao do natural do fungo, assim como a taxa de metabólicos produzidos é maior em comparação com a fermentação submersa, trazendo como vantagem um melhor crescimento e adaptação ao meio, que leva a uma maior produção de enzimas, substâncias fenólicas, dentre outros compostos (Dorya, et al., 2016, Manan e Webb 2017). A fermentação em estado sólido possui um alto potencial em comparação com os métodos de fermentação submersa para a utilização de resíduos oriundos da agroindústria para a produção de enzimas. Isso ocorre porque a natureza físico-química de muitos substratos lignocelulósicos se presta naturalmente à cultura em fase sólida e, portanto, representa um meio de colher o potencial reconhecido desse método de fermentação (Ravidran et al., 2018).

1.4 Substâncias Fenólicas

As substâncias fenólicos são metabólicos secundários encontrados em plantas estando presentes em diferentes partes da mesma, tais como em seu caule, folhas ou frutos (Johari, and Khong, 2019, Shan, et al., 2019). Outros seres vivos também podem produzir fenólicos como metabólicos secundários, sendo o caso dos fungos filamentosos, que ao serem submetido a um processo de fermentação com algum substrato estes aumentam o conteúdo de fenólicos totais presentes no substrato (Dulf et al., 2016). Compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante. Segundo Xu et al., 2018 com a inoculação por meio de fungos, as propriedades antioxidantes de produtos fermentados mostraram que o conteúdo total de fenólicos variam com o tempo de fermentação, aumentando a capacidade de eliminação de radicais.

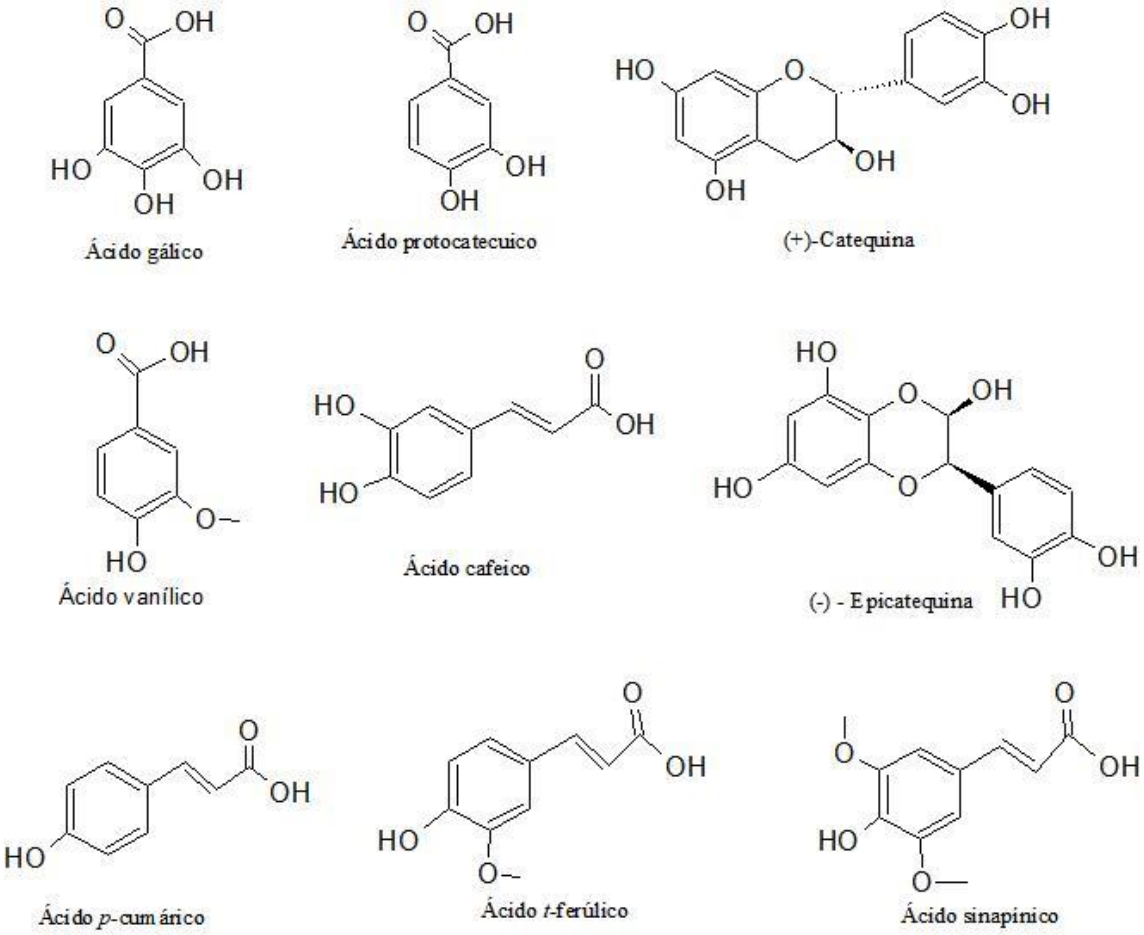
Demonstrado que as propriedades antioxidantes de todos os produtos são significativamente mais fortes que os não inoculados.

As substâncias fenólicas além da atividade antioxidante, apresentam importantes efeitos para a saúde humana, tendo efeito antibacteriano, anti-câncer, cardioprotetores, promoção do sistema imunológico e antiinflamatório, além de proteger a pele da radiação UV (Tungmunnithum, et al., 2018).

O teor de polifenol em alimentos vegetais é geralmente considerado como aquele encontrado em seus extratos aquosos-orgânicos correspondentes. No entanto, os polifenóis encontrados nesses extratos corresponderiam apenas a uma fração desses fitoquímicos, os polifenóis extraíveis (EPP). As extrações deixam um resíduo, comumente negligenciado, contendo uma fração não-utilizada de polifenóis vegetais, os chamados polifenóis não-extraíveis (NEPP)(Pérez-Jiménez et al., 2014). Deste modo vários resíduos agrícolas não aproveitados apresentam alto teor de fenólicos totais (Hernández-Hernández et al., 2018). Estes resíduos podem ser utilizados como substrato na fermentação, por conta de seu alto potencial para o aumento dos fenólicos totais (Wang et al., 2014).

Extratos de fenólicos totais são ingredientes atrativos para a indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, devido às suas propriedades biológicas benéficas, como atividades antioxidante, inibição de proteases dérmicas e atividade fotoprotetora (Zillich et al., 2015). Uma boa parte dos fenólicos totais apresentam uma alta afinidade com água, por isso no preparo dos extratos, utiliza-se de soluções de vários solventes contendo água, podendo ser entre eles etanol, vários outros métodos são utilizados para aumentar a extração dos fenólicos totais como o emprego de banho ultrassônico, afim de se aumentar a interação entre as moléculas de fenólicos totais e os solventes (Panić et al., 2019; Felix et al., 2018). A Figura 2 apresenta a estruturas de nove fenólicos encontrados em malte de cevada (Carvalho et al., 2015).

Figura 2- Compostos fenólicos da cevada maltada.



Autor: Autoral via ACD/ChemSketch

1.5 Enzimas

O potencial biocatalítico de micro-organismos tem sido empregado há séculos para produzir pão, vinho, vinagre e outros produtos comuns sem entender a base bioquímica de seus ingredientes**.** Enzimas microbianas ganharam interesse por seus usos difundidos em indústrias e na medicina devido à sua estabilidade, atividade catalítica e facilidade de produção, rentabilidade e otimização em relação as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais**.** O uso de enzimas em várias indústrias (por exemplo, alimentos, agricultura, produtos químicos e produtos farmacêuticos) está aumentando rapidamente devido à redução do tempo de processamento, baixo consumo de energia, custo-benefício, características não-tóxicas e ecológicas. Enzimas microbianas são capazes de degradar compostos químicos tóxicos de resíduos industriais e domésticos (tais como compostos fenólicos, nitrilos, aminas, etc)(Singh et al., 2016).

O uso de enzimas provenientes de micro-organismos em processos alimentícios é um processo antigo. Com o avanço da tecnologia, novas enzimas com ampla gama de aplicações e especificidades foram desenvolvidas, novas áreas de aplicação ainda estão sendo exploradas. Micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos tem suas enzimas amplamente utilizados em diversos processos da indústria alimentícia para melhorar características sensoriais e oferecem enormes benefícios econômicos para as indústrias. (Raveendran et al., 2018).

Enzimas obtidas de fungos filamentosos podem ser produzidas de forma rentável, através da utilização de resíduos agroindustriais. Apresentam a vantagem de produção mais rápida em relação a fontes animais e vegetais, como também a facilidade com que essas enzimas podem ser modificadas e o micélio pode ser facilmente removido por filtração. Tem uma ampla faixa de pH para aplicação, são termoestáveis, possuem um tempo menor de produção, tem uma alta atividade enzimática (Souza et al., 2015).

Enzimas fúngicas termofílicas são de crescente interesse em pesquisas, devido à sua relevância industrial. As termoenzimas fúngicas podem ser utilizadas em uma ampla gama de aplicações industrias, como o processamento de amido, produção de oligossacarídeos, padronização de farinha, fabricação de pão, fabricação de cerveja, processamento de suco de frutas e vegetais, fermentação de vinho e desenvolvimento de sabor, fermentação de chá, preparação de grãos de café e ração animal. Atualmente, a imobilização enzimática é usada para aumentar a eficiência catalítica, termoestabilidade e permitir a reciclagem de enzimas em processos contínuos (Waters et al., 2011).

Dentre as espécies fúngicas, o gênero *Aspergillus* e suas espécies se destacam na produção de um grande número de enzimas extracelulares industrialmente importantes como a-amilases, glucoamilases, lipases, celulases, pectinases, xilanases e outras hemicelulases e proteases. Amilases, xilanases e pectinases são utilizadas na indústria de alimentos, enquanto celulases, hemicelulases são usadas na indústria de papel e celulose. Todas as enzimas essenciais para a degradação da celulose são encontradas em Aspergillus e, portanto, podem ser muito úteis para a produção de biocombustíveis. Outras enzimas comercialmente importantes de Aspergillus são fitase, tanase, carbaril hidrolase, inulinase, lipase e glicose oxidase. Algumas destas enzimas foram usadas em biotransformação para sintetizar moléculas bioativas ou seus precursores (Abrão et al., 2017, Ravindran et al., 2018, Singh andBajaj 2017).

1.6 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, (E.C. 3.1.1.3)) são uma classe de enzimas dotadas de uma capacidade de catalisar a hidrólise de triglicéridos em glicerol e ácidos graxos livres. Lipases fúngicas são industrialmente significativas, devido à sua alta estabilidade frente a solventes orgânicos, temperaturas elevadas, pHs ácidos ou básicos, sua cinética, dentre outros fatores (Geoffry e Achur, 2018). Durante a clivagem de triacilgliceróis são liberados os ácidos graxos e glicerol, muito importantes para processos biológicos, como por exemplo o metabolismo rotineiro de triglicerídeos da dieta para sinalização celular e inflamação. As lipases constituem um grupo onipresente de enzimas capazes de catalisar várias reações diferentes, muitas delas de interesse industrial. Particularmente, as lipases microbianas exibem uma ampla gama de aplicações industriais, nomeadamente na indústria farmacêutica, alimentar e de detergentes (Pascoal et al., 2018).

Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Outra vantagem das lipases é a sua eficiência em reações que apresentam características especificas, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva, aminólise, regiosseletividade e enantiosseletividade, que permitem a síntese decompostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso decompostos químicos com alto potencial poluentes (Park et al., 2018; Pedro et al., 2018; Tiosso et al., 2014). Os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Zieniuk e Fabiszewska, 2018). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucorjavanicus*, *Rhizopusniveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti*, *P. sp* (Souza et al., 2015; Ferreira et al., 2017).

As lipases apresentam vários fatores que interferem de forma direta na sua cinética. Temperatura e pH são dois fatores que podem alterar a atividade das lipases de

forma direta, já que estas apresentam uma faixa ótima de temperatura e pH para seu funcionamento, quando saem dessa faixa, sofrem desestabilização em suas estruturas tridimensionais, de modo que as ligações de hidrogênio e interações iônicas importantes para a estabilização são rompidas, reduzindo sua atividade catalítica. Outros fatores que podem interferir em sua estabilidade são os íons metálicos que se ligam as suas estruturas de modo que aumentam ou diminuem a sua estabilidade, por meio do aumento das interações iônicas e ligações de hidrogênio em seu sitio catalítico, porém lipases não dependem de íons metálicos como cofatores enzimáticos, mesmo sem a presença de íons metálicos não afeta a sua atividade (Tang et al., 2019, Ishak et al., 2019). O íon metálico Ca^{2+} aumenta amplamente a atividade das lipases, pois estabiliza a sua estrutura tridimensional (Hertadi e Widhyastuti, 2015).

As lipases podem variar seus pesos moleculares, esse fato ocorre porque várias isoformas podem ser produzidas por uma mesma cepa, isso altera a sua estabilidade, efeitos semelhantes podem ser observados em diferentes gêneros e espécies. Um exemplo é o *Aspergillus terreus* que durante um processo fermentativo, produziu lipases com uma faixa de pesos moleculares entre 7 KDa a 175 KDa (Sethi et al., 2016).

As lipases têm ganhado cada vez mais destaque mundial devido à sua ampla aplicação em sínteses orgânicas, originando compostos de interesse industrial, devido a facilidade geral de seu manuseio, ampla tolerância ao substrato, alta estabilidade em relação a temperaturas e solventes de disponibilidade comercial. A maioria das reações sintéticas em escala industrial é realizada em solventes orgânicos devido à fácil solubilidade de compostos não polares. O efeito do sistema orgânico na sua estabilidade e atividade pode determinar o ritmo da biocatálise (Mendes et al., 2019).

As lipases microbianas têm atraído muito mais interesse de pesquisadores e indústrias do que as lipases de outras fontes, devido tanto às suas características específicas quanto à facilidade de produção em larga escala (Navvabi et al., 2018).Em comparação com plantas e animais, os microrganismos apresentam a vantagem de produzirem uma quantidade elevada de lipases. As lipases fúngicas destacam-se como as principais fontes da enzima devido à sua atividade catalítica, baixo custo de produção e relativa facilidade na manipulação genética (Mehta et al., 2017). As lipases microbianas podem apresentar diferentes faixas de temperaturas e pH ótimo, variando de acordo com o micro-organismo que a produza, estas enzimas modificam os substratos em diversas formas de acordo com as reações realizadas, pois cada uma delas pode ter afinidade a um diferente substrato,

variando a quantidade de carbonos do substrato, a estrutura do mesmo, dentre outros fatores (Jain &Naik et al., 2018, Qiao et al., 2016).

As condições de fermentação influência diretamente na produção de lipases microbianas, bem como o substrato. Adicionando óleos tem um melhoramento na produção de lipase em estado sólido, tendo em vista que quanto maior a porcentagem de ésteres de ácidos graxos, maior a produção de lipases, essas enzimas ainda contam com uma ampla faixa de temperatura de funcionamento podendo chegar de 30° C a 50° C (Tacin et al., 2018).

As lipases sofrem de diferentes efeitos sobre a sua cinética enzimática, algumas lipases são desnaturadas na presença de solventes orgânicos necessitando de um pré-tratamento para a sua utilização em processos industriais, outras são estáveis em processos com solventes orgânicos, porém são inativas em metanol (Lotti et al., 2014). Lipases microbianas podem ser separadas por membranas afim de aumentar a sua atividade, como relatado na literatura, o uso sequencial dos processos de microfiltração e ultrafiltração possibilita a obtenção de concentrados com atividades enzimáticas muito superiores aos do extrato inicial (Reinehr et al., 2017).

1.7 Metodologias de Superfície de Resposta

A metodologia da superfície de resposta (MSR) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que deve descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas. Exemplos de modelos utilizados em MSR são o fatorial de três níveis, Box-Behnken, composto central e Doehlert. Cada um possuindo sua eficácia, vantagens e desvantagens de aplicação, utilizando o modelo matemático encontrado após o ajuste da função aos dados às vezes não pode descrever satisfatoriamente o domínio experimental estudado. A maneira mais confiável de avaliar a qualidade do modelo ajustado é pela aplicação da análise de variância (ANOVA). A ideia central da ANOVA é comparar a variação devido ao tratamento (alteração na combinação de níveis variáveis) com a variação devida a erros aleatórios inerentes às medidas das respostas geradas (Bezerra et al., 2008).

São aplicadas nos mais variados estudos, pois podem avaliar a interação entre duas ou mais variáveis de maneira simultânea. Como na otimização dos parâmetros do processo e identificar as condições ideais para a remoção de trihalometanos (THMs) e

matéria orgânica natural (NOM) no suprimento de água potável por meio do Box-Behnken (Kumari e Gupta, 2019). Em estudos de determinação das condições ótimas para a síntese de compostos por meio de lipase (Gawas et al., 2019).

1.8 Referências

Abdel-Azeem A.M., Abdel-Azeem M.A., Abdul-HadiS.Y. and Darwish A.G. *Aspergillus: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. In Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi.* 2019. Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives, 121–179. Switzerland AG.: Springer Nature.

Abrão, F. O., Duarte, E. R., Pessoa, M. S., Santos, V. L. dos, Freitas Júnior, L. F. de, Barros, K. de O., Rodriguez, N. M. *Notable fibrolytic enzyme production by Aspergillus spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. PLOS ONE.* 2017. 12(8), e0183628. doi:10.1371/journal.pone.0183628

Asrat, B. and Girma, A. *Isolation, production and characterization of amylaseenzyme using the isolate Aspergillus niger FAB-211. International Journal of Biotechnology andMolecular Biology Research.* 2018, Vol. 9(2) pp. 7-14. DOI: 10.5897/IJBMBR2018.0289

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta*, 2008, 76(5), 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019

Branco, S. *Fungal diversity from communities to genes. Fungal Biology Reviews*.2019. doi:10.1016/j.fbr.2019.06.003

Cairns, T. C., Nai, C., and Meyer, V. *How a fungus shapes biotechnology: 100 years of Aspergillus niger research. Fungal Biology and Biotechnology*. 2018, 5(1).doi:10.1186/s40694-018-0054-5

Carvalho, D. O., Curto, A. F. Guido, L. F. *Determination of Phenolic Content in Different Barley Varieties and Corresponding Malts by Liquid Chromatography-diode Array*

Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Antioxidants, **2015**, *4*, 563-576; doi:10.3390/antiox4030563

Cologna, N. de M. di, Gómez-Mendoza, D. P., Zanoelo, F. F., Giannesi, G. C., Guimarães, N. C. de A., Moreira, L. R. de S. Ricart, C. A. O. *Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. Enzyme and Microbial Technology*. 2018. 109, 1–10. doi:10.1016/j.enzmictec.2017.08.007

Coradi, G. V., da Visitação, V. L., de Lima, E. A., Saito, L. Y. T., Palmieri, D. A., Takita, M. A., de Lima, V. M. G.*Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by Trichoderma harzianum. Annals of Microbiology,* 2012. *63(2), 533–540.*doi:10.1007/s13213-012-0500-1

Costa, J. A. V., Treichel, H., Kumar, V.,Pandey, A. *Advances in Solid-State Fermentation. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 1–17. doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3

Costa, T. M., Hermann, K. L., Garcia-Roman, M., Valle, R. de C. S. C., & Tavares, L. B. B. *lipase production by Aspergillus niger grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017. 34(2), 419–427. doi:10.1590/0104-6632.20170342s20150477

De Diego-Díaz, B., Fernández-Rodríguez, J., Vitas, A. I., & Peñas, F. J. *Biomethanization of solid wastes from the alcoholic beverage industry: Malt and sloe. Kinetic and microbiological analysis. Chemical Engineering Journal*, 2018, 334, 65

Del Rio J., C., Prinsen, P., Gutiérrez, A. *Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals*. Journal of Cereal Science. 2013, 58(2), 248-254. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.07.001

Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., & Kumar, D. S. *Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of l-Asparaginase. Advances in Food and Nutrition Research*. 2016. 115–135. doi:10.1016/bs.afnr.2016.05.003

Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Socaciu, C. *Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (Prunus domestica L.) by-products. Food Chemistry*. 2016, 209, 27–36. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.016

Farías, R., D., García, C., M., Palomino, T., C., Arellano M., M. *Effects of Wastes from the Brewing Industry in Lightweight Aggregates Manufactured with Clay for Green Roofs. Materials*. 2017, 10, 527; doi:10.3390/ma10050527

Farinas, C. S. *Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015. 52, 179–188.doi:10.1016/j.rser.2015.07.092

Felix , A., C., S., Novaes, C., G., Rocha, M., R.,, George E. Barreto, G., E., Do Nascimento Jr, B., B. and Alvarez, L., D., G., *Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from Spondiasmombin L Apple Bagasse Agroindustrial Residues. Frontiers InChemistery*. 2018, v 5, 116.doi: 10.3389/fchem.2017.00116

Ferreira, A. N., Ribeiro, D. D. S., Santana, R. A., Santos Felix, A. C., Alvarez, L. D. G., Lima, E. de O., Nascimento Junior, B. B. do. *Production of lipase from Penicillium sp. using waste oils and Nopalea cochenillifera. Chemical Engineering Communications*, 2017, 204(10), 1167–1173. doi:10.1080/00986445.2017.1347567

Garcia-Garcia, G., Stone, J., &Rahimifard, S. *Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. Journal of Cleaner Production*. 2018. doi:10.1016/j.jclepro.2018.11.269

Gawas, S. D. Khan, N. Rathod, V. K. *Application Of Response Surface Methodology For Lipase Catalyzed Synthesis Of 2-Ethylhexyl Palmitate In A Solvent Free System Using*

Ultrasound. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2019, 36, 2. Doi: dx.doi.org/10.1590/0104-6632.2019362s20180453.

Geoffry, K., e Achur, R. N. *Screening and production of lipase from fungal organisms. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. 14, 241–253. doi:10.1016/j.bcab.2018.03.009

Gladis, A., Bondesson P., Galbe, M., Zacchi, G.*Influence of different SSF conditions on ethanol production from corn stover at high solids loadings. Energy Science & Engineering*. 2015. Doi: 10.1002/ese3.83.

Haile, M. and Kang, W., H. Antioxidant Activity, Total Polyphenol, *Flavonoid andTannin Contents of Fermented Green Coffee Beanswith Selected Yeasts. Fermentation.*2019, 5, 29; doi:10.3390/fermentation5010029

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria, A., Morales, A. A., & Rodríguez-Gutiérrez, G. *Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract. Journal of the Science of Food and Agriculture*.2018. doi:10.1002/jsfa.9191

Hertadi, R., &Widhyastuti, H. *Effect of Ca2+ Ion to the Activity and Stability of Lipase Isolated from Chromohalobacter japonicus BK-AB18. Procedia Chemistry*. 2015, 16, 306–313. doi:10.1016/j.proche.2015.12.057

Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. *Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. Journal of Food Science.* 2017, 82(10), 2232–2242.doi:10.1111/1750-3841.13794

Ishak, S., N., H., Masomian, M., Kamarudin, N., H., A., Ali, M., S., M., Leow, T., L., Rahman, R., N., Z., R., A.*Changes of Thermostability, Organic Solvent, and pH Stability in Geobacilluszalihae HT1 and Its Mutant by Calcium Ion. Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(10), 2561; https://doi.org/10.3390/ijms20102561

Isik, Z., Arikan, E. B., Bouras, H. D.,Dizge, N. *Bioactive ultrafiltration membrane manufactured from Aspergillus carbonarius M333 filamentous fungi for treatment of real textile wastewater. Bioresource Technology Reports*. 2019. doi:10.1016/j.biteb.2019.01.020

Izmirlioglu, G., andDemirci, A. *Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste byAspergillusniger. Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015. 96(8), 2788–2795.doi:10.1002/jsfa.7445

Jain, R., and Naik, S. N. *Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. 2018.Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 181–184.doi:10.1016/j.bcab.2018.06.010

Johari, M. A., and Khong, H. Y. *Total Phenolic Content and Antioxidant and Antibacterial Activities of Pereskiableo. Advances in Pharmacological Sciences*.2019, 1–4. doi:10.1155/2019/7428593

Juchen, P. T., Piffer, H. H., Veit, M. T., da Cunha Gonçalves, G., Palácio, S. M., Zanette, J. C. *Biosorption of reactive blue BF-5G dye by malt bagasse: kinetic and equilibrium studies. Journal of Environmental Chemical Engineering.* 2018. doi:10.1016/j.jece.2018.11.009

Komáromy, P., Bakonyi, P., Kucska, A., Tóth, G., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K., and Nemestóthy, N. *Optimized pH and Its Control Strategy Lead to Enhanced Itaconic Acid Fermentation by Aspergillus terreus on Glucose Substrate. Fermentation*. 2019, 5(2), 31. doi:10.3390/fermentation5020031

Koyani, R. D. e Rajput, K. S. *Solid State Fermentation: Comprehensive Tool for Utilization of Lignocellulosic through Biotechnology. Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 2015. 5(10). doi:10.4172/2155-9821.1000258

Kumari, M., e Gupta, S. K. *Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant*

modified magnetic nanoadsorbents (sMNP) - An endeavor to diminish probable cancer risk. Scientific Reports, 2019, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-54902-8

Li, H., and Wang, Z. *Comparison in antioxidant and antitumor activities of pine polyphenols and its seven biotransformation extracts by fungi. PeerJ*. 2017 5, e3264.doi:10.7717/peerj.3264

Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., & Ferrer, P. *Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. Biotechnology Journal*. 2014. 10(1), 22–30.doi:10.1002/biot.201400158

Maftukhah, S., and Abdullah, A. *Cellulase Enzyme Production From Rice Straw Using Solid State Fermentation and Fungi Aspergillus nigerITBCC L74. MATEC Web of Conferences*. 2018, 156, 01010.doi:10.1051/matecconf/201815601010

Manan, M., B., and Webb, C. *Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 2017, 4

Manan, M., B., and Webb, C. *Modern microbial solid-state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. Biofuel Research Journal*. 2017. 5, Volume 4, Page 730-74. DOI: 10.18331/BRJ2017.4.4.5

Mehta, A., Bodh, U., Gupta, R. *Fungal lipases: a review. Journal of Biotech Research.* 2017.8:58-77

Mehta, A., Grover, C., Gupta, R. *Purification of lipase from Aspergillus fumigatus using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization. Journal of Basic Microbiology.* 2018. 1800129.doi:10.1002/jobm.201800129

Mendes, D. B., Silva, F. F. D., Guarda, P. M., Almeida, A. F., Oliveira, D. P. de, Morais, P. B., and Guarda, E. A. *Lipolytic Enzymes with Hydrolytic and Esterification Activities Produced by Filamentous Fungi Isolated from Decomposition Leaves in an Aquatic Environment. Enzyme Research*, 2019, 1–13. doi:10.1155/2019/8182425

Nadumane, V. K., Venkatachalam, P., &Gajaraj, B. *Aspergillus Applications in Cancer Research. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 2016. 243–255. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00020-8

Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L., and Homaei, A. *Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. Process Biochemistry*. 2018. 70, 61–70.doi:10.1016/j.procbio.2018.04.018

Ozcirak Ergun, S., and Ozturk Urek, R. *Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using Pleurotusostreatus. Annals of Agrarian Science*. 2017. 15(2), 273–277.doi:10.1016/j.aasci.2017.04.003

Panić, M., Stojković, M. R., Kraljić, K., Škevin, D., Redovniković, I. R., Srček, V. G., &Radošević, K. *Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. Food Chemistry*. 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.061

Park, J.-Y., Park, K.-M., Yoo, Y., Yu, H., Lee, C. J., Jung, H.-S., Chang, P.-S. *Catalytic Characteristics of a sn -1(3) Regioselective Lipase from Cordyceps militaris. Biotechnology Progress*. 2018, doi:10.1002/btpr.2744

Pascoal, A., Estevinho, L. M., Martins, I. M., &Choupina, A. B. *Novel sources and functions of microbial lipases and their role in infection mechanisms. Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2018. doi:10.1016/j.pmpp.2018.08.003

Pathania, S., Sharma, S., Kumari, K. *Solid state fermentation of BSG for citric acid production. Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2018.Vol. 9(1), pp. 70-74

Pedro, K. C. N. R., Parreira, J. M., Correia, I. N., Henriques , C. A., Langone, M. A. P. br*Enzymatic Biodiesel Synthesis From Acid Oil Using A Lipase Mixture. Quim. Nova.* 2018. Vol. 41, No. 3, 284-291. http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170180

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F. *Non-Extractable Polyphenols in Plant Foods. Polyphenols in Plants*. 2014. 203–218. doi:10.1016/b978-0-12-397934-6.00010-3

Qiao, H., Zhang, F., Guan, W., Zuo, J., & Feng, D. *Optimisation of combi-lipases from Aspergillus niger for the synergistic and efficient hydrolysis of soybean oil. Animal Science Journal*, 2016, 88(5), 772–780.doi:10.1111/asj.12718

Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A.,Mathew, A. K. *Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. Food Technology and Biotechnology*. 2018. 56(1). doi:10.17113/ftb.56.01.18.5491

Ravindran, R., and Jaiswal, A. K. *Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. Trends in Biotechnology*. 2016. 34(1), 58–69. doi:10.1016/j.tibtech.2015.10.008

Ravindran, R., Hassan, S., S., Williams, G., A., Jaiswal, A., K. *A Review onBioconversion of Agro-IndustrialWastesto Industrially Important Enzymes. Bioengineering*. 2018. 5, 93; doi:10.3390/bioengineering5040093

Reinehr, C. O., Treichel, H., Tres, M. V., Steffens, J., Brião, V. B., &Colla, L. M.*Successive membrane separation processes simplify concentration of lipases produced by Aspergillus niger by solid-state fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(6), 843–855. doi:10.1007/s00449-017-1749-

Rodrigues, T. A., Schueler, T. A., Silva, A. J. R. da, Sérvulo, E. F. C., and Oliveira, F. J. S. *Valorization of solid wastes from the brewery and biodiesel industries for the bioproduction of natural dyes. Brazilian journal of chemical engineering*. 2019. 36(1), 99–107. doi:10.1590/0104-6632.20190361s20170608

Rosales, E., Pazos, M., ÁngelesSanromán, M.*Solid-State Fermentation for Food Applications. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2018. 319–355. doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00015-3

Sadh, P., K., Duhan, S., Duhan, J., S. *Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresources and Bioprocessing.* 2018. V. 5. Doi 10.1186/s40643-017-0187-z

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Frisvad, J. C. *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Studies in Mycology*. 2014. 78, 141–173.doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004

Sandri, I. G. and Da Silveira, M., M.*Production and Application of Pectinases from Aspergillus niger Obtained in Solid State Cultivation. Beverages*, 2018, 4, 48; doi:10.3390/beverages4030048

Saraiva, B. R., Agustinho, B. C., Vital, A. C. P., Staub, L., &MatumotoPintro, P. T. *Effect of brewing waste (malt bagasse) addition on the physicochemical properties of hamburgers. Journal of Food Processing and Preservation*. 2019. doi:10.1111/jfpp.14135

Schäpe, P., Kwon, M., Baumann, B., Gutschmann, B., Jung, S., Lenz, S.,Meyer, V. *Updating genome annotation for the microbial cell factory Aspergillus niger using gene co-expression networks. Nucleic Acids Research*. 2018. 47(2), 559–569. doi:10.1093/nar/gky1183

Sethi, B. K., Nanda, P. K., and Sahoo, S. *Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by Aspergillus terreusNCFT 4269.10.Brazilian Journal of Microbiology*. 2016 . 47(1), 143–149.doi:10.1016/j.bjm.2015.11.026

Shan, S., Huang, X., Shah, M. H., & Abbasi, A. M. *Evaluation of Polyphenolics Content and Antioxidant Activity in Edible Wild Fruits. BioMed Research International*. 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/1381989

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech.* 2016. 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0485-8

Singh, S., and Bajaj, B. K. *Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. Energy, Ecology and Environment*. 2017. 2(6), 370–386. doi:10.1007/s40974-017-0076-5

Socaci S., A., Farcas A., C., Vodnar D., C., Tofana, M. *Food wastes as valuable sources ofbioactivemolecules. In: NaofumiShiomi, editors. Superfood and Functional Food—TheDevelopment of Superfoods and Their Roles as Medicine. Rijeka, Croatia: InTech*, 2017, pp. 75-93. Doi: 10.5772/66115

Souza, P. M. de, Bittencourt, M. L. de A., Caprara, C. C., Freitas, M. de, Almeida, R. P. C. de, Silveira, D., Magalhães, P. O. *A biotechnology perspective offungal proteases. BrazilianJournalofMicrobiology.* 2015. 46(2), 337–346.doi:10.1590/s1517-838246220140359

Tacin, M. V., Massi, F. P., Fungaro, M. H. P., Teixeira, M. F. S., de Paula, A. V., De Carvalho, S., E., V.*Biotechnologicalvalorizationofoilsfromagro-industrialwastestoproduce lipase using Aspergillus spfromAmazon. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. doi:10.1016/j.bcab.2018.11.013

Tang, W., Lan, D., Zhao, Z., Li, S., Li, X. and Wnag, Y. *A ThermostableMonoacylglycerol Lipase fromMarine Geobacillus sp. 12AMOR1: Biochemical Characterization and Mutagenesis Study. International Journal of Molecular Sciences.* 2019. 2019, 20, 780; doi:10.3390/ijms20030780

Thomas, L., Larroche, C. e Pandey, A. *Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal*, 2013, 81, 146–161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013

Tiosso, P. C., Carvalho, A. K. F., Castro, H. F. de, Moraes, F. F. de, &Zanin, G. M.*Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2014 31(4), 839–847. doi:10.1590/0104-6632.20140314s00003006

Torres-Leona, C. Ramirez-Guzmana , N., Ascacio-Valdesa, J., Serna-Cockb, L., Correiac, M., T., S., Contreras-Esquivela, J., C., Aguilara, C., N.*Solid-state fermentation*

with Aspergillus niger to enhance the phenolic contents and antioxidativeactivity of Mexican mango seed: A promisingsource of natural antioxidants. LWT - Food Science and Technology IF 3.714 . 2019**.** *Doi:* 10.1016/j.lwt.2019.06.003

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., Yangsabai, A. *Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. Medicines*, 2018. 5(3), 93.doi:10.3390/medicines5030093

Uchida, M., Hideshima, N., Araki, T. *Development of koji by culturing Aspergillus oryzae on nori (Pyropiayezoensis). Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.07.017

Wang, Q., Gong, J., Chisti, Y., &Sirisansaneeyakul, S. *Bioconversion of tea polyphenols to bioactive theabrownins by Aspergillus fumigatus. Biotechnology Letters*. 2014. 36(12), 2515–2522. doi:10.1007/s10529-014-1632-0

Waters, D., M., Murray P., G., Tuohy, M., G., Donlon, J. *"Thermophilic Filamentous Fungal Enzyme Systems: Applications in theAgri-Food' Industries", The Natural Products Journal*. 2011. 1: 2. https://doi.org/10.2174/2210315511101010002

Xu, L.-N., Guo, S., Zhang, S. *Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains. FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(16). doi:10.1093/femsle/fny163

Zieniuk, B. e Fabiszewska, A. *Yarrowialipolytica: a beneficious yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018, 35(1). doi:10.1007/s11274-018-2583-8

Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Kerscher, M. *Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. InternationalJournalofCosmetic Science*. 2015. 37(5), 455–464. doi:10.1111/ics.12218

CAPÍTULO 2- Potenciais Atividades do Bagaço de Malte Fermentado com *Aspergillus niger* ATCC 1004: Fenólicos totais, atividade antioxidante e avaliação de citotóxidade.

Resumo

O bagaço de malte é o resíduo majoritário na produção de cerveja, durante a mostura o malte ganha cerca de 30 % do seu peso original. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do resíduo de cevada oriundo do mosto cervejeiro, para a produção de compostos fenólicos através da fermentação em estado sólido, utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 1004. Para isto foram aplicados três delineamentos experimentais para a otimização das condições ótimas de extração, solventes e fermentação, obtendo as melhores condições de extração com 168 RPM, 53 °C e 32 minutos. Para a fermentação obteve-se um tempo de 120 horas, uma temperatura de 30°C e pH de 5,0, o melhor solvente para extração foi a água, sem interação com os demais solventes. Aplicando duas metodologias para avaliar a atividade antioxidantes com os radicais ABTS e DPPH. Afim de se testar a da atividade antioxidante dos extratos *in natura* e fermentado foram testados dois métodos de captura de radicais livres. Com as condições ótimas de fermentação, a atividade antioxidante teve um aumento significativo de cerca de 50% em relação ao extrato não fermentado.

Palavras chaves: Fungo filamentoso, cevada, otimização e radicais livres.

2.1 INTRODUÇÃO

A cevada em termos de quantidade produzida por área de cultivo de cereais no mundo, ocupa o quarto lugar, ficando depois do milho, arroz e trigo. Sendo utilizada em uma variedade enorme de produtos, como malte de cevada, chá de cevada torrado, flocos de cevada, ração de cevada, dentre outros. O malte de cevada é a principal matéria-prima para os grãos utilizados no processo de produção de cervejas, responde por quase um terço de todas as produções de cevada. A cevada apresenta um alto teor de fitoquímicos, porém na maioria das vezes leva-se em consideração apenas o seu alto teor proteico, esquecendo a alta concentração de fenólicos na cevada (Chen et al., 2019).

Os compostos fenólicos possuem ampla gama de moléculas e diferentes conjuntos de atividades biológicas que são principalmente atribuídas à sua estruturas e podem ser classificados em várias classes, nomeadamente ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas, ligninas e taninos (Abbas et al., 2016; Shahidi et al, 2018). Compostos fenólicos apresentam várias atividades biológicas diferentes, como atividade antioxidante, atividade anti-incrustante, anti-oxigenação, anti-isquemia-reperfusão, antitrombose e antitumorais (Huang et al., 2017, Johnson et al., 2019, Wang et al., 2019). Como observado na literatura, extratos com elevados teores de fenólicos totais são correlacionados a atividades anticâncer (Oyenih e Smith, 2018).

Os polifenóis são um dos maiores e mais difundidos grupos de metabólitos secundários no mundo das plantas. Estes compostos são de particular interesse devido à sua ocorrência e às propriedades que possuem. As principais fontes de compostos fenólicos são frutas e vegetais, sendo encontrados em diversas partes das plantas como caule, folhas e sementes, em diferentes concentrações, podendo variar de acordo a região e clima (Alcântara et al., 2018,Guofanget al., 2019,Liuet al., 2019, Zhang et al., 2018.).

Assim como as frutas, vegetais, leguminosas, gramíneas, os grãos de cereais são uma boa fonte de compostos fenólicos bioativos que desempenham papéis significativos em muitos processos metabólicos. Ácidos fenólicos, flavonoides e tióis condensados são os principais compostos fenólicos presentes em grãos(Singh et al., 2017, Kulichová et al., 2019). Os grãos de cevada são ricos em compostos fenólicos, incluindo flavonoides com altas atividades antioxidantes, por meio da capacidade de sequestro de radicais de oxigênio e ensaios de eliminação de radicais DPPH e ABTS (Chen et al., 2019).

Não podendo ser sintetizado no corpo humano, os compostos fenólicos são introduzidos através da alimentação. Cereais, especialmente grãos integrais, são fontes importantes de polifenóis da dieta. Em comparação com vegetais e frutas, o conteúdo e as atividades biológicas dos polifenóis em cereais são subestimados há muito tempo (Tanase et al., 2019; Tian et al., 2019).Em diversos produtos industrias como cerveja, chás, polpas, dentre outras que utilize matéria prima oriunda de plantas apresentam elevados teores de compostos fenólicos e elevada atividades antioxidantes (Andrade et al., 2015; Humia et al., 2019; Khan e Mukhtar et al., 2018).

A cevada é um dos grãos mais cultivados no mundo, com números aumentando a cada ano devido à demanda do mercado. Na última década, o Brasil mostrou números impressionantes considerando a produção de cerveja (Piacentinet al., 2018). O bagaço de malte é um dos subprodutos oriundos do processo cervejeiro, sendo o componente

majoritário. Cerca de 30% do resíduo é produzido a mais do que a quantidade de cevada inicial, isto é, a cada 100 kg de matéria prima é gerado cerca de 130 kg de bagaço de malte úmido (Brochier e Carvalho, 2009). Como este subproduto apresenta pouco valor comercial, mas apresenta alto teor de açucares, proteínas, lipídios e fenólicos o que torna um resíduo de alto valor nutricional, em consequência desse alto teor de macronutrientes, apresenta um maior tempo e demanda de oxigênio para a sua degradação (Dhilon, et al., 2016; Izydorczyk e Edney, 2017).

Para o aumento dos compostos fenólicos se utiliza da fermentação em estado sólido, por ser um método de simples aplicação e apresenta diversas vantagens em comparação com a fermentação submersa, como o baixo custo e curtos intervalos de fermentação, além de se aproximar do ambiente natural de crescimento de micro-organismos como os fungos filamentosos, melhorando a produção e degradação dos resíduos (Saleh et al., 2018; Shin et al., 2019). Diversos gêneros, espécies de micro-organismos são utilizados no processo de fermentação, se destacando os fungos filamentosos por conta da sua rusticidade, estes aguentam diferentes condições de fermentações, como temperatura, umidade, dentre outros parâmetros (Bhanja Dey e Kuhad, 2014, Costa et al., 2019, Sadh et al., 2017). Destacando o gênero *Aspergillus*, estes micro-organismos produzem diferentes formas de compostos fenólicos(Wang et al., 2014).

O presente trabalho busca um melhor aproveitamento e valorização por meio da fermentação em estado sólido do resíduo de cevada de malte, sendo rico em macronutrientes e compostos fenólicos que são mal aproveitados no processo cervejeiro. Visando o aumento de compostos fenólicos, utilizando de metodologia de superfície de resposta para a otimização das variáveis no processo. A Metodologia de Superfície de Resposta é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são utilizadas para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis, nos quais a resposta deva alcançar um valor ótimo (Montgomery, 2013), caracterizando-se como uma metodologia prática, econômica e de fácil implementação. A análise de uma superfície de resposta é feita em termos de uma superfície ajustada. Se tal superfície é adequada, sua análise será aproximadamente equivalente a análise da superfície real (Bezerra et al, 2008).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Preparo de amostras

O bagaço de malte foi doado por uma cervejaria artesanal localizada no município de Jequié-BA, oriundo de cerveja do tipo Pilsen. O tratamento da amostra foi feito através do processo de liofilização com liofilizador (modelo K 105, LITOP). Em seguida a amostra foi triturada em moinho de facas (ACB Labor, São Paulo, Brazil), resultando em partículas de diâmetro de 2 mm.

2.2.2 Planejamento de Misturas

Para encontrar as concentrações ótima das misturas solventes etanol, acetona e água na extração de fenólicos totais presentes no bagaço de malte, utilizamos o planejamento de mistura centróide-simplex. A quantidade de amostra utilizada para cada experimento foi de 10 g da mesma fonte, do mesmo lote. O tempo de extração foi estabelecido em 2 horas (h), temperatura (T) de extração em 25 ° C, velocidade de agitação em 200 rotações por minuto (rpm), taxa de centrifugação em 5.000 rpm (I 206, equipado com rotor ST-720m, Tecnal, São Paulo, Brasil) e 50 mL solução de extração contendo os solventes etanol, acetona e água. O delineamento consistiu em 12 experimentos, com 3 repetições no ponto central (Tabela 1). Os resultados foram analisados através do gráfico da superfície de resposta para obter uma região que representa as concentrações ótimas dos solventes para a extração máxima dos fenólicos totais.

2.2.3 Condição ótima de extração dos fenólicos totais

As condições ótimas de extração foram determinadas por meio de um planejamento Doehrlet de três váriaveis, sendo as variáveis temperatura com 5 níveis de 10 a 110 °C, tempo com cinco níveis de 10 a 50 minutos, por último foi usado três níveis de agitação de 50 a 250 RPM (Tabela 3).

2.2.4 Fermentação em estado sólido

2.2.4.1. Perfil da fermentação

10 g de resíduos foram autoclavados (121 ° C / 1 atm / 15 min) em Erlenmeyer de 250 mL; após o resfriamento, o substrato estéril foi inoculado com 107 esporos / g e umedecido com tampões em diferentes pHs até o valor de umidade desejado (50%). As fermentações foram incubadas em estufas bacteriológicas e as variáveis independentes, tais como: temperatura de incubação (T, ° C), tempo de fermentação (t, h) e pHs foram avaliadas segundo o delineamento experimental de Doehlert (Tabela 3).

2.2.4.2. Planejamento experimental Doehlert e análise estatística para a fermentação em estado sólido

Utilizou-se uma matriz Doehlert Design para avaliar a influência da temperatura de incubação (T), do tempo de fermentação (t) e a velocidade de agitação (V.A) sobre o teor de compostos fenólicos produzidos por *Aspergillus niger* ATCC 1004 na fermentação em estado sólido com bagaço de malte. A matriz consistiu de 15 experimentos (Tabela 3), incluindo três repetições no ponto central para estimar o erro experimental, avaliar efeitos quadráticos, lineares e de interação das variáveis e ajustar um modelo matemático de segunda ordem. A partir dos valores experimentais obtidos em resposta, um modelo polinomial de segunda ordem foi construído de acordo com a Equação 1 para avaliar os efeitos das variáveis independentes na resposta, onde Y é a resposta (teor de compostos fenólicos), β0 é o termo constante; β1, β2 e β3 são o coeficiente de termos lineares; β11, β22 e β33 são o coeficiente de termos quadráticos; β12, β13 e β23 são o coeficiente de termos de produto cruzado, respectivamente.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC \quad (1)$$

O nível de significância estatística do modelo gerado foi avaliado por análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$), os coeficientes de regressão foram avaliados a partir do gráfico de Pareto (baseado em t Student, $p < 0,05$); e a qualidade do modelo avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado (R^2-adj) e teste da falta de ajuste. O software Statistica versão 10 (Statsoft Inc.) foi utilizado para análise de dados e gráficos.

2.2.5 Determinação de fenólicos totais

O conteúdo total de fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado (Rossi; Singleton, 1965). Resumidamente, os extratos (0,1 mL) foram misturados com 0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 0,2 mL de solução de carbonato de sódio (4%). A mistura foi agitada em uma incubadora shaker (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil); após agitação, o extrato foi centrifugado (I 206, equipado com rotor ST-720m, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5.000 rpm a 25 ° C por 10 min e mantido a 25 ° C por 30 minutos no escuro. A absorbância da amostra foi medida por espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 750 nm contra um branco. Soluções aquosas de ácido gálico foram usadas como padrão e sua curva de calibração foi usada para extrapolar o conteúdo total de fenólicos presentes na amostra. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de resíduos (mg GAE / 100 g). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.2.6. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS. A DPPH foi estimado pela metodologia de Brand-Williams et al. 1995 com pequenas modificações. A solução de DPPH (0,06 mM) foi diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 unidades a 517 nm. Os extratos da amostra (0,1 mL) foram deixados reagir com 3,9 mL da solução radical DPPH por 30 minutos no escuro, e a diminuição da absorbância da solução resultante foi monitorada. A absorbância da mistura de reação foi medida utilizando um espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 517 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em EC50 (g / g de DPPH), correspondendo à concentração da amostra que reduziu a absorbância inicial de DPPH em 50%. Para o teste ABTS, o procedimento seguiu o método de Evans et al. (1999) com pequenas modificações. O cátion do radical ABTS (ABTS +) foi gerado pela reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7mM) com 88 µl de persulfato de potássio 140 mM (concentração final de 2,45 mM). A mistura foi mantida no escuro por 16 h antes do uso e depois diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,05 unidades a 734 nm usando um espectrofotômetro (UV-340G,

Gehaka, São Paulo, Brasil). Em seguida, 30 µL do extrato foram adicionados em 3,0 mL de solução ABTS diluída. Após a adição de 30 µL de extrato, a absorbância a 734 nm foi registrada aos 6 minutos após a mistura. Soluções etanólicas de concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em µMTrolox / g.

2.2.7 Determinação da Atividade Citotóxica

2.2.7.1 Preparo da amostra

Os referidos produtos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3mL).

2.2.7.2 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram obtidos de voluntários saudáveis. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com todas as Normas de Segurança.

2.2.7.3 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Uma amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras do produto teste em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 ug/mL) foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 ºC sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al.,1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.7.4 Análise estatística

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, onde os dados foram tratados por regressão linear simples através do método one-way ANOVA, bem como por meio da utilização do *teste t de Student*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem $p<0,05$. A análise estatística foi feita utilizado o software GraphPadPrism5.0®.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1 Aplicação de designer experimental para a extração de fenólicos totais

2.3.1.1 Planejamento de mistura centroide-simplex

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos pela aplicação de uma matriz de mistura centroide-simplex para a extração de fenólicos totais no resíduo de cervejaria variando as concentrações dos solventes.

Tabela 1- Planejamento de misturas aplicado na extração de fenólicos Totais.

Experimento	Acetona	Água	Etanol	Fenólicos Totais (GAE/ 100 mg)	Fenólicos Totais Preditos
1	100	0	0	251,23 ± 8,85	255,76
2	0	100	0	487,16 ± 7,70	471,26
3	0	0	100	203,20 ± 7,73	196,78
4	50	50	0	165,29 ± 7,73	153,93
5	50	0	50	135,35 ± 7,88	133,46
6	0	50	50	304,39 ± 7,81	282,06
7	66,7	16,7	16,7	181,79 ± 7,66	185,99
8	16,7	66,7	16,7	241,85 ± 7,94	307,35
9	16,7	16,7	66,7	171,96 ± 7,88	209,04
10(P.C)	33,3	33,3	33,3	232,07 ± 7,81	239,06
11(P.C)	33,3	33,3	33,3	243,83 ± 7,99	239,06
12(P.C)	33,3	33,3	33,3	237,05 ± 7,66	239,06

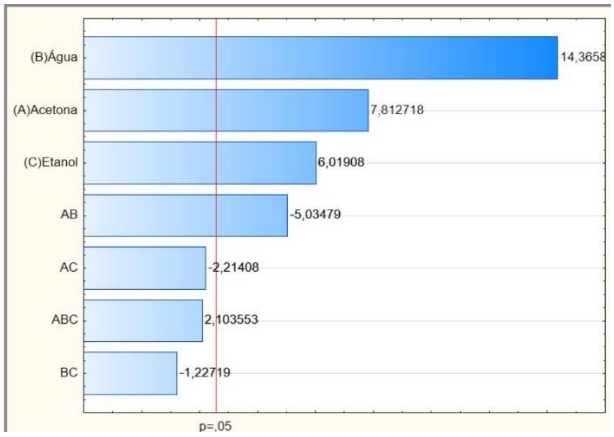
De acordo com os resultados da Tabela 1, o menor teor total de fenólicos foi obtido quando apenas a mistura de 50% etanol e 50% acetona foi utilizada. Além disso, os solventes etanol e acetona na concentração de 100% não resultou em melhores eficiências de extração. Além disso, a combinação dos três solventes afetou potencialmente as quantidades de extração do teor total de fenólicos mas não superou a eficiência da água em 100%. A análise do planejamento mostrou que a extração dos fenólicos totais depende da presença de água. Demonstrando o caráter polar dos fenólicos totais presentes no bagaço de malte, pois as interações entre os fenólicos totais e a água proporcionam um aumento em sua concentração, como demonstrado na Tabela 1 em relação a solventes de baixa polaridade como a acetona e de solventes que apresentam uma parte polar e outra apolar, como o etanol. Bem como a sua eficácia em comparação com as misturas dos demais solventes, onde a maior concentração da água aumenta a concentração de fenólicos totais, como observado na Tabela 1. Além das vantagens de se utilizar um solvente que não apresenta risco a saúde humana e de baixo custo, em comparação com a acetona e o etanol. Com base na solubilidade desses composto, mostram que os solventes são de extrema importância para a concentração dos fenólicos totais do extrato (Do et al., 2014, Felix et al., 2018). Em outros estudos temos a importância da água em diferentes proporções para a extração dos fenólicos totais (Kivarak, et al. 2018), onde a maior proporção de água resultou em uma maior extração de fenólicos totais. Estudos que a concentração dos fenólicos totais está ligado a concentração da água mediante outros solventes, influenciando nas concentrações dos extratos e concentração de fenólicos totais (Namvar, et al., 2018).

Tabela 2- ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do conteúdo de fenólicos totais do resíduo de cervejaria.

Variações	**SQ**	**GL**	**MQ**	**F calculado**	**F tabelado**
Regressão	87805,86	8	10975,7	9,419	8,84
Resíduos	3495,83	3	1165,28		
Falta de ajuste	3426,23	1	3426,23	98,46	18,51
Erro puro	69,59	2	34,80		
Erro Total	91301,69	11	8300,15		
R^2 predito	0,961				
R^2 ajustado	0,859				

A análise ANOVA (com p <0,05) para os resultados obtidos pode ser observada na Tabela 2. A análise variância devido aos parâmetros de regressão do modelo polinomial foi estatisticamente significante ao nível de significância de 95%. O coeficiente de correlação R^2 foi de 0,961, o que mostra que aproximadamente 96,1% dos resultados podem ser explicados pelo modelo experimental. O modelo experimental apresentou uma boa regressão, desta forma os experimentos apresentam uma boa reprodutibilidade, mesmo apresentando uma falta de ajuste, como demonstra os F calculado (98,46) sendo maior que o tabelado (18,51), não influência na reprodutibilidade dos experimentos. A Figura 1 mostra o gráfico de Pareto, onde a influência de cada parâmetro e suas interações para o design da mistura pode ser observada em ordem decrescente de significância dos efeitos.

Figura 1- Influência das variáveis expressa no gráfico de Pareto.



A água foi o solvente que apresentou a maior contribuição para a extração de compostos fenólicos totais, sendo observado através dos resultados da Tabela 1 e do gráfico de Pareto. Além disso, ao avaliar as interações entre os solventes, o gráfico mostra que a interação entre os solventes acetona e etanol foi significativa no nível de confiança de 95% (p <0,05), a interação entre água e acetona foi significativa de maneira negativa como mostra a Figura 1, mostrando que quanto menor a concentração de acetona na mistura, maior a concentração de fenólicos totais, confirmando os resultados obtidos na Tabela 1.

2.3.2 Planejamento Doehrlet de três níveis para as condições ótimas de extração

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos pela aplicação de uma matriz Doehrlet de três níveis na extração dos fenólicos totais, expressando a interação entre diferentes velocidade de agitação, temperatura e tempo de extração.

Tabela 3- Planejamento experimental Doehrlent para determinação das condições ótimas de extração de compostos fenólicos totais.

Experimento	Tempo	Temperatura	V. A.	Fenólicos Totais (mg GAE/ 100 g)	Predito
1	30	110	150	227,67 ± 0,2	245,73
2	20	90	50	187,84 ± 0,02	188,87
3	20	90	250	251,18 ± 0,03	234,95
4	40	90	50	203,04 ± 0,06	186,97
5	40	90	250	189,71 ± 0,1	190,88
6	10	60	150	315,24 ± 0,1	314,95
7	30	60	150	335,13 ± 0,1	339,37
7	30	60	150	334,00 ± 0,2	339,37
7	30	60	150	349,88 ± 0,2	339,37
8	50	60	150	332,64 ± 0,2	333,82
9	20	30	50	139,37 ± 0,002	138,20
10	20	30	250	255,30 ± 0,03	271,37
11	40	30	50	161,63 ± 0,006	177,85
12	40	30	250	269,88 ± 0,04	268,85
13	30	10	150	286,54 ± 0,02	268,48

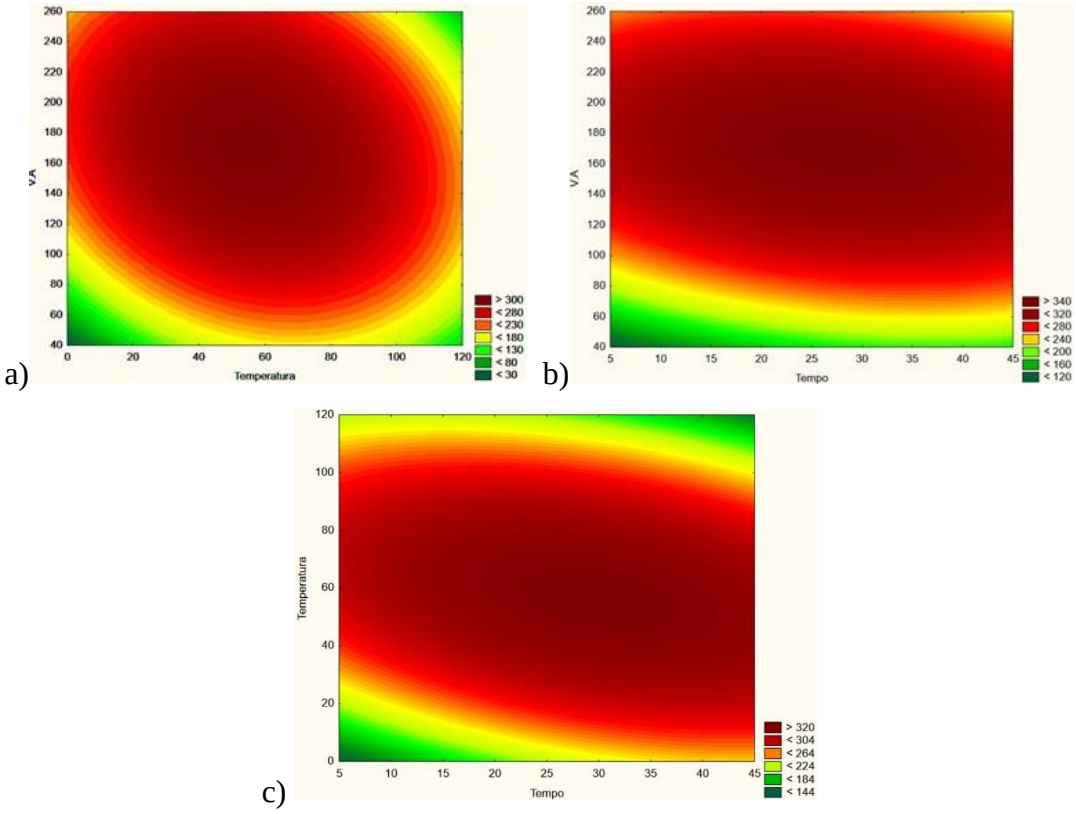
Ponto ótimo: temperatura 54° C, Tempo 28 minutos e 170 rpm de velocidade de agitação (V.A), obtendo um valor de 317,89 ± 0,09 e um valor predito de 343,407.

De acordo com os dados expressos na Tabela 3, temperaturas e velocidades de agitação muito altas ou muito baixas não tem influência positiva na extração, assim como altos tempos de agitação não influenciam na extração. Visando uma otimização nas condições de extração foi aplicado um planejamento Doehlert de três variáveis no extrato de fenólicos totais aquoso de cevada para se estudar a interação entre essas variáveis de acordo com o teor de fenólicos totais obtidos (Bezerra et al, 2008). Os fenólicos totais apresentam diferentes formas em um extrato, dependendo de suas estruturas, podem

sofrer alterações dependendo das condições de extração, sendo degradados por temperatura, interação com solventes, dentre outros fatores.

A figura 2 traz o ponto crítico para a extração dos fenólicos totais e a interação entre as variáveis temperatura (T) e velocidade de agitação (V.A) indicam as melhores condições para a sua extração.

Figura 2 - Superfícies de resposta para a otimização da extração de fenólicos totais em bagaço de malte.



a) Superfícies de resposta velocidade de agitação versus temperatura.

b) Superfícies de resposta velocidade de agitação versus tempo.

c) Superfícies de resposta velocidade de temperatura versus tempo

O ponto crítico para a extração segundo a Figura 2a tem a melhor velocidade de agitação em 170 RPM e temperatura de 54 °C, enquanto que as Figuras 2.b e 2.c demonstram que o melhor tempo é de 28 minutos. Em relação a temperatura indicada pela Figura 2.1, neste trabalho, optou-se por uma temperatura de 30° C por ser mais branda, pois estudos indicam que os fenólicos totais nos tecidos vegetais são altamente suscetíveis aos processos térmicos usados para cozinhar ou esterilizar e uma temperatura de 54°C como indicado pelas analises estatísticas podem degradar a estrutura destes compostos, interferindo em suas atividades (Garretson, et al., 2018, Ross et al., 2011).

Bem como os dados obtidos nesse trabalham confirmam essa informação, pois na temperatura de 54°C o teor de fenólicos totais foram de 317,89 ± 0,09 mg GAE/ 100 g, enquanto que na temperatura de 30°C foi encontrado um valor de 336,65 ± 7,81 mg GAE/ 100 g, apresentando uma diferença aproximada de 5,6% de perca de fenólicos totais entre as duas temperaturas, demonstrando que estatisticamente as temperaturas de 54°C e 30°C são iguais.

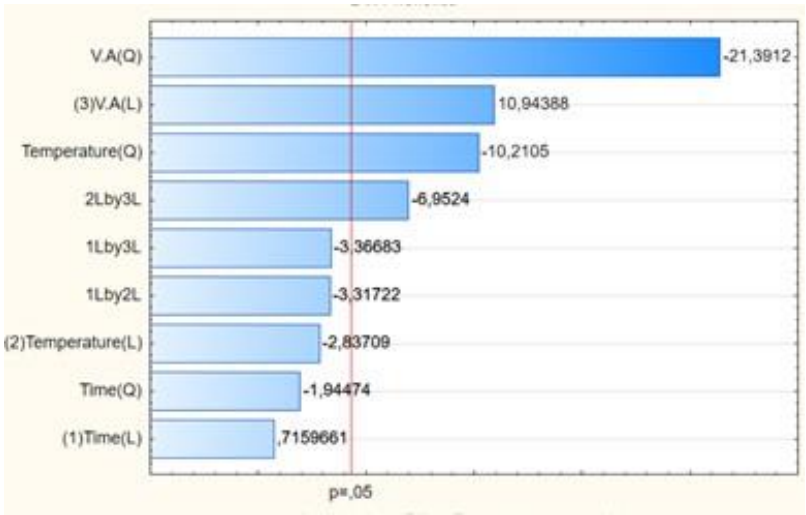
Um modelo polinomial de segunda ordem (com $p < 0,05$) foi obtido através da análise de regressão, de acordo com a equação abaixo:

$$FT = -264,2 + 7,5t - 0,067t^2 + 5,8T - 0,033T^2 + 3,9V - 0,010V^2 - 0,035tT - 0,011tV - 0,07TV$$

Onde FT= fenólicos totais, t= tempo, T= temperatura e V= velocidade de agitação.

A análise variância devido aos parâmetros de regressão do modelo polinomial foi estatisticamente significante ao nível de significância de 95%. Pois o R^2 encontrado foi de 0,972 se aproximando do nível de significância de 97,2%. A análise da ANOVA demonstra que o modelo utilizado apresenta uma boa regressão já que o F calculado (19,42) é maior que o F tabelado (4,77), o modelo não apresentou falta de ajuste segundo a análise de variância ANOVA pois, o F calculado (7,23) é menor que o F tabelado (19,16). Avaliando a interação das variáveis é possível observar que a velocidade de agitação e temperatura são os fatores mais importantes para a extração dos fenólicos totais, como é apresentado no gráfico de Pareto abaixo:

Figura 3- Gráfico de Pareto para otimização da extração dos fenólicos totais.



2.3.3 Efeito da fermentação em estado sólido no teor de fenólicos totais de bagaço de malte

A tabela 4 apresenta os resultados das fermentações em estado sólido em diferentes condições de fermentação com um planejamento experimental Doehlert para a fermentação dos resíduos de cevada. Optou-se por utilizar um controle negativo, submetendo o resíduo de cevada as mesmas condições de fermentação sem o micro-organismo.

Tabela 4-Planejamento Doehlert para as condições ótimas de fermentação.

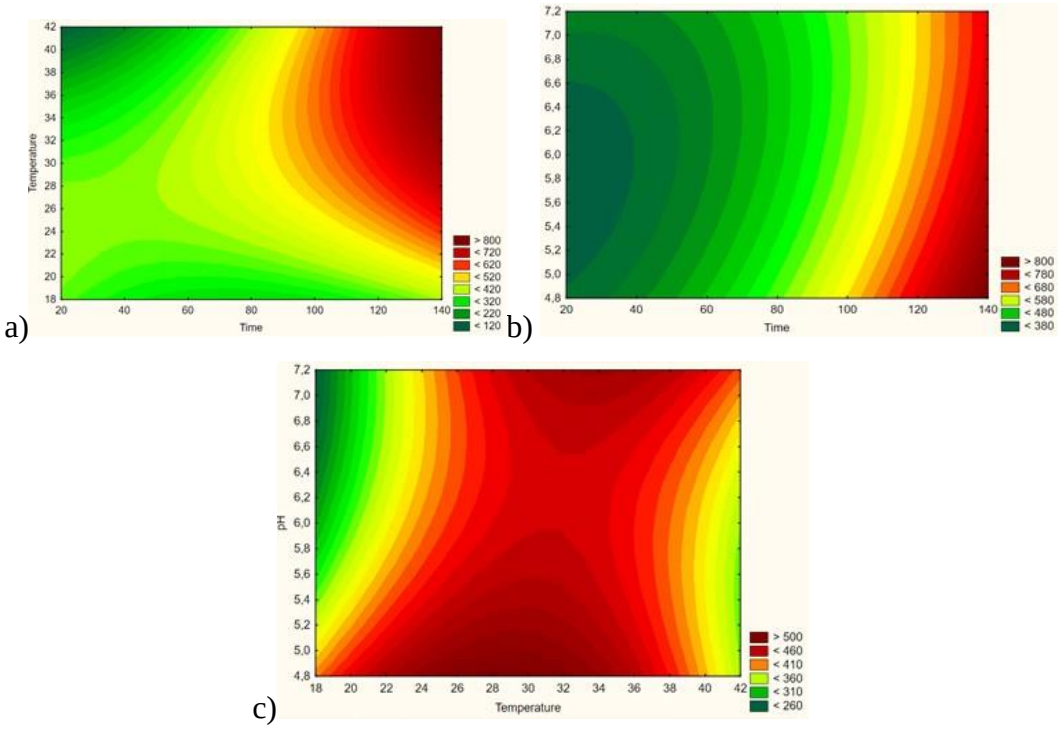
Experimento	Tempo (H)	Temperatura (°C)	pH	Fenólicos Totais (Não fermentados)	Fenólicos Totais Fermentado	Fenólicos Totais Preditos
1	120	30	6	327,67 ± 7,60	662,75	627,09
2	96	25	5	334,45 ± 7,73	538,09	365,55
3	96	25	7	324,79 ± 7,81	385,12	336,35
4	96	35	5	336,65 ± 7,81	572,24	589,73
5	96	35	7	328,40 ± 7,88	599,42	606,68
6	72	20	6	327,67 ± 7,60	382,30	177,89
7ª	72	30	6	334,45 ± 7,73	469,53	446,84
7b	72	30	6	324,79 ± 7,81	461,06	446,84
7c	72	30	6	336,65 ± 7,81	414,02	446,84
8	72	40	6	328,40 ± 7,88	342,24	346,65
9	48	25	5	327,67 ± 7,60	399,02	409,61
10	48	25	7	334,45 ± 7,73	406,23	366,84
11	48	35	5	324,79 ± 7,81	418,26	308,03
12	48	35	7	336,65 ± 7,81	393,43	311,42
13	24	30	6	328,40 ± 7,88	346,71	375,87

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a eficácia da fermentação em estado sólido como pode ser observado na Tabela 4. Mostrando que tempos maiores de fermentação os teores de fenólicos totais são aumentados como observado no ponto 1, onde se encontra um aumento de 102,3% no teor de fenólicos totais em comparação com

o teor do bagaço de malte não fermentado. O menor aumento no teor de fenólicos totais foi encontrado no ponto 13, tendo um aumento em relação ao bagaço não fermentado de 5,57%, confirmando a eficácia da fermentação em relação ao não fermentado e o tempo de fermentação, pois, entre todos os pontos, apresenta o menor tempo e temperatura de fermentação. Deste modo os processos de fermentação microbiana são uma ferramenta potente para a produção de fenólicos totais devido à sua relação custo-benefício e vantagens ambientais, como rápida degradação do resíduo (Bhanja, et al., 2016).

Em outros estudos, foi avaliado a utilização de fungos filamentosos na produção de fenólicos totais em diferentes resíduos, tais como casca de café, polpa de café, damasco, soja, dentre outros. Resultados de outros cereais são encontrados com condições ótimas de fermentação semelhantes, determinadas através de um delineamento experimental (Palomino et al., 2015 Dulf et al., 2017. Handa et al., 2019). O valor dos fenólicos totais encontrados no bagaço de malte sem fermentar foram de 330,39 ± 4,60 mg GAE/ 100 g, quando comparados com outros cereais como o farelo de arroz na proporção de 10%, que obteve um teor 28.966 mg GAE / 100g e 30.410 mg GAE / 100g, respectivamente (Nisa et al., 2019), mostrando o alto teor de fenólicos totais do bagaço de malte.

Figura 4- Superfície de resposta para a fermentação do bagaço de malte.



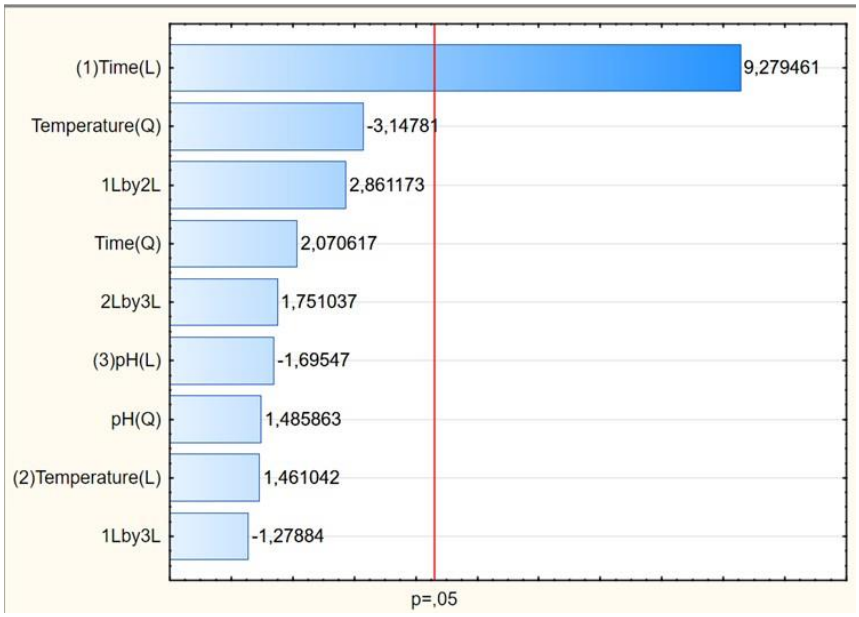
a) Superfície de resposta temperatura versus tempo

b) Superfície de resposta pH versus tempo.

c) Superfície de resposta pH versus temperatura.

A Figura 4.a demonstra a interação entre as variáveis temperatura e tempo, enquanto as Figuras 4.b e 4.c representam a interação entre as demais variáveis, com base nas figuras e testes estáticos observa-se que a variável pH durante o processo de fermentação não é significativa na produção dos fenólicos totais. Enquanto que diferentes tempos de fermentação são cruciais para a produção de fenólicos totais (Xu et al, 2018). Como observado na Figura 4 maiores tempos e temperaturas abaixo de 35 °C são melhores para o processo de produção de fenólicos totais pelo *Aspergillus*, resultados de tempos de fermentação próximos são encontrados com os fungos filamentosos *Aspergillus awamori, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* (Salar et al., 2016. Yin, et al., 2017. Rashid et al., 2019). Como apresentado na Figura 5, o pH inicial não se demonstrou uma variável significativa na fermentação, sua interação com as demais variáveis não influenciam no aumento ou diminuição dos fenólicos totais. As condições críticas para a fermentação são dadas em 120 horas de fermentação, com temperatura de 28 °C e um pH 5,0, obtendo uma atividade de fenólicos totais de 614,50 ± 7,80 mg GAE/100 mg, enquanto que o predito foi de 697, 98 mg GAE/100 mg.

Figura 5 – Gráfico de Pareto para a fermentação do bagaço de malte.



2.3.4 Atividade antioxidante dos fenólicos totais

Na Tabela 5, são apresentados os dados das atividades antioxidantes pelo método ABTS em µmol Trolox/g da amostra e pelo método do DPPH em g amostra/g do DPPH.

Tabela 5- Atividade antioxidante por ABTS e DPPH.

Experimento	**Tempo (H)**	**Temperatura (°C)**	**pH**	**Atividade Antioxidante Controle ABTS (umol Trolo/g)**	**Atividade Antioxidante Fermentado ABTS (umol Trolo/g)**	**Atividade Antioxidante Controle DPPH (umol VCEAC/g)**	**Atividade Antioxidante Fermentado DPPH (umol VCEAC/g)**
1	120	30	6	2239 ± 10,0	3299,00 ± 5,00	32,57 ± 2,86	14,15 ± 2,79
2	96	25	5	2137 ± 10,1	3267,33 ± 7,63	31,57 ± 2,86	15,06 ± 3,78
3	96	25	7	2200 ± 11,0	3351,50 ± 7,50	32,50 ± 2,86	16,28 ± 3,18
4	96	35	5	2201 ± 11,2	3492,33±16,1	30,60 ± 2,86	22,83 ± 8,17
5	96	35	7	2209 ± 15,1	3505,66 ± 11,5	33,71 ± 2,86	14,41 ± 3,90
6	72	20	6	2212 ± 16,0	3299,00 ± 20,0	29,55 ± 2,86	24,84 ± 4,69
7ª	72	30	6	2220 ± 17,2	2945,66 ± 16,1	31,11 ± 2,86	22,69 ±4,26
7b	72	30	6	2230 ± 9,90	3154,00 ± 10,0	30,75 ± 2,86	24,47 ± 4,04
7c	72	30	6	2235 ± 10,9	3117,33 ± 20,8	31,60 ± 2,86	25,77 ± 3,47

8	72	40	6	2260 ± 11,0	3151,50 ± 17,5	32,15 ± 2,86	24,61 ± 2,82
9	48	25	5	2265 ± 9,96	2832,33 ± 2,88	42,37 ± 2,86	39,88 ± 5,84
10	48	25	7	2270 ± 10,2	3114,00 ± 15,0	38,16 ± 2,86	33,65 ± 4,23
11	48	35	5	2269 ±11,9	2984,00 ± 15,0	40,51 ± 2,86	36,53 ± 4,01
12	48	35	7	2290 ±10,0	3181,50 ± 2,50	40,93 ± 2,86	36,41 ± 3,11
13	24	30	6	2283 ± 9,95	2716,50 ± 22,5	39,78 ± 2,86	34,32 ± 5,16

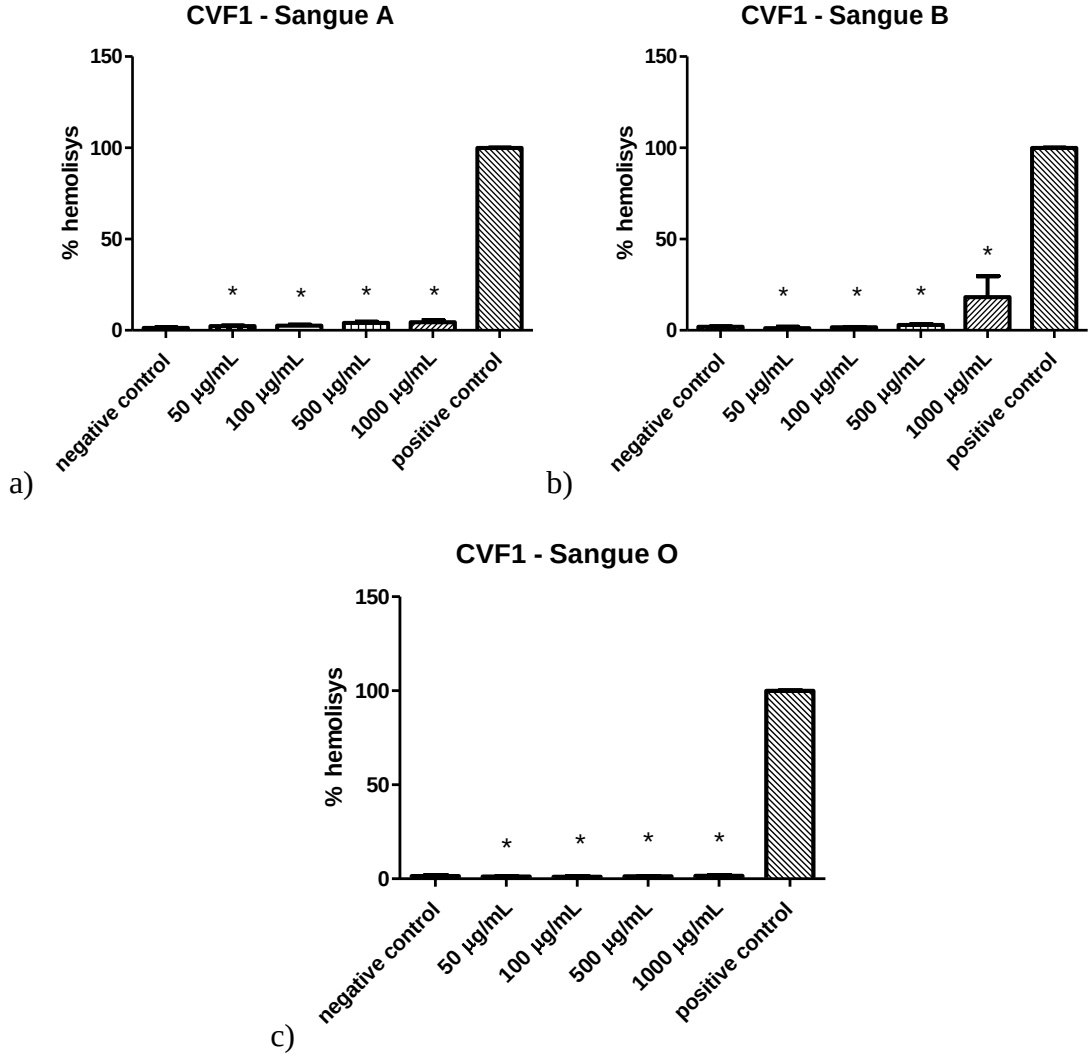
Como expresso na Tabela 5, as amostras controles sem a inoculação do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 não sofreram aumento ou diminuição na atividade antioxidante, a variação encontrada entre eles, está dentro da faixa do desvio padrão. Os extratos obtidos por meio da fermentação do bagaço de malte pelo *Aspergillus niger* ATCC 1004, apresentam um aumento aproximado de 50% em sua capacidade de capturar os radicais livres ABTS e DPPH, quando comparados aos extratos controles sem inoculação, confirmando o potencial da fermentação em estado sólido, pois este potencializa a atividade antioxidante dos fenólicos totais por meio do aumento do teor de fenólicos totais no extrato.

No ponto ótimo de fermentação obteve se para o controle com ABTS a atividade de 2247,00 ± 9,67 umol Trolox/ g de amostra e para o fermentado foi de 3339,00 ± 10,10 umol Trolox/ g de amostra, enquanto que para o DPPH controle a atividade foi de 35,52 ± 2,86 umol VCEAC/g do DPPH e o fermentado apresentou um valor de atividade de 14,73 ± 3,16 umol VCEAC/g do DPPH. Quando comparado a capacidade antioxidade do extrato de bagaço de malte fermentado com outros micro-organismo do gênero *Aspergillus*, os fenólicos totais produzidos pelo *Aspergillus awamori* apresentou uma atividade de 281,86 µmol Trolox/g da captura do radical ABTS e 244,28 µmol VCEAC/g para o radical DPPH (Salar et al., 2016). Enquanto que a atividade da captura dos radicais livres do DPPH por fenólicos totais produzidos pelo *Aspergillus* PR 78 e o *Aspergillus* PR 66, foi respectivamente de 82,77 umol VCEAC/g e 68,26 umol VCEAC/g (Arora e Chandra, 2010), o do *Aspergillus niger* ATCC 1004, comparando com os resultados obtidos nesse trabalho, o do *Aspergillus niger* ATCC1004 se demostra superior.

2.3.5 Determinação da Citotoxidade.

Os resultados obtidos pelo teste de citotoxidade são expressos na Figura 6.

Figura 6-Citotoxidade do extrato de bagaço de malte fermentado por *Aspergillus niger* ATCC 1004.



a) Citotoxidade para os eritrócitos A.

b) Citotoxidade para os eritrócitos B.

c) Citotoxidade para os eritrócitos O.

A não agressividade dos extratos aquosos de *Aspergillus niger* ATCC 1004 sobre eritrócitos humanos (A, B, O) demonstra sua viabilidade em aplicações em humanos pois os extratos aquosos não apresentam toxidade *in vitro* para as células testadas com tratamento por 1 hora de incubação. Como observado na Figura 4, o extrato em nenhum dos tipos sanguíneos demonstrou atividade citotóxica significativa, podendo

ser empregado em aplicações humanas. Esses resultados em conjunto com a alta atividade antioxidante apresentada pelos extratos identificaram a presença de substâncias com potencial para serem empregadas como agentes anticâncer, pois estudos anteriores mostraram que tecidos em pacientes com câncer produzem quantidades consideravelmente altas de espécies reativas de oxigênio, (conhecidas como radicais livres) em comparação com tecidos normais (Owen et al., 2000; Sajkowska-Kozielewicz et al., 2016)

2.4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, o resíduo bagaço de malte oriundo de cervejaria possui um teor elevado de compostos fenólicos totais. Quando este é inoculado com o *Aspergillus niger* ATCC 1004, este teor de fenólicos totais é ainda mais enriquecido, demonstrando o potencial do microrganismo em produzir diferentes compostos. Além de sua elevada capacidade antioxidante, podendo ser utilizada em estudos futuros para a determinação de quais são os fenólicos totais no extrato e quais usos estes podem vir a ter para a indústria. Os métodos de superfície de resposta demonstraram excelente aplicação neste trabalho, tanto em otimizar os solventes para a extração, quanto otimizar as variáveis para a fermentação, obtendo uma boa reprodutibilidade e aplicação no bagaço de malte.

2.5. Referências

Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S.,Suleria, H. A. R. *Natural polyphenols: An overview. InternationalJournalof Food Properties*. 2016, 20(8), 1689–1699.doi:10.1080/10942912.2016.1220393

Alves Alcântara, M., de Lima Brito Polari, I., Raniere Lins de Albuquerque Meireles, B., Eduardo Alcântara de Lima, A., Cesar da Silva Junior, J., de Andrade Vieira,Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro, A. *Effectofthesolventcompositiononthe profile ofphenoliccompoundsextractedfrom chia seeds. Food Chemistry*. 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.133

Andrade, R., A., M., S., Maciel, I., S., Santos, A., M., P., Melo, E., A. *Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. Food Science and Technology*. 2015, Campinas, 35(2): 354-360. DDOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6585

Arora, D. S., & Chandra, P. *Assay of antioxidant potential of two Aspergillus isolates by different methods under various physio-chemical conditions. Brazilian Journal of Microbiology*, 2010 41(3), 765–777. doi:10.1590/s1517-83822010000300029

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. e Escaleira, L.A. *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta*, 2008, 76,965-977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.

Bhanja Dey, T., andKuhad, R. C. *Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with Rhizopus oryzae RCK2012. Biotechnology Reports*. 2014, 4, 120–127.doi:10.1016/j.btre.2014.09.006

Bhanja Dey, T., Chakraborty, S., Jain, K. K., Sharma, A., e Kuhad, R. C. *Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. Trends in Food Science & Technology*,201653, 60–74.doi:10.1016/j.tifs.2016.04.007

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., E., Besert, C.*Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 1995, 28.25-30.

Brochier, Mariana. A.; Carvalho. S. *Aspectos ambientais, produtivos e econômicos do aproveitamento de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cordeiros em sistema de confinamento*. Ciência Agrotécnica. 2009. v.33, n.5, p.1392-1399. Doi: 10.1590/S1413-70542009000500028.

Chen, Y., Huang, J., Hu, J., Yan, R., Ma, X. *Comparative study on the phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of phenolics extracted from barley malts processed under different roasting temperatures*. 2019. Food & Function.doi:10.1039/c9fo00168a

Costa, T. M., Kaufmann, V., Paganelli, C. J., Siebert, D. A., Micke, G. A., Alberton, M. D., … de Oliveira, D. *Kinetic identification of phenolic compounds and potential production of caffeic acid by Ganoderma lipsiense in solid-state fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019. doi:10.1007/s00449-019-02131-8

Dhillon, G. S., Kaur, S., Oberoi, H. S., Spier, M. R., Brar, S. K.*Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications. Protein Byproducts*. 2016. 21–36. doi:10.1016/b978-0-12-802391-4.00002-1

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. *Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of Food and Drug Analysis*, 2014. 22(3), 296–302.doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001

Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Dulf, E.-H., andPintea, A. *Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (Prunus armeniaca L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. Chemistry Central Journal*, 2017, 11(1). doi:10.1186/s13065-017-0323-z

Felix , A., C., S., Novaes, C., G., Rocha, M., R.,, George E. Barreto, G., E., Do Nascimento Jr, B., B. and Alvarez, L., D., G., *Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from Spondiasmombin L Apple Bagasse Agroindustrial Residues. Frontiers InChemistery*. 2018, v 5, 116.doi: 10.3389/fchem.2017.00116

Garretson, L., Tyl, C., & Marti, A. *Effect of Processing on Antioxidant Activity, Total Phenols, and Total Flavonoids of Pigmented Heirloom Beans. Journal of Food Quality*, 2018, 1–6. doi:10.1155/2018/7836745

Guofang, X., Xiaoyan, X., Xiaoli, Z., Yongling, L., &Zhibing, Z. *Changes in phenolic profiles and antioxidant activity in rabbiteye blueberries during ripening. International Journal of Food Properties*. 2019, 22(1), 320–329.doi:10.1080/10942912.2019.1580718

Handa, C. L., de Lima, F. S., Guelfi, M. F. G., Fernandes, M. da S., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. *Parameters of the fermentation of soybean flour by Monascuspurpureus or Aspergillus oryzae on the production of bioactive compounds and antioxidant activity. Food Chemistry*, 271, 274–283. 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.188

Huang, Z., Nong, X., Ren, Z., Wang, J., Zhang, X., & Qi, S. *Anti-HSV-1, antioxidant and antifouling phenolic compounds from the deep-sea-derived fungus Aspergillus versicolor SCSIO 41502. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(4), 787–791.2017. doi:10.1016/j.bmcl.2017.01.032

Humia, B., V., Santos, K., S., Barbosa, A., M., Sawata, M., Mendonça, M., C., Padilha, F., F. *Beer Molecules and Its Sensory and BiologicalProperties: A Review. Molecules*. 2019, 24, 1568; doi:10.3390/molecules24081568

Izydorczyk, M. S. andEdney, M.*Barley: Grain-Quality Characteristics and Management of Quality Requirements. Cereal Grains*. 2017. 195–234. doi:10.1016/b978-0-08-100719-8.00009-7

Johnson, S., L., Kirk, R., D., Da Silva, N., A., Ma, H., Seeram, N., P., Bertin, M., J. *Polyphenol Microbial Metabolites Exhibit Gut and Blood–Brain Barrier Permeability and Protect Murine Microglia against LPS-Induced Inflammation. Metabolites*. 2019, 9, 78; doi:10.3390/metabo9040078

Khan, N., & Mukhtar, H. *Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. Nutrients.* 2018. 11(1), 39.doi:10.3390/nu11010039

Kivrak, Ş. Göktürk, T. Kivrak, I. Kaya, E. Karababa, E.*Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some Salvia species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. Food Science and Technology*. 2018. doi:10.1590/fst.32017

Kulichová, K. Sokol, J. Nemeček, P. Maliarová, M. Maliar, T. Havrlentová, M. Kraic, J. *Phenolic compounds and biological activities of rye (Secale cereale L.) grains. Open Chemistry*, 2019, 17: 988–999. Doi: doi.org/10.1515/chem-2019-0103

Liu, T., Li, Z., Li, R., Cui, Y., Zhao, Y. Yu, Z. *Composition analysis and antioxidant activities of the Rhustyphina L. stem. Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2019.doi:10.1016/j.jpha.2019.01.002

Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 8th ed. New York: John Wiley & Sons; 2013.

Li, H., and Wang, Z. *Comparison in antioxidant and antitumor activities of pine polyphenols and its seven biotransformation extracts by fungi. PeerJ*. 2017, 5, e3264.doi:10.7717/peerj.3264

Namvar, K. Salehi, E., M. Mokhtarian, N. *Total phenolic compounds and antioxidant activity of Stachysturcomanica.BioscienceJournal*. Vol 34. No 5. 2018. DOI: https://doi.org/10.14393/BJ-v34n5a2018-41517

Nisa, K., Rosyida, V. T., Nurhayati, S., Indrianingsih, A. W., Darsih, C., e Apriyana, W. *Total phenolic contents and antioxidant activity of rice bran fermented with lactic acid bacteria. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, 251, 012020.* doi:10.1088/1755-1315/251/1/012020

Oyenihi, A. B., & Smith, C. *Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success? Journal of Ethnopharmacology.* 2018. doi:10.1016/j.jep.2018.09.037

Owen , R. W. Giacosa, A. Hull, W. Haubner, E. R. Spiegelhalder, B. e Bartsch, H.. *"The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil," European Journal of Cancer, 2000*, vol. 36, no. 10, pp. 1235–1247. Doi: 10.1016/s0959-8049(00)00103-9

Palomino García, L. R., Biasetto, C. R., Araujo, A. R., & Bianchi, V. L. D. Enhanced *extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid state fermentation by penicillium purpurogenum. Food science and technology*, 2015 35(4), 704–711.doi:10.1590/1678-457x.6834

Piacentini, K., Rocha, L., Geovana, D., Carnielli Q.,, L., Corrêa, B. *Beer industry in Brazil: Economic aspects, characteristics of the raw material and concerns. KvasnyPrumysl*. 2018. 64. 284-286. 10.18832/kp201833.

Rangel, M.; Malpezzi, E. L. A.; Susini, S. M. M.; Freitas, J. C. *Hemolytic activity in extracts of the diatom Nitzsnhia*. ***Toxicon***,1997 v.35, 305-309. Doi: 10.1016/s0041-0101(96)00148-1

Rashid, N.Y.A., Jamaluddin, A., Ghani, A.A., Razak, D.L.A., Jonit, J., Mansor, A. and Manan, M.A. *Quantification of phenolic compounds changes by Aspergillus oryzae on rice bran fermentation. Food Research*, 2019,3, (2), 133 – 137. Doi: https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(2).122

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A.Pannala, M. Yang, C. *Rice-Evans Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay Free radical. Biology and Medicine*, 1999, 26, pp. 1231-1237. Doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

Ross, C. F., Hoye Jr, C., and Fernandez-Plotka, V. C. *Influence of Heating on the Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Seed Flour. Journal of Food Science*. 2011. 76(6), C884–C890. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02280.x

Rossi, J. A. J.; Singleton, V. L. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, v. 16, n. 3, p. 144-158.

Sajkowska-Kozielewicz, J. J., Kozielewicz, P., Barnes, N. M., Wawer, I., e Paradowska, K. *Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Activities and Total Polyphenol Contents of the Extracts of Geissospermum reticulatum Bark. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1–8.* doi:10.1155/2016/2573580

Salar, R. K., Purewal, S. S., & Bhatti, M. S. *Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with Aspergillus awamori MTCC-548. Resource-Efficient Technologies*, 2016, 2(3), 148–157. doi:10.1016/j.reffit.2016.08.002

Saleh, R. M., Kabli, S. A., Al-Garni, S. M., Al-Ghamdi, M. A., Abdel-Aty, A. M., & Mohamed, S. A. *Solid-state fermentation by Trichoderma viride for enhancing phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities in ginger. Letters in Applied Microbiology*. 2018. 67(2), 161–167.doi:10.1111/lam.13003

Sadh, P.K.,Saharan, P., Surekha and 1Duhan, J., S. *Bioaugmentation of phenolics and antioxidant activity of Oryza sativa by solid state fermentation using Aspergillus spp. International Food Research Journal*. 2017. 24(3): 1160-1166.

Shahidi, F., & Yeo, J. *Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. International Journal of Molecular Sciences,* 2018, *19(6), 1573*.doi:10.3390/ijms19061573

Shin, H.-Y., Kim, S.-M., Lee, J. H., Lim, S.-T. *Solid-state fermentation of black rice bran with Aspergillus awamori and Aspergillus oryzae: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. Food Chemistry*. 2019. 272, 235–241. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.174

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. *Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. Food Research International*. 2017, 101, 1–16.doi:10.1016/j.foodres.2017.09.026

Tanase, C. Cosarca†, S. Muntean, D. *A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark ofWoody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. Molecules* 2019, 24, 1182; doi:10.3390/molecules24061182

Tian, S., Sun, Y., Chen, Z., Yang, Y., & Wang, Y. *Functional Properties of Polyphenols in Grains and Effects of Physicochemical Processing on Polyphenols. Journal of Food Quality*, 2019, 1–8. doi:10.1155/2019/2793973

Wang, J., Chen, X., Chio, C., Yang, C., Su, E., Jin, Y., Qin, W. *Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the*

enzyme cocktail from Aspergillus niger. Bioresource Technology. V 274. 459-467. 2018.doi:10.1016/j.biortech.2018.12.029

Wang, Q., Gong, J., Chisti, Y., Sirisansaneeyakul, S. *Bioconversion of tea polyphenols to bioactive theabrownins by Aspergillus fumigatus. Biotechnology Letters*. 2014. DOI 10.1007/s10529-014-1632-0

Xu, L.-N., Guo, S., & Zhang, S. *Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains. FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(16).doi:10.1093/femsle/fny163

Yin, Z., Wu, W., Sun, C., Lei, Z., Chen, H., Liu, H., … Wu, H. *Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three Aspergillus species. International Journal of Food Science & Technology*,2017, 53(5), 1120–1130. 2017. doi:10.1111/ijfs.13675

Zhang, C., Suen, C. L.-C., Yang, C., Quek, S. Y. *Antioxidant capacity and major polyphenol composition of teas as affected by geographical location, plantation elevation and leaf grade. Food Chemistry*,2018, 244, 109–119. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.126.

CAPÍTULO 3- Produção, caracterização físico-química de lipase extracelular de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando o Bagaço de Malte como substrato e sua aplicação na síntese de ésteres de aroma

Resumo

Visando fontes de carbono e nutrientes alternativos na produção de enzimas por aplicação em fermentação em estado sólido através de microrganismos, este trabalho traz o emprego de resíduos cervejeiros para a produção de lipase microbiana por meio do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004. A produção de lipase se deu por menores tempos de fermentação, temperaturas mais brandas em relação a outros fungos do gênero *Aspergillus* relatados na literatura. A enzima purificada demonstrou uma termoestabilidade considerável mantendo sua atividade por um grande intervalo de tempo, assim como aumento de sua atividade na presença dos íons Ca^{2+} e inibição na presença de tail como íons metálicos, resistência a pH alcalino, boa taxa de imobilização perante o alginato de cálcio, demonstrando potencial em aplicações industriais.

Palavras chaves: *Lipase, Aspergillus, resíduos de malte, cervejaria, imobilização.*

3.1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres (Qamsari et al., 2011). As lipases são biocatalisadores de grande importância industrial, destacando-se as lipases de fonte microbianas devido as suas vantagens de obtenção , produção e purificação. Lipases obtidas a partir de cepas microbianas estão emergindo continuamente para atender às necessidades das indústrias farmacêutica e alimentícia como demonstrado recentemente, várias abordagens econômicas e eficientes estão sendo tentadas para aumentar a produção de lipases em cepas microbianas (Bharathi e Rajalaksmi, 2019).

As lipases microbianas podem ser obtidas por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa. A contraparte da FES é a fermentação submersa (FS), um processo no qual os microorganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Os processos biológicos realizados na FS têm vantagens notáveis em relação à instrumentação e controle (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), separação da biomassa após a fermentação,

mistura, aeração e escalonamento (Farinas, 2015). A FES imita o habitat natural da maioria dos fungos e mofos. Tem como vantagens a menor demanda de energia para a esterilização devido a menor atividade de água e desta forma se torna menos suscetível à contaminação bacteriana. Em relação aos produtos, permite maior produtividade enzimática para muitas enzimas, é menos suscetível à inibição do substrato e, portanto, permite maior concentração final dos produtos. Apresenta diversas vantagens ambientais, pois permite o uso de resíduos agroindustriais sólidos como substrato ou fonte de energia em sua forma natural e facilita o gerenciamento de resíduos sólidos, além de menor produção de águas residuais (Soccol et al., 2017).

Os fungos são uma importante fonte de enzimas para a indústria. Entre eles, membros do gênero Aspergillus têm sido amplamente utilizados em processos biotecnológicos. Neste trabalho apresentamos uma lipase produzida pelo microrganismo *Aseprgillus niger* ATCC 1004 utilizando como substrato de produção resíduos de cervejaria.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Substrato

Bagaço de malte foram coletadas na cidade de Jequié-BA (Região sudoeste, em 01 de julho de 2017, oriundo de microcervejaria da região). Após a coleta os grãos resíduas provindos do mosto da cerveja pilsen foram secos em estufa (Solab SL 102, Piracicaba, Brasil) a 40 °C por 24 h e moídos em um moinho de facas Wiley (ACB Labor, São Paulo, Brasil) até atingir o tamanho dos grânulos de 2 mm e armazenados a 4 °C até o momento da utilização.

3.2.2 Micro-organismo e inoculo

O *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizado neste trabalho foi doado pela Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, *Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ,* Rio de Janeiro, Brasil). O cultivo dos microorganismos foram feitos em placas de Petri utilizando meio PDA (Potato dextrose Agar) (SIGMA ALDRICH, São Paulo, Brasil) a 30 °C. A solução estoque foi armazenada a 10 ºC.

Em seguida frascos erlenmeyer (250 mL) com 20 mL de meio PDA estéril foram inoculados com 0,5 mL da suspensão de esporos obtida a partir da solução estoque por 7 dias em estufa (TE-317, Tecnal, Sao Paulo, Brazil) a 30 ºC.A coleta de esporos foi realizada pela adição de 20 mL de uma solução aquosa de 0,01% (v/v) de Tween 80 (Vetec – Rio de Janeiro - Brasil) e esferas de vidro estéreis aos frascos. A suspensão resultante foi então usada como inóculo, após o ajuste da quantidade de esporos para atingir as concentração final de 10^7 esporos por grama de resíduo seco, quantificada através da camera duplamente espelhada de NewBauer (Bioval L1000, São Paulo, Brazil).

3.2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

O substrato indutor utilizado em todos os experimentos foi somente o farelo seco de resíduos de grãos de cevada de um mesmo lote, submetido à esterilização em autoclave (Phonexi, São Paulo, Brasil) a 121ºC e 1,0 atm de pressão por 15 minutos. As fermentações foram realizadas com 10 g, em frascos erlenmeyer (250 mL) recobertos com tecido hidrofóbico. A quantidade de massa seca do substrato foi determinada por meio de um analisador de umidade (SHIMADZU, MOC63u, São Paulo, Brasil), tendo este a 98,0 ± 0,9% de massa seca.

Cada erlenmeyer foi inoculado com uma suspensão de esporos de concentração de 10^7 esporos. As fermentações foram realizados em uma incubadora microbiológica (TE-317, Tecnal, São Paulo, Brasil), variando concentrações de esporos, tempo e temperatura, de acordo com o delineamento experimental Doehrlet de três niveis. O substrato foi umedecido com solução tampão fosfato de sódio 50 mM (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (pH 7.0) no volume de 14,7 mL para atingir a umidade de 50%. A umidade de 50% foi determinada após vários testes.

Ao final das fermentações cada erlenmeyer foram adicionados 50 mL de solução tampão fosfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (50 mM/pH 7,0) aos substratos fermentados. As misturas foram homogeneizadas em um shaker (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil) a 200 *x g*a 35 ° C durante 20 min.Após esse período, as amostras foram mecanicamente prensadas e os líquidos extraídos foram centrifugados (CT-6000R; Cientec, Piracicaba, Brasil)a 5000 *xg*a 4 ºC por 10 minutos para remoções de sólidos mais finos; em seguida foram feitas filtrações à vácuo utilizando-se filtros de tamanhos de poros de 0,22µm (Millipore® Stericup™ filterunit) e os sobrenadantes denominados

extratos enzimáticos brutos foram utilizados para determinações das atividades enzimáticas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Deste modo, a produção de lipase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da FES foi avaliada inicialmente por meio da variação do tempo, temperatura e concentração de esporos.

3.2.4 Planejamento experimental Doehlert para a otimização das condições de produção da lipase fúngica

Para prever a produção de lipase sob quaisquer condições de tempo, temperatura e concentração de esporos no domínio experimental, utilizou-se o planejamento Doehlert com a metodologia de superfície de resposta (MSR). As variáveis tempo de fermentação (cinco níveis), temperatura (cinco níveis) e concentração de esporos (três níveis) foram avaliadas com três repetições no ponto central, levando a um total de 15 experimentos (Tabela 1). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A falta de ajuste do modelo aos dados experimentais foi estimada utilizando o software Statistica10.0 (StatSoft, EUA) através da análise de variância (ANOVA).

3.2.5 Determinação das atividades das lipases

A atividade da lipase foi determinada de acordo com Ferreira et al.(2017) com pequenas modificações. Duas soluções, A e B foram preparadas: solução A composta com 60 mg de p-nitrophenolpalmitato (p-NPP) (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) em 20 mL de álcool isopropílico (Synth, São Paulo, Brazil); e a solução B com 4 g deTriton X-100 (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) e 0.4 g de goma Arabica (Synth, São Paulo, Brazil) em 200 mL de 0.1 M tampão citrato-fosfato (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) (pH 7). Para o teste foram usados 0,150 mL de solução A, em 1,350 mL de solução B e 0,150mL do extrato enzimático purificado. As amostras foram incubadas em banho maria (SL 50/4A, Solab, São Paulo, Brazil) na temperatura de 40 °C por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada por espectofotometria (UV-340 G, Gehaka, São Paulo, Brazil) no comprimento de onda de 410 nm. U foi definido como a quantidade da enzima que liberou 1 μmol de p-nitrofenol por minuto

3.2.6 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração das proteínas foi feita pelo método de Bradford, utilizando 0,1 mL da amostra de enzima com 5 mL de solução de Bradford. As leituras foram feitas por espectofotometria no comprimento de onda de 595 nm. As analises foram realizadas em triplicata.

3.2.7 Purificação da lipase

3.2.7.1 Precipitação com sulfato de amonia

O procedimento de purificação para a lipase do *Aspergillus niger* envolveu duas etapas: Passo 1: Precipitação com sulfato de amónio

O extrato enzimático bruto obtido foi levado a uma saturação de 70% por adição de sulfato de amónio sólido e centrifugado a 5000 rpm durante 10 min depois de repousar em overnight. O precipitado, com elevada actividade amilase, foi ressuspenso em tampão fosfato citrato (pH 7,0) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) na proporção de 1: 3 (p / v) e armazenado a baixa temperatura.

3.2.7.2 Cromatografia de Sephadex G-100

O extracto enzimático bruto foi aplicado a uma coluna Sephadex G-100 (SIGMA ALDRICH, São Paulo, Brasil) (20 x 1,0 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (0,05 mol L^{-1}, pH 7,0), que também foi utilizada para eluir o produto. As frações de 1,5 mL foram recolhidas e dosadas quanto à concentração de proteínas e posteriormente a atividade de lipases, nas frações. O fator de purificação da enzima foi calculado como descrito na equação 1:

$$Fator\ de\ purificação = \frac{(Atividade\ especifica\ da\ lipase\ purificada)}{(Atividade\ especifica\ da\ lipase\ bruta)} \quad (1)$$

3.2.8 Temperatura e pH ótimos

Para a determinação do pH e temperatura ótima da atividade da lipase purificada, aplicou-se uma matriz Doehlert de duas variáveis, onde o pH foi estudado em cinco pontos, variando na faixa de 5 a 9, e a temperatura foi estudada em três pontos, variando

de 30 a 70°C (Tabela 4). Os erros experimentais foram avaliados a partir da replicação do ponto central. Os dados experimentais foram processados com o software Statistica 10.0. Os experimentos foram realizadas em ordem aleatória. O Statistica versão 10.0 foi utilizado para estimar a ausência de ajuste do modelo aos dados experimentais através da análise de variância (ANOVA).

3.2.9 Influência De Íons

Íons são importantes fatores para a atividade enzimática, eles podem tanto aumentar sua atividade, como diminuir a mesma. Para determinar a influência de sais na lipase, utilizou-se do extrato enzimático purificado com três sais inorgânicos divalentes, o $BaCl_2$, $CoCl_2$, o $CuCl_2$, $FeCl_2$ e o $CaCl_2$ nas concentrações de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 a fim de investigar a sua influência na atividade enzimatica.

3.2.10 Termoestabilidade

A termoestabilidade de uma enzima é um paramentro muito importante, enzimas que amantem a sua atividade em temperaturas elevadas por um determinado periodo de tempo tem ampla utilização industrial, afim de se investigar a termoestabilidade da lipaseobtida a partir da fermentação dos resíduos de cevada, o extrato foi submetido ao tratamento prévio em temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 graus durante os tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

3.2.11 Km e Vmax

Para a determinação dos parâmentros cinéticos da enzima, afim de medir a sua afinidade com o substrato, foi feito uma curva com 5 diferentes concentrações do *p*-NPP. As concentrações escolhidas foram de 0,015, 0,030, 0,045, 0,075 e 0,090 mg/mL.

3.2.12 Imobilização da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004

3.2.12.1 Encapsulação da lipase em arginato

Para a encapsulação da lipase, 0,15 gramas de arginato de sódio foram dissolvidos em 8,0 mL de água destilada. Uma solução enzimática de 0,2 mL preparada com 0,2 gramas de extrato concentrado (440.94 $U.g^{-1}$) foi adicionada à solução de

agianato de sódio, misturada até a formação do gel, com concentração final de argianato de sódio em 3% (m/v). Para a confecção das microesferas, o arginato foi coletado com o auxilio de uma bomba peristática sob o fluxo de 0,4 rpm. O gel foi gotejado numa solução de $CaCl_2$ 0,2 M em agitação suave por 1 hora. Após o tempo de agitação as microesferas foram filtradas e posteriormente lavadas duas vezes com$CaCl_2$ 0,05 M.

3.2.12.2 Reticulação da lipase em glutaraldeído

Para a reticulação da lipase três soluções de glutaraldeído foram preparadas em água destilada nas seguintes concentrações: 1, 2 e 3%(v/v). Foi adicionado 0,2 gramas do extrato concentrado (440 94 $U.g^{-1}$) de lipase em cada uma das soluções de glutaraldeído, obtendo 2,0 mL de solução enzimática mantida sob agitação constante (100 rpm) à 4 °C por 2 horas. Após esse tempo, a lipase reticulada foi adicionada ao arginato de sódio de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

3.2.12.3 Eficiência da imobilização

A solução de filtragem e as duas soluções de lavagem obtidas nos procedimentos de imobilização descritos nas seções 3.1.12.1 e 3.1.12.2 foram usadas para determinar a eficiência de imobilização da enzima. A eficiência da imobilização foi definida como a porcentagem de enzima total retida nas beads de argianato de cálcio e determinada conforme a equação abaixo:

$$Eficiêcia\ de\ imobilização = \frac{(Atividade\ inicial - atividade\ final)}{(Atividade\ inicial)} x\ 100 \quad (2)$$

3.2.13 Aplicação da lipase purificada

3.2.13.1 Condições de reação

A aplicação da síntese dos ésteres aromáticos foi feita segundo a metodologia de Comeau e Abbas (2003), com modificações. As misturas de reação foram compostas a partir de 5ml de hexano (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil) como meio de reação, ácido acético glacial (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil), álcool isoamilico (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil), álcool metílico (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil), Álcool etílico (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil), álcool isopropílico (Vetec – Rio de Janeiro – Brasil) e álcool butílico

(Vetec – Rio de Janeiro – Brasil) em concentrações equimolares (0,15 mol), preparação enzimática (0,3 g da lipase imobilizada contendo atividade igual a 391.92 U / g e 0,3 g da lipase purificada contendo atividade igual a 440.94 U / g). As reações foram realizadas a 50 ° C com agitação (150 RPM) durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 5 horas.

3.2.14 Analise da reação

Alíquotas da mistura de reação foram retiradas periodicamente e o conteúdo de ácido residual foi testado por titulação contra hidróxido de potássio (0,02 N) usando fenolftaleína como indicador e etanol como agente de extinção. A esterificação percentual foi calculada a partir dos valores obtidos para as amostras e o branco para o teste, foram confirmados por análises cromatográficas das amostras em um cromatógrafo a gás CG Agilent Technologies 7890B equipado com uma coluna Agilent HP-5ms modelo19091S-433 (30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro). O nitrogênio foi usado como gás de arraste com uma vazão de 1 ml min^{-1}. O forno da coluna, as portas de injeção e as temperaturas do detector foram mantidas inicialmente a 40°C por 10 minutos, sendo alimentado de 3° por minuto até 240 ◦C, onde fora mantido por 30 minutos.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Condições ótimas de fermentação

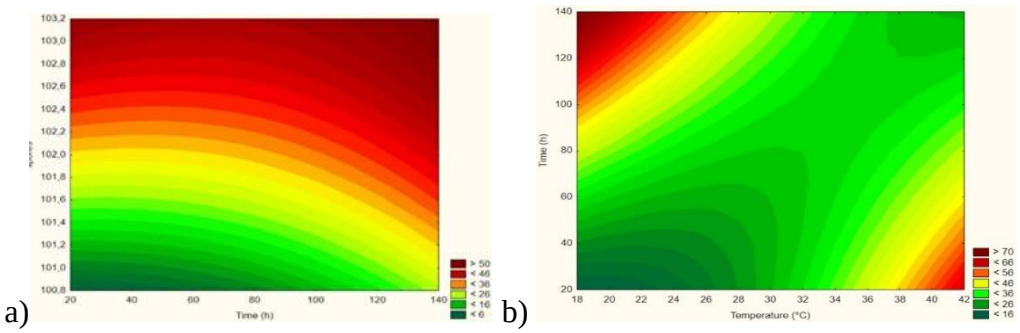
As condições ótimas para a obtenção da lipase foram expressas na tabela, sabe se que diversas variáveis interferem na produção de enzimas, como pH, temperatura, umidade, concentração de esporos, tempo de fermentação.

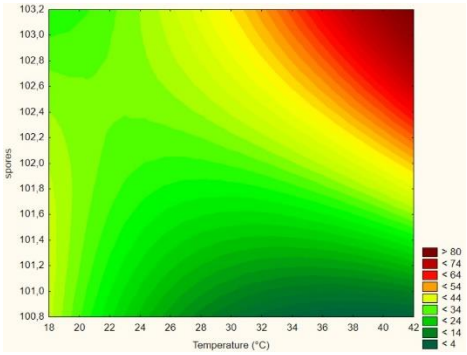
Tabela 1- Palnejamento experimental para a otimização da produção de lipases por *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Experimentos	**Temperatura (°C)**	**Tempo (H)**	**Esporos (10^7)**	**Atividade enzimática experimental (U)**	**Atividade enzimática Predita (U)**
1	**40**	72	$1{,}0x10^7$	10.156 ± 0,126	11.278
2	**35**	48	$0{,}5x10^7$	40.052 ± 0,178	39.910
3	**35**	48	$2{,}0x10^7$	63.438 ± 0,525	62.779
4	**35**	96	$0{,}5x10^7$	39.896 ± 0,214	35.549
5	**35**	96	$2{,}0x10^7$	53.021 ± 0,263	55.923
6	**30**	24	$1{,}0x10^7$	10.885 ± 0,164	10.563
7[a]	**30**	72	$1{,}0x10^7$	12.031 ± 0,132	14.010
7[b]	**30**	72	$1{,}0x10^7$	12.604 ± 0,175	14.010
7[c]	**30**	72	$1{,}0x10^7$	17.396 ± 0,312	14.010
8	**30**	120	$1{,}0x10^7$	22.917 ± 0,195	23.238
9	**25**	48	$0{,}5x10^7$	25.000 ± 0,191	26.429
10	**25**	48	$2{,}0x10^7$	33.021 ± 0,193	33.035
11	**25**	96	$0{,}5x10^7$	35.417 ± 0,235	38.475
12	**25**	96	$2{,}0x10^7$	44.844 ± 0,152	42.585
13	**20**	72	$1{,}0x10^7$	34.375 ± 0,214	33.252

As condições ótimas para a produção das lipases utilizando os resíduos de cevada como substrato em FES para o fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004, foi encontrado nas condições de temperaturas acima de 28 °C, e tempos de fermentação a partir de 48 horas, a melhor concentração de esporos se encontra na região de $1{,}11x10^7$ como mostra a Figura 1.

Figura 1- Superficie de resposta esporos *versus* tempo



c) 

a)Superficie de resposta tempo *versus* esporos.

b) Superficie de resposta tempo *versus* etemperatura.

c) Superficie de resposta temperatura *versus* esporos.

As condições admitidas como ótimas foram de temperatura de 30°C, pois os fungos filamentosos tem sua temperatura padrão de crescimento nessa faixa, 48 horas de fermentação e esporos de $1{,}11 \times 10^7$ esporos, nesta condições a atividade experimental encontra no extrato bruto foi de 67,837 ± 1,53 U, enquanto que o predito foi de 65,771 U. Em outros trabalhos, as condições ótimas para a produção de lipase por *Aspergillus* foram encontradas em faixas próximas, como demonstrado por uma fermentação com o *Aspergillus niger*, utilizando farelo de casca de arroz, farelo de trigo e farelo de soja com as condições de fermentação em 28 ° C, e concentração inicial de esporos de 4×10^6 em 168 horas de fermentação, obteve uma atividade de lipase de 19,844 U (Costa et al., 2017).

O modelo experimental pode ser descrito pela equação:

$$U = -22002{,}3 - 167{,}9T + 0{,}1T^2 - 6{,}2t + 460{,}9S - 2{,}4S^2 + 1{,}6TS - 0{,}1tS$$

Onde T é a temperatura em graus Celsius, t é o tempo em minutos e S é a concentração de esporos.

Tabela 2- ANOVA para otimização da produção da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Fator de variação	**SQ**	**GL**	**MD**	**F calculado**	**F Tabelado**
Regressão	3677,6	9	408,6	31,74	4,772
Resíduos	64,35	5	12,87		
Falta de ajuste	46,99	3	15,66	1,805	19,16
Erro puro	17,35	2	8,678		

Erro total	3741,9	14
R^2	0,980	

As analises estatísticas expressadas na Tabela 2 demonstram que o F calculado da regressão (31,74) foi maior que o F tabelado (4,772) em um intervalo de confiança de 95%, isso implica que a regressão foi significativa, desta forma, o planejamento experimental aplicado, está de acordo com os dados obtidos, apresentando uma boa reprodutibilidade. Enquanto que para a falta de ajuste, o F calculado (1,805) foi menor que o F tabelado (19,16), isso demonstra que a falta de ajuste não foi significativa.

3.3.2. Purificação da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004

A lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004 em SSF de resíduo de cevada foi parcialmente purificada em sulfato de amônia, encontrando um aumento de 10,27 vezes na atividade específica em comparação com a lipase bruta, com uma recuperação de 46.66%. A purificação em cromatografia de filtração em gel Sephadex® G-100 apresentou um aumento de 10.27 vezes na atividade específica, no entanto, a recuperação final foi de 46.66%. Diferentes métodos de purificação influenciam diretamente na atividade especifica da lipase, podendo aumentar ou diminuir de acordo com o método aplicado (Liu et al., 2015). A atividade da lipase purificada do *Aspergillus niger* ATCC 1004 encontrada foi de 440,94 ± 10,89, apresentando uma taxa de purificação de 10,27 e fator de recuperação de 44,6%, resultado é superior ao encontrado na purificação de uma lipase do *Aspergillus japonicus* LAB01 que foi de 3,91 e obteve um fator de recuperação de 44,2% e próximo ao encontrado na purificação de uma lipase de *Aspergillus fumigatus* de 6,96 e fator de recuperação de 11,2% (Souza et al., 2014, Mehta et al, 2018). O perfil de purificação é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Purificação da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Etapas de purificação	**Proteína ($g\ mL^{-1}$)**	**U[a]**	**$U.g^{-1}$**	**Fator de purificação**	**Fator de recuperação (%)**
Extrato bruto	1.606	68.90	42.899 ± 1.53	1	100

Precipitação com 70% de sulfato de amônia	0.197	27.77	140.42± 7.65	2.07	-
Sephadex® G-100	0.0247	10.88	440.94± 10.89	10.27	46.66

[a] Uma unidade de atividade enzimática foi a quantidade da enzima que liberou 1 μmol de p-nitrofenol (ε410nm = 15.000 M^{-1} cm^{-1}) de p-NPP por minuto.

Os dados da Tabela 3, demonstram que a lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004, apresentou um fator de purificação de 6,50, demonstrando sua pureza. Além do aumento de sua atividade especifica as lipases puras não tem interferentes em seu meio, podendo desta forma aumentar a sua termoestabilidade, tolerância a solventes orgânicos, maior resistência a pHs mais agressivos. Lipases purificadas são amplamente aplicadas na indústria alimentícia na transesterificação de gorduras, modificação de acilglicerideos, síntese de ésteres aromáticos, dentre outros (Melani et al., 2019)

3.3.3. pH e temperatura ótimas

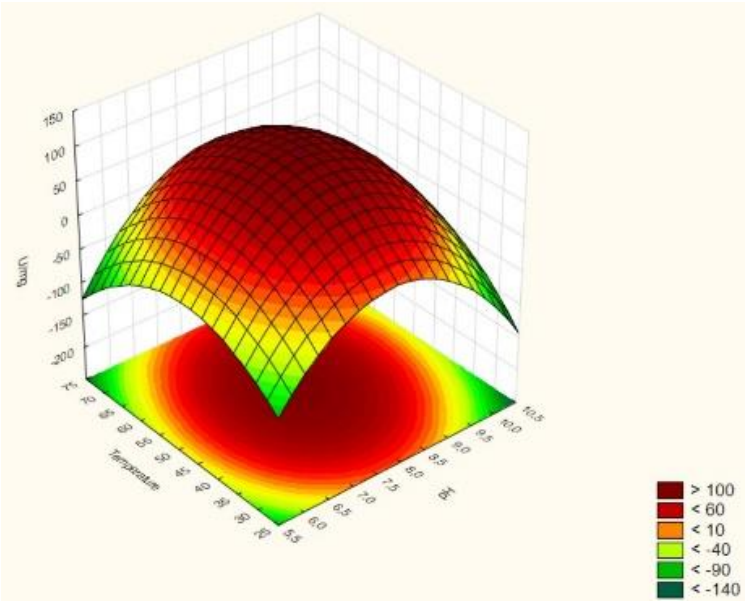
Para a caracterização do pH e temperatura ótimos de funcionamento da enzima lipase purificada do *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi aplicado um planejamento experimental Doehrlet de duas variáveis, variando pH e temperatura como mostra a Tabela 4.

Tabela 4- pH e temperatura ótimos da lipase purificada do *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Experimento	pH	Temperatura	Atividade $U.g^{-1}$	Atividade Predito
1	7	70	108.36 ± 5,01	109.3817
2	9	70	157.05 ± 7,89	156.0283
3	6	50	90.08 ± 4,97	89.0583
4a	8	50	463.04 ± 12,01	451.5633
4b	8	50	450.75 ± 12,89	451.5633
4c	8	50	440.90± 12,34	451.5633
5	10	50	69.23 ± 2,03	70.2517
6	7	30	132.61 ± 6,79	133.6317
7	9	30	69.20 ± 5,99	68.1783

Foi aplicado um planejamento experimental Doehrlet em uma faixa de pH de 3 a 7, porém a maior atividade encontrada foi de 49,07 ± 4,67 $U.g^{-1}$, indicando que o pH ótimo não se encontrava em uma faixa ácida a neutra, depois foi testada em uma faixa neutra a básica, como mostra a Tabela 4. Os resultados obtidos demonstra que a lipase tem um pH ótimo em 8,0 enquanto que a temperatura ótima é de 50 °C. A Figura 2 demonstra a região ótima estatística de pH e temperatura para a lipase.

Figura 2- Superfície de resposta de pH e temperatura ótimos da lipase.



A atividade enzimática encontrada no ponto ótimo foi de 440.94 ± 10.89 $U.g^{-1}$ enquanto que o valor predito foi de 451.56, com uma diferença entre eles de cerca de 2,40 %, apresentando um R^2 igual a 0,97. As analises estatísticas demonstram que o modelo usado apresenta uma regressão significativa, como expressado pelo F calculado (24,97) que é maior que o F tabelado (9,01), mostrando que os experimentos apresentam uma boa reprodutibilidade. Os dados experimentais não apresentaram falta de ajuste como pode ser observado com o F calculado (0,00269) sendo muito menor que o F tabelado (8,52). O modelo experimental pode ser descrito pela equação:

$$U.g^{-1}=-6451,74 + 50,03pH -0,60pH^2 + 1412,87T -92,98T^2 + 1,40pHT.$$

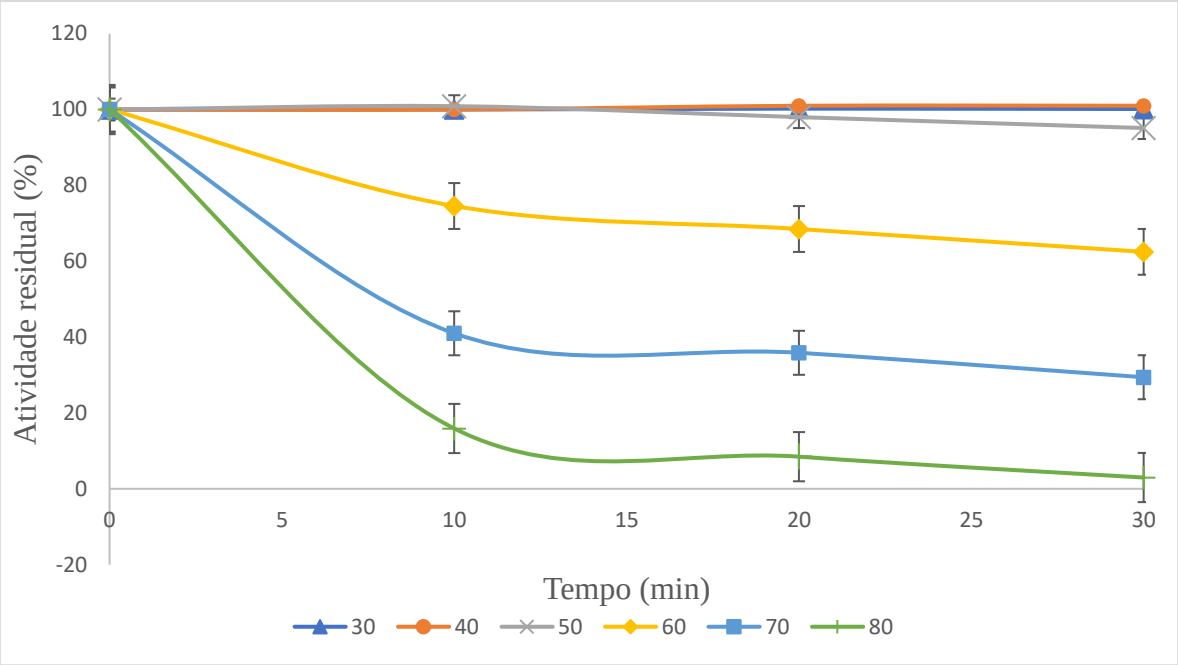
Temperaturas semelhantes são encontradas em lipases purificadas de *Aspergillus terreus* NCFT 4269, este apresenta a atividade máxima na temperatura de 50°C e pH ótimo em 6,0 (Sethi et al., 2016). Em outros estudos lipases de *Aspergillus* encontra-se

uma faixa de pH entre 6,3 a 7,7 enquanto que a faixa de temperatura é mais ampla, variando de 28°C a 42°C (Colla et al., 2015). Lipases alcalinas podem ser empregadas em uma serie de reações de interesse industrial. A sua tolerância a pHs básicos a torna de importante aplicação em sínteses de pigmentos de ampla aplicação utilizados na indústria de cosméticos (Huang et al., 2018).

3.3.4. Termoestabilidade

As lipases são biocatalisadores bem conhecidos usados em vários processos industriais. Assim, como com outras enzimas, as mudanças nos parâmetros termodinâmicos podem induzir mudanças estruturais que podem aumentar, diminuir ou até inibir sua atividade catalítica (Nascimento et al., 2019). A Figura 3 apresenta os resultados obtidos, demonstrando que a lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004 é termoestável na temperatura de 50°C, pois está sofre uma perca de atividade de 21.57 ± 10.89 $U.g^{-1}$, indo para 419.37 $U.g^{-1}$, mantendo 95.11% da sua atividade original mesmo após 30 minutos de incubação a esta temperatura. A lipase foi mantida durante 8 horas na temperatura de 50 °C, está continuou com uma atividade de 398,83 $U.g^{-1}$ mantendo cerca de 90,45% de sua atividade original, mostrando se altamente termoestável nessa temperatura**,** esse resultado no processo de aplicação industrial demonstra um bom desempenho, pois a lipase mantém sua atividade em uma temperatura elevada por um longo período de tempo, não sendo necessário o gasto de mais enzimas no processo, principalmente em produção de biodiesel (Yang et al., 2016)**.** Esse resultado está de acordo com a literatura, que relata lipases de *Aspergillus sp*. de forma livre apresentam temperaturas ótimas entre 30 e 60 ° C (Contesini et al., 2010; Mhetras et al., 2009; Romero et al., 2012) Resultados semelhantes são encontrados com lipase de *Aspergillus westerdijkiae*, que apresenta estabilidade nas temperaturas de 40 e 50 °C durante 30 minutos e apresenta estabilidade nessa temperatura mesmo após 6 horas de incubação (De Castro et al., 2017). A lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004 apresenta resultados melhores do que a enzima do *Aspergillus niger* IOC 3677, que tem sua atividade máxima em 37 °C, como descrito na literatura (Zubiolo et al., 2014).

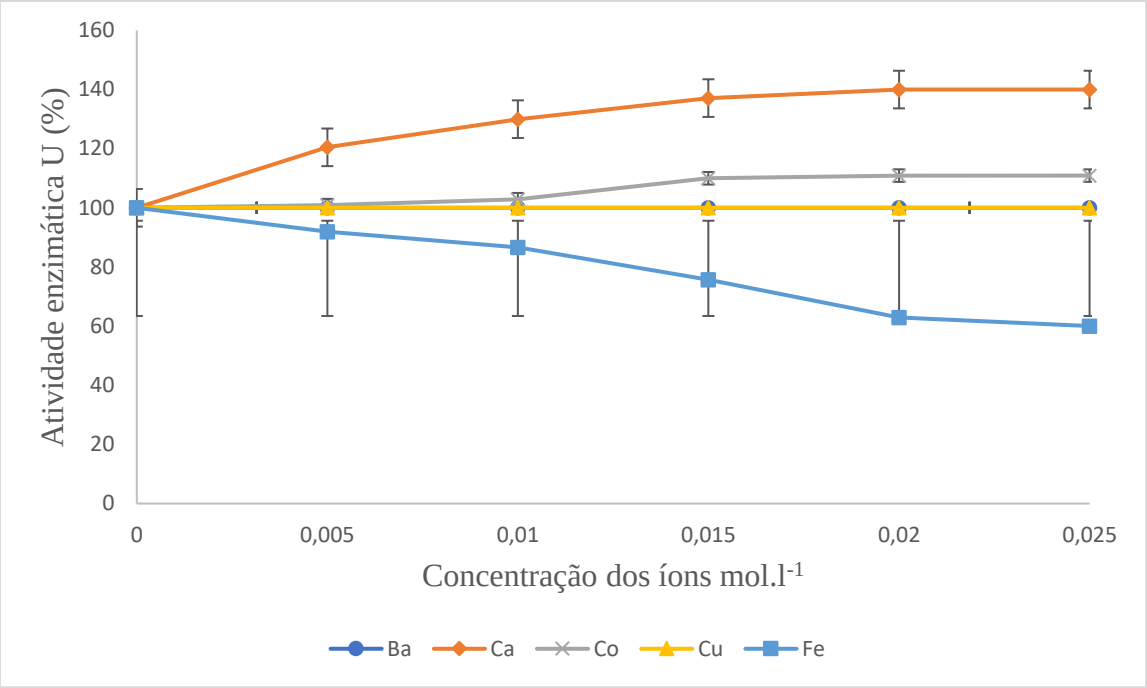
Figura 3- Termoestabilidade da lipase do *Aspergillus niger*ATCC1004.



3.3.5. Influência de íons

A lipase é uma das enzimas industriais mais utilizadas e tem uma variedade de aplicações, podendo ser empregada em diferentes processos indústrias. Elas não dependem de íons como cofatores, porém alguns íons podem aumentar ou diminuir sua atividade (Sharma et al., 2016). Como demonstrado na Figura 4, a lipase se torna muito ativa com a presença do íon divalente Ca^{2+} na concentração de 0,02 mol, aumentando a sua atividade de 440.94 ± 10.89 $U.g^{-1}$ para 617.32, aumentando a sua atividade em 40%, após essa concentração não há aumento, o íon divalente Co^{2+} aumenta de forma significativa a atividade da lipase do *Aspergillus niger* ATCC1004 . Enquanto que Ba^{2+} não interfere em sua atividade, já os íons Cu^{2+} e Fe^{2+} interferem de forma negativa na atividade, como relatado em outros estudos resultados semelhantes são encontrados em lipase de *Aspergillus niger* AN0512, onde ocorre um aumento da atividade na presença do Ca^{2+} e diminuição na presença do Fe^{2+} (Liu et al, 2015). Concordando com resultados de lipases de *Aspergillus flavus* PW 2961, que também teve o aumento em sua atividade por meio do Ca^{2+} (Kareem et al., 2017).

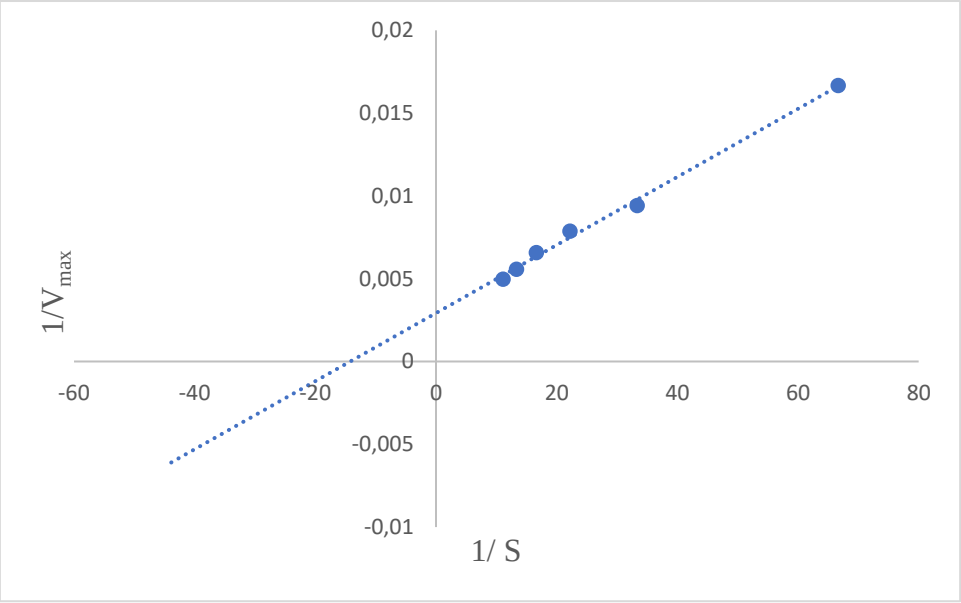
Figura 4- Influência de íons metálicos na atividade da lipase purificada do *Aspergillus niger* ATCC1004.



3.3.6. Parâmetros cinéticos da lipase purificada

As taxas de reação inicial da hidrólise do P-NPP foram avaliadas para lipase purificada usando diferentes concentrações de substrato(0,015 a 0,090 mg/mL). Os dados cinéticos para a hidrólise do P-NPP foram adaptados a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros, isto é, a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a taxa máxima de reação(V_{max}), das lipase purificada foram calculadas através de um gráfico Lineweaver – Burk como expresso na Figura 5. Valores elevados da constante de Michaelis-Menten (Km) indicam uma baixa afinidade para com substrato, ou seja, uma maior concentração desubstrato é necessário para atingir metade da atividade máxima (Gupta et al., 2008). Os valores encontrados para Km da lipase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 foram de 2,9 mM para o K_m e 100 mmol.min^{-1} para o V_{max}. Os resultados se demonstraram superiores a da lipase do *Apsergillus furmigatus* com um K_m de 9,89 mM e um V_{max} de 10 mmol.min^{-1} (Mehta et al., 2018) Demonstram ser superiores ao encontrado em uma lipase de *Aspergillus tamarii* JGIF06 com K_m de 330.04 mM e V_{max} de 53,690 mmol.min^{-1} (Das et al., 2016).

Figura 5- Curva de Lineweaver-Burk para parâmetros cinéticos.



3.3.7. Imobilização da lipase do *Aspergillus niger* ATCC 1004

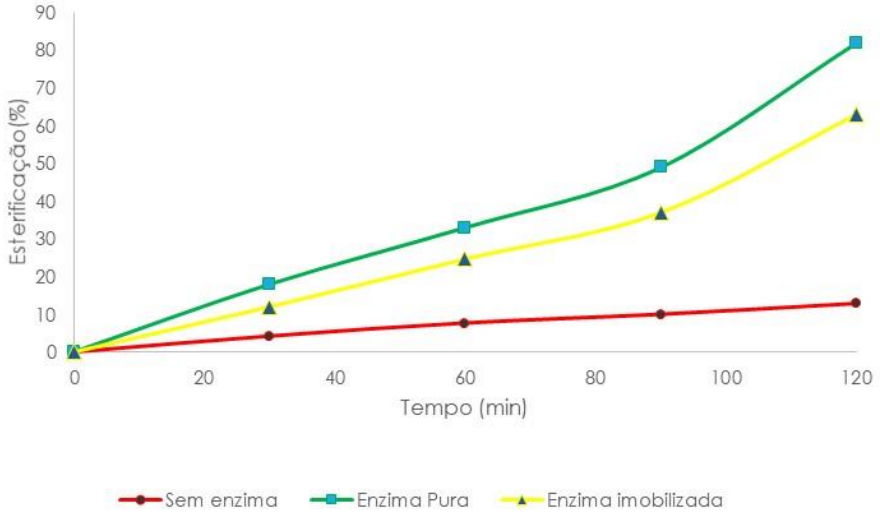
O aprisionamento de células no gel de alginato é popular devido à exigência de condições amenas e procedimento simples (Qader e Aman, 2012). A imobilização enzimática fornece uma excelente base para aumentar a disponibilidade da enzima no substrato com maior rotatividade durante um período de tempo considerável (Datta et al., 2012). A matriz de alginato é muito usada na imobilização de enzimas como lipase por conta de sua alta taxa de eficiência (Chandorkar et al., 2014). A atividade da lipase sem imobilizar na matriz de alginato de cálcio foi de 440.94 $U.g^{-1}$, após a imobilização apresentou uma atividade especifica de 391.82 $U.g^{-1}$. Portanto, a imobilização de *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi investigada na matriz de alginato de Ca, a taxa de eficiência foi de 88,86 indicando que a enzima imobilizada com gelatina foi capaz de manter boa atividade, pois a atividade se encontra com atividade superior a 80% (Zhao et al., 2018).

3.3.8 Síntese de compostos aromáticos

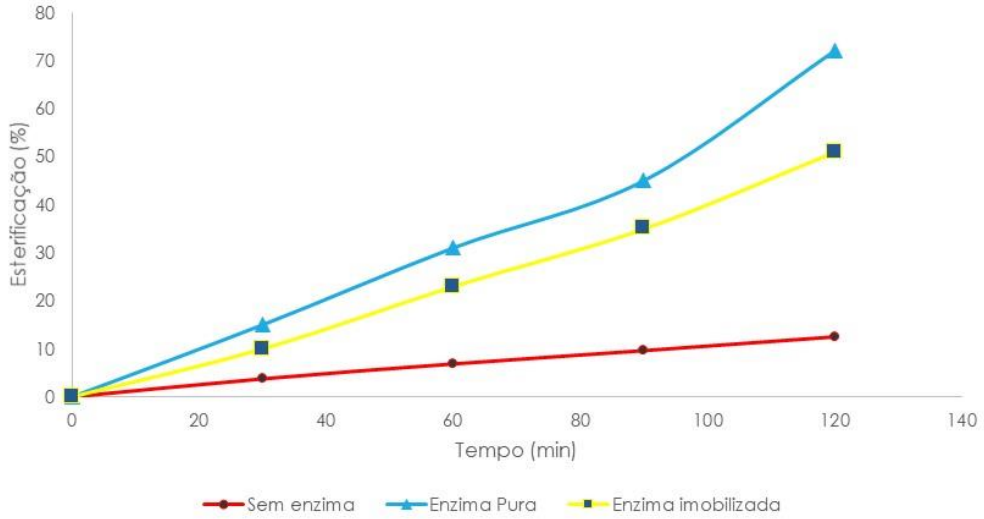
A lipase não demonstrou afinidade na síntese de ésteres a partir de álcoois contendo de 3 a 1 carbono, pois a porcentagem de esterificação foi igual ao do controle, sendo testado álcoois com 4 carbonos, a taxa de esterificação foi superior ao controle. A lipase purificada em estado e a lipase imobilizada do *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi capaz de catalisar a síntese dos ésteres acetato de isoamila e do acetato de butila a partir

de um ácido e de diferentes álcoois nas condições utilizadas. Os rendimentos da conversão variaram acentuadamente com a natureza dos substratos em decorrência do tempo como observado na Figura 6.a.

Figura 6- Análise da esterificação do acetato de isoamila e do acetato de butila em função do tempo.



a)



b)

a) Análise da esterificação do acetato de isoamila em função do tempo
b) Análise da esterificação do acetato de butila em função do tempo

Os rendimentos mais altos e rápidos foram de 82%, observados com acetato de isoamila, na lipase purificada livre enquanto que na lipase imobilizada essa taxa foi de 63%, em relação ao branco o encontrado foi uma diferença de 19% entre a enzima pura

e a imobilizada, em incubação de tempo muito curto de 2 h, sendo que após esse tempo não houve mudança na esterificação. As taxas de esterificação para a formação do acetato de butila são apresentados na Figura 6.b.

O acetato de butila apresentou uma taxa de conversão para a lipase pura de 72% de conversão, enquanto que a lipase imobilizada foi encontrado um valor de 51% de conversão em relação ao branco. Apresentando uma diferença de esterificação de 21% da lipase lipase pura em relação com a imobilizada.

3.4. Conclusão

O resíduo de cervejaria se mostrou uma promissora fonte de carbono e nutrientes para o micro-organismo *Aspergillus niger* ATCC 1004 para a produção de lipase. Apresentando baixo custo de produção, rápida produção quando comparado com outras fontes tais como plantas e animais. Tendo em vista que a lipase produzida se demonstrou promissora, apresentando baixo tempo de produção, apresentando uma termoestabilidade considerável, bem como resistência em pH básico e elevada resistência perante íons metálicos. E com sua aplicação biotecnológica pode levar a processos potencialmente mais baratos e eficazes que os tradicionais, justificando assim a busca por possíveis aplicações desta enzima em biocatálise. As metodologias de superfície de resposta empregadas no presente trabalho demonstraram ampla aplicação, desde a determinação das condições ótimas de fermentação a aplicação em pH e temperatura ótima, apresentando excelentes resultados experimentais.

3.5. Referências

Abbas, H., e Comeau, L. *Aroma synthesis by immobilized lipase from Mucor sp. Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5), 589–595. doi:10.1016/s0141-0229(03)00022-x

Bharathi, D., and Rajalakshmi, G. *Microbial lipases: An overview of screening, production and purification*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019, 101368. Doi: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368.

Chandorkar. V., Gomashe, A. V., Shrungi, P. *Production of lipase by Immobilized Cells of Aspergillus niger. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2014,3(8), 703-707. ISSN: 2319-7706

Costa, T. M., Hermann, K. L., Garcia-Roman, M., Valle, R. de C. S. C., & Tavares, L. B. *B. lipase production by Aspergillus niger grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2017, 34(2), 419–427. doi:10.1590/0104-6632.20170342s20150477

Colla, L. M., Ficanha, A. M. M., Rizzardi, J., Bertolin, T. E., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates ofAspergillusthrough Solid-State and Submerged Fermentation. BioMedResearchInternational, 2015, 1–9. doi:10.1155/2015/725959

Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., Nascimento, M. G., Carvalho, P. O.*Aspergillus sp. Lipase: potential biocatalyst for industrial use*. J Mol Catal B Enzym. , 2010, 67:163–171. doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.021

Das, A., Shivakumar, S., Bhattacharya, S., Shakya, S., & Swathi, S. S. *Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from Aspergillus tamarii JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric*. 3 Biotech, 2016, 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0449-z

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech, 2012, 3(1), 1–9.* doi:10.1007/s13205-012-0071-7

De Castro, F. F., Pinheiro, A. B. P., Nassur, C. B., & Barbosa-Tessmann, I. P. *Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of Aspergillus westerdijkiae. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,2017 10, 321–328. doi:10.1016/j.bcab.2017.04.009

Farinas, C. S. *Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015, 52, 179-188. doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092

Gupta, S., Yogesh, Javiya, S., Bhambi, M., Pundir, C. S., Singh, K., and Bhattacharya, A. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and

polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42(2), 145–151. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.10.018

Huang, J., Yang, Z., Zhu, R., Qian, X., Wang, Y., Li, Y., e Li, J. *Efficient heterologous expression of an alkaline lipase and its application in hydrolytic production of free astaxanthin. Biotechnology for Biofuels,* 2018, 11(1). doi:10.1186/s13068-018-1180-2

Kareem, S. O., Adebayo, O. S., Balogun, S. A., Adeogun, A. I., andAkinde, S. *Purification and Characterization of Lipase from Aspergillus flavus PW2961 using Magnetic Nanoparticles. Nigerian Journal of Biotechnology, 2017, 32(1), 77.* doi:10.4314/njb.v32i1.11

Liu, G., Hu, S., Li, L., and Hou, Y. *Purification and Characterization of a Lipase with High Thermostability and Polar Organic Solvent-Tolerance from Aspergillus nigerAN0512. Lipids, 2015, 50(11), 1155–1163.* doi:10.1007/s11745-015-4052-6

Mehta, A., Grover, C., Gupta, R. *Purification of lipase from Aspergillus fumigatus using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization. Journal of Basic Microbiology,*2018, 1800129. doi:10.1002/jobm.201800129

Melani, N. B., Tambourgi, E. B., e Silveira, E. *Lipases: From Production to Applications. Separation & Purification Reviews,* 2019, 1–16. doi:10.1080/15422119.2018.1564328

Mhetras, N. C., Bastawde, K. B., & Gokhale, D. V. *Purification and characterization of acidic lipase from Aspergillus nigerNCIM 1207. Bioresource Technology,*2009, 100(3), 1486–1490. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.016

Nascimento, P. A. M., Picheli, F. P., Lopes, A. M., Pereira, J. F. B., & Santos-Ebinuma, V. C. *Effects of cholinium-based ionic liquids on Aspergillus niger lipase: Stabilizers or inhibitors*. Biotechnology Progress, 2019, e2838. doi:10.1002/btpr.2838

Qamsari, E. M., Kermanshahi, R. K., Moosavi-nejad, Z. *Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, Pseudomonas aeruginosa KM110*. Iranian Journal of Microbiology, 2011, 3, p.92-98.

Romero, C. M., Pera, L. M., Loto, F., Vallejos, C., Castro, G., &Baigori, M. D. *Purification of an organic solvent-tolerant lipase from Aspergillus niger MYA 135 and its application in ester synthesis. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* 2012, 1(1), 25–31. doi:10.1016/j.bcab.2011.08.013

Sethi, B. K., Nanda, P. K., & Sahoo, S. *Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by Aspergillus terreusNCFT 4269.10. Brazilian Journal of Microbiology,2016, 47(1), 143–149.*doi:10.1016/j.bjm.2015.11.026

Shah Ali Ul QadereAfsheen Aman. *Low molecular weight dextran: Immobilization of cells of LeuconostocmesenteroidesKIBGE HA1 on calcium alginate beads*. CarbohydratePolymers. 2012, 87 (4, 1), 2589-2592. Doi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.046

Sharma, A., K., Sharma, V., Saxena, J. *Characterization of Lipase from Wild (LPF-5) and Mutant (HN1) Strain of Aspergillus niger*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016, Volume 5, Number 11, pp. 681-690. doi.org/10.20546/ijcmas.2016.511.079

Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. de S. (2017). *Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation,* 2017, 1(1), 52–71. doi:10.1016/j.biori.2017.01.002

Souza, L. T. A., Oliveira, J. S., dos Santos, V. L., Regis, W. C. B., Santoro, M. M., & Resende, R. R. *Lipolytic Potential of Aspergillus japonicusLAB01: Production, Partial Purification, and Characterisation of an Extracellular Lipase*. BioMed Research International, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/108913

Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., e Yan, Y. *A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from Burkholderia ubonensis SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 2016,126, 76–89. doi:10.1016/j.molcatb.2016.02.005

Zhao, K., Cao, X., Di, Q., Wang, M., Cao, H., Deng, L., Tan, T. *Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase.* Renewable Energy, 2017, 103, 383–387. doi:10.1016/j.renene.2016.11.035

Zubiolo, C., Santos, R. C. A., Carvalho, N. B., Soares, C. M. F., Lima, A. S., & de Aquino Santana, L. C. L. *Encapsulation in a sol–gel matrix of lipase from Aspergillus niger obtained by bioconversion of a novel agricultural residue*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2014, doi:10.1007/s00449-014-1151-3