

Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido

RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves

Resumo

A utilização de enzimas aumenta a especificidade e eficiência de processos industriais resultando em ganhos econômicos. As enzimas são naturais, não tóxicas e específicas. Uma das alternativas para a produção de enzimas a baixos custos está no emprego de subprodutos agroindustriais como substratos para o cultivo de microrganismos em estado sólido. A sustentabilidade cada vez mais atrai a atenção das indústrias de alimentos e bebidas, como por exemplo na indústria cervejeira, a qual produz toneladas de subprodutos anualmente. O descarte inadequado destes subprodutos pode criar uma série de problemas ambientais. Das tecnologias empregadas para reduzir ou minimizar esses subprodutos, a utilização de processos biológicos é uma das alternativas viáveis, como exemplo temos o uso de biomassa para cultivo de fungos na produção de enzimas. Das várias enzimas produzidas, as amilases são amplamente estudadas devido à importância na hidrólise do amido. O fungo *Aspergillus niger* tem sido utilizado para produção de amilase. Ele apresenta como vantagem facilidade de manipulação e habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo, com rendimentos elevados. Partindo deste contexto, o presente trabalho teve o objetivo estudar a produção da enzima amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e subprodutos oriundos da indústria artesanal cervejeira como substrato. A metodologia aplicada foi a de produção de enzimas amilolíticas por fermentação em estado sólido, utilizando como substrato bagaço de malte de cevada adicionado de solução de sais (sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L). A determinação da atividade amilolítica foi feita pelo método descrito por Okolo *et al.* (1995) e os resultados foram analisados estatisticamente através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados da produção da amilase por fermentação em estado sólido demonstraram através das análises, que o modelo se ajusta a um linear, tendo como variável significativa a umidade, sendo as melhores condições de trabalho umidade de 50%, tempo de fermentação de 120h e ausência de agitação.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, bagaço de malte, amilase, bioprocessos

Abstract

The use of enzymes increases the specificity and efficiency of industrial processes resulting in economic gains. Enzymes are natural, non-toxic and specific. One of the alternatives for the production of enzymes at low costs is the use of agro-industrial by-products as substrates for the cultivation of microorganisms in solid state. Sustainability is increasingly attracting the attention of the food and beverage industries, such as the beer industry, which produces tons of by-products annually. The improper disposal of these by-products can create a series of environmental problems. Of the technologies used to reduce or minimize these by-products, the use of biological processes is one of the viable alternatives, as an example we have the use of biomass for the cultivation of fungi in the production of enzymes. Of the various enzymes produced, amylases are widely studied due to their importance in the hydrolysis of starch. The fungus *Aspergillus niger* has been used to produce amylase. It has the advantage of easy handling and the ability to ferment a wide variety of low-cost raw materials with high yields. From this context, the present work aimed to study the production of the enzyme amylase by solid state fermentation using the fungus *Aspergillus niger* and by-products from the craft beer industry as a substrate. The methodology applied was the production of amylolytic enzymes by fermentation in solid state, using as substrate barley malt bagasse added with a solution of salts (ammonium sulfate 3.3 g / L and potassium phosphate 1.5 g / L). The determination of amylolytic activity was carried out by the method described by Okolo et al. (1995) and the results were analyzed statistically through the Action Stat Program, where estimates of the effects of the variables and their interactions were made, considering a significance level of 95%. The results of the production of amylase by fermentation in solid state demonstrated through the analyzes, that the model adjusts to a linear one, with moisture as the significant variable, with the best working conditions being 50% humidity, fermentation time of 120h and absence stirring.

Keywords: *Aspergillus niger*, malt bagasse, **amylase**, bioprocesses

Resumen

El uso de enzimas aumenta la especificidad y la eficiencia de los procesos industriales dando como resultado ganancias económicas. Las enzimas son naturales, no tóxicas y específicas. Una de las alternativas para la producción de enzimas a bajo costo es el uso de subproductos agroindustriales como sustratos para el cultivo de microorganismos en estado sólido. La sostenibilidad atrae cada vez más la atención de las industrias de alimentos y bebidas, como la industria de la cerveza, que produce toneladas de subproductos anualmente. La eliminación inadecuada de estos subproductos puede crear una serie de problemas ambientales. De las tecnologías utilizadas para reducir o minimizar estos subproductos, el uso de procesos biológicos es una de las alternativas viables, como ejemplo tenemos el uso de biomasa para el cultivo de hongos en la producción de enzimas. De las diversas enzimas producidas, las amilasas se estudian ampliamente debido a su importancia en la hidrólisis del almidón. El hongo *Aspergillus niger* se ha utilizado para producir amilasa. Tiene la ventaja de su fácil manejo y la capacidad de fermentar una amplia variedad de materias primas de bajo costo con altos rendimientos. Desde este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la producción de la enzima amilasa por fermentación en estado sólido utilizando

como sustrato el hongo *Aspergillus niger* y subproductos de la industria cervecera artesanal. La metodología aplicada fue la producción de enzimas amilolíticas por fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato bagazo de malta de cebada más solución salina (sulfato de amonio 3.3 g / L y fosfato de potasio 1.5 g / L). La determinación de la actividad amilolítica se llevó a cabo mediante el método descrito por Okolo et al. (1995) y los resultados fueron analizados estadísticamente a través del Action Stat Program, donde se realizaron estimaciones de los efectos de las variables y sus interacciones, considerando un nivel de significancia del 95%. Los resultados de la producción de amilasa por fermentación en estado sólido demostraron a través de los análisis, que el modelo se ajusta a uno lineal, con la humedad como variable significativa, siendo las mejores condiciones de trabajo 50% de humedad, tiempo de fermentación de 120h y ausencia de agitación.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, bagazo de malta, amilasa, bioprocesos

INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações mundiais é o destino incorreto de resíduos industriais, que muitas vezes são responsáveis por agressões ao ambiente, além de representarem perdas de matérias-primas e energia, e exigirem investimentos em tratamentos para controlar a poluição. O reaproveitamento desses resíduos industriais, em especial os sólidos, é uma alternativa que pode ser utilizada para a diminuição ou eliminação dos impactos ambientais causados pelo descarte inadequado (BORGES e NETO, 2009; PELIZER et al. 2007).

O bagaço de malte de cevada é o resíduo cervejeiro resultante do processo inicial da fabricação da cerveja, gerado a partir da filtração do mosto antes da fervura. Este bagaço é constituído basicamente pelas cascas do grão de cevada malteado. Sua utilização vem sendo estudada nos processos biotecnológicos, empregando-os como substratos ou suportes para fermentações e produções de enzimas. Esse bagaço de malte constitui uma boa opção, pois se encontra disponível o ano todo, em grande quantidade e a baixo custo, o que o torna um substrato atrativo para a produção de enzimas (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

As amilases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na catálise do amido em cadeias menores, convertendo as moléculas de amilose e amilopectina em moléculas menores, como dextrinas, maltoses e glicoses. A obtenção das amilases, a partir do bagaço de malte gerariam um produto de alto valor agregado e dariam um destino adequado ao subproduto da indústria cervejeira (SANTANA et al., 2012).

Sendo assim, no presente trabalho, foram realizados ensaios com o intuito de verificar a influência das variáveis umidade, tempo de fermentação e agitação sobre a produção de enzimas amilolíticas, a partir da fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus niger* para produção de amilase. Esse fungo apresenta como vantagem facilidade de manipulação e habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo, além de apresentar rendimentos elevados (COUTO e SANDROMAN, 2005; SINGHANIA et al., 2010).

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa de *Aspergillus niger* que foi inoculada em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubada a 30°C em estufa bacteriológica durante 7 dias.

Bagaço de Malte de Cevada

Esse subproduto da indústria artesanal cervejeira foi utilizado no experimento após ser obtido numa indústria local em Piracicaba – SP. O bagaço foi seco em estufa a 60 °C por 48h e então utilizado como substrato para a produção de amilase.

Produção de amilase

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo dez gramas do bagaço de malte de cevada. Ao substrato foi adicionado solução de sais contendo 3,3 g/L de sulfato de amônio e 1,5 g/L de fosfato de potássio. Em seguida foi feita a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se uma suspensão de esporos e foi feita a incubação na temperatura de 30°C, sendo o tempo e a agitação determinado pelo experimento. Após o tempo de fermentação, adicionou-se 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e manteve-se em agitação por 150rpm em incubadora de agitação orbital (“shaker”) durante 20 minutos e realizou-se a filtração em papel de filtro, obtendo-se o caldo enzimático cuja concentração foi determinada.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da α -amilase foi determinada como descrito por Okolo *et al.* (1995). A mistura de reação consistiu em 1,25 mL de amido solúvel a 1%, 0,25 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 5,0), 0,25 mL de água destilada e 0,25 mL de extrato de enzimático. Após 10 minutos de incubação a 50°C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER (1959). Em seguida foi realizada a leitura em 540nm usando um

espectrofotômetro UV-Vis. O branco consistiu em 0,5 mL de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0), 1,25 mL de solução de amido 1% e 0,25 mL destilada água.

Delineamento Experimental utilizado na Produção de Amilase

As variáveis estudadas foram: Umidade (A); Tempo de fermentação (B) e Agitação (C).

O delineamento experimental para verificação das variáveis que influenciam na produção da amilase utilizando o fungo *Aspergillus niger* foi realizado segundo um esquema fatorial completo do tipo 2³. Os níveis dos fatores utilizados e a matriz do planejamento desse projeto fatorial é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2³

Ensaio	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

A = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 70); B = Tempo (horas) (-1 = 72; 1 = 120); C = Agitação (rpm) (-1 = 0; 1 = 100)

Análise Estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos predeterminados, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, teste t de “Student” e ainda em tabelas de análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL contendo dez gramas do substrato, o qual foi formado pelo bagaço de malte de cevada. Foram adicionados ao substrato proporções de solução de sais para alcançar a umidade de 50 e 70%. Em seguida foram esterilizados, para posterior inoculação com os esporos do fungo *Aspergillus niger* (Figura 1). A fermentação ocorreu em 30 °C, por um período de 72 e 120 horas e a agitação variou de 0 e 100 rpm (Figura 2). Após o tempo de fermentação, acrescentou-se 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, em seguida deixou-se em agitação por 150 rpm durante 20 minutos e realizou-se a filtragem em papel de filtro, obtendo o caldo para determinação enzimática. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Figura 1: Meio de cultura composto por bagaço de malte de cevada e sais.



Fonte: Autora.

Figura 2: Meio de cultura fermentado composto por bagaço de malte de cevada, sais e *Aspergillus niger*.



Fonte: Autora.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2³

Ensaio	A	B	C	Resultado em Atividade Enzimática (U/mL)
1	-1	-1	-1	13,2
2	+1	-1	-1	3,6
3	-1	+1	-1	15,8
4	+1	+1	-1	5,1
5	-1	-1	+1	11,7
6	+1	-1	+1	3,5
7	-1	+1	+1	11,2
8	+1	+1	+1	6,7

A = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 70); B = Tempo (horas) (-1 = 72; 1 = 120); C = Agitação (rpm) (-1 = 0; 1 = 100)

Ao analisar a Tabela 2, os resultados que tiveram o maior e o menor valor em Atividade Enzimática, foram os ensaios 3 e 6, respectivamente. Todas as variáveis alteraram o seu valor, passando a umidade (A) e a agitação (C) do seu menor (-1) para maior nível (+1), ou seja, a umidade indo de 50 para 70% e a agitação de sem agitação para 100rpm. Já o tempo de fermentação (B) do maior para o menor, ou seja, de 120 para 72 horas. Entretanto, ao observar a Tabela 3, notamos que somente a variável Umidade (A) foi significativa dentro da faixa de valores estudados.

Tabela 3: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 2³

Efeitos e interações	Estimativas	T	P
Média	8,8375	-	-
A	-4,0875	4,7391	0,0306*
B	0,8625	1	0,4094
C	-0,5375	0,6231	0,5886
AB	0,2875	0,3333	0,7665
AC	0,9375	1,0869	0,3764
BC	-0,2125	0,2463	0,8254
ABC	0,6125	0,7101	0,5419

A = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 70); B = Tempo (horas) (-1 = 72; 1 = 120); C = Agitação (rpm) (-1 = 0; 1 = 100);
 *Significativos ($t_{4,0,95} = 2,77$)

A variável significativa, umidade (A) apresenta sinal negativo, o que indica que, para haver aumento da atividade enzimática, será necessário diminuir o valor desta variável. Esta observação pode ser comprovada através da Tabela 4.

Tabela 4: Análise da variância para o estudo da produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*, no planejamento fatorial completo 2³

Efeitos	QM	F	P
A	133,66	48,362	0,0022
B	5,95	2,153	0,2161
C	2,31	0,836	0,4122

R² = 0,93; A = Umidade (%); B = Tempo de fermentação (h); C = Agitação (rpm); QM = Média Quadrática;
*Significativos ao nível de 95% de confiança

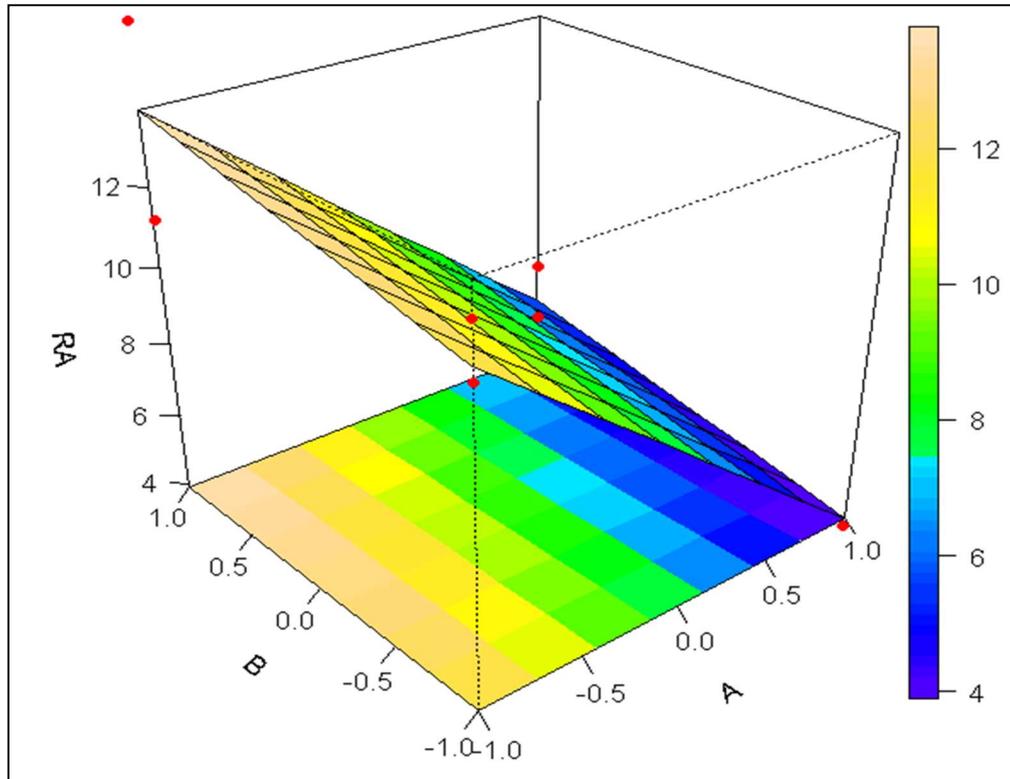
Como os resultados das análises demonstraram que o modelo se ajusta a um linear, então pode-se representar o processo de produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger* considerando os termos que mais influenciam no rendimento em atividade, conforme a Equação 1:

$$Y = 8,84 - 4,09A \quad (1)$$

Sendo que Y representa o rendimento em atividade e A representa a Umidade (%).

A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições de produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*, fornecendo um modelo matemático adequado para a resposta em rendimento em atividade. A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3: Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 1, que representa a produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*



CONCLUSÃO

Através do estudo da metodologia da superfície de resposta, foi possível determinar as condições de recuperação da enzima amilase utilizando o fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido tendo como substrato bagaço de malte de cevada e sais, e obteve-se um modelo matemático linear adequado para a resposta de atividade enzimática, onde a variável significativa foi a umidade. As melhores condições para a produção da enzima foram temperatura de 30°C, umidade de 50%, e tempo de fermentação 120h sem agitação.

REFERÊNCIAS

BORGES, M. S.; NETO, S. P. DE S. Meio ambiente x Indústria de cerveja: um estudo de caso sobre práticas ambientais responsáveis. In: Congresso Nacional de Excelência em Gestão, 5., 2009, Niterói. *Anais*. Niterói: UFF, 2009.

COUTO, S. R.; SANDROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 2, n. 3, p. 211-219, 2005.

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

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 69, p. 109-115, 1995.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, v. 2. Issue 1, p. 118-127, 2007.

SANTANA, R. M.; GONÇALVES, Z. S.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. *Revista Caatinga*, v. 25, p.188-193, 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbiology Technology*, n. 46, p. 541-549, 2010.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

1 RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves. Possui graduação em Engenharia Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Mestrado em Biotecnologia Industrial pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena na área de Microbiologia Aplicada e Genética de Microrganismos, Doutorado em Engenharia Química na área de Processos Biotecnológicos pela Universidade Estadual de Campinas e Pós-Doutorado pela USP. Atualmente é Professor Ensino Superior, Referência III, da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Dep. Roque Trevisan. Tem experiência na área de Engenharia Química, com ênfase em Purificação de Enzimas, atuando principalmente nos seguintes temas: microrganismos, enzimas, fermentação e extração líquido-líquido.