

## **Determinação da Atividade Enzimática de Extrato Bruto Obtido por Fermentação em Estado Sólido de Bagaço de Malte por *Aspergillus Níger***

Bruno Henrique Czelusniak Torres<sup>1</sup>; Michelli Aparecida Bertolazo Da Silva<sup>2</sup>

### **Resumo**

A geração de resíduos ocorre em diferentes áreas e setores agroindustriais, onde grande parte das indústrias gera algum subproduto que pode não apresentar uma gestão e destino sustentável. O bagaço de malte é um resíduo comum das indústrias cervejeiras e apresenta uma boa variação nutricional, podendo ser obtido com baixo ou nenhum custo. Neste trabalho objetivou-se utilizar o bagaço de malte como substrato na fermentação em estado sólido (FES) por *Aspergillus niger* para obtenção de amilase. As variáveis testadas na FES foram: massa do substrato (10g e 20 g), temperatura (25°, 28° e 32°), tempo de fermentação (24, 48 e 72 horas) e pH (4, 5 e 6). A atividade da amilase foi determinada através da técnica do DNS (ácido dinitrosalicílico). A melhor atividade de amilase ocorreu com 10g de substrato, na temperatura de 28°C, pH 5 e 48 horas de fermentação. Os resultados obtidos demonstram o potencial que o bagaço de malte apresenta como substrato para produção de amilases na FES.

**Palavras-chave:** Bagaço de malte. Fermentação em estado sólido. *Aspergillus Níger*. Amilase.

### **Introdução**

O Brasil está entre os três maiores consumidores de cerveja do mundo, atingindo cerca de 13 bilhões de litros ao ano. Cada vez mais o setor cervejeiro tem crescido e expandido seus mercados, conseqüentemente também produzindo uma maior quantidade de resíduos. O resíduo que gera maior impacto em relação ao volume e produção é o bagaço de malte, comparado aos demais resíduos gerados pelas cervejarias, alcançando aproximadamente 15,4 milhões de toneladas/ano (FAO, 2013; CERVBRASIL, 2015).

A fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocessamento no qual o microrganismo se desenvolve em suportes sólidos na ausência ou em baixo teor de água livre. É possível utilizar duas técnicas de FES: a primeira consiste na utilização de um sólido como suporte para o desenvolvimento dos microrganismos e outro composto atuando como fonte de carbono; a segunda utiliza uma matriz que forneça suporte e energia juntamente com os nutrientes. Geralmente as enzimas e outros metabólitos são obtidos por FES, a qual permite melhor controle no processo e tem a recuperação enzimática facilitada. Além disso, tal método mimetiza o habitat natural dos microrganismos, tornando-se uma ótima alternativa para o crescimento microbiano (LIMA *et al.*, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009; THOMAS, LARROCHE e PANDEY, 2013).

Uma classe de produtos que pode ser obtida por FES é composta pelas enzimas. As enzimas são biocatalisadores que apresentam alta especificidade e seletividade, atuantes em

1 Bacharel do Curso de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço eletrônico para correspondência: bruno.czk@hotmail.com;

2 Mestre em Ciências Farmacêuticas, Professora da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço eletrônico para correspondência: michelli.silva@utp.br

todas as células vivas, sendo importantes para o sistema metabólico dos organismos (LIMA *et al.*, 2001). A alta especificidade pelos substratos, se dá pela complementação geométrica realizada entre o substrato e a enzima, conhecida como encaixe induzido (MONTEIRO; SILVA, 2009). As amilases são responsáveis pela hidrólise do amido e seus derivados, sendo pertencentes à classe das hidrolases, tendo como principais representantes desse grupo a alfa e a beta-amilase, as quais produzem dextrinas, maltose, maltotriose e glicose a partir do amido. Essa classe de enzimas é de grande importância em aplicações industriais no desenvolvimento de alimentos, fermentações, produtos têxteis, papel, dentre outras (PARIS, 2008).

A produção de enzimas por métodos convencionais apresenta um alto custo de mercado. A utilização de recursos sustentáveis, baratos, de fácil acesso e com alto valor nutritivo como o bagaço de malte na produção desses catalisadores reduziria de maneira significativa os custos, além de contribuir com o meio ambiente. Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar a determinação da atividade enzimática de extrato bruto obtido por fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* utilizando-se bagaço de malte como substrato energético.

## Desenvolvimento

### *Obtenção do Fungo Aspergillus niger*

Cepas do fungo *Aspergillus niger* (ATTC 16888) foram gentilmente cedidas pela empresa Laborclin, situada em Curitiba – Paraná e mantidas em ágar Sabouraud até o momento da sua utilização, com repiques a cada 15 dias.

### *Preparo do Inóculo e Obtenção da Solução de Esporos*

A obtenção do inóculo para fermentação em estado sólido foi realizado através da propagação de esporos do fungo *Aspergillus niger* em Agar Sabouraud. Para obtenção da solução de esporos foram adicionadas pérolas de vidro e 5 ml de água destilada às placas de cultivo, as quais foram mantidas sob agitação manual por 5 minutos. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer para obtenção da concentração de esporos igual a  $10^7$  esporos/g de substrato (SANTANA, 2012 modificado).

### *Resíduo e Preparo do Substrato*

O resíduo do bagaço de malte recém processado foi gentilmente cedido pelas microcervejarias Wensky Beer (Malte pilsen e trigo extra) e Bodebrown (trigo extra 55% trigo e 45% maltes especiais) e submetido à secagem em estufa com circulação de ar (Nova Ética, Série 400/ND) à 55° C até peso constante.

## *Preparo da Solução Nutriente*

Os nutrientes e suas proporções utilizadas para o preparo das soluções tiveram como base o meio Czapeck modificado (QUADRO 1; HASAN, 2002).

QUADRO 1: Solução Nutriente

COMPONENTES	QUANTIDADE (g)
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,50
NaNO <sub>3</sub>	0,80
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	1,00
MgSO <sub>4</sub>	0,40
ZnSO <sub>4</sub>	0,25
FeSO <sub>4</sub>	0,25
MnSO <sub>4</sub>	0,10

Fonte: Hasan, (2002).

Foram utilizados soluções tampão fosfato com diferentes valores de pH (4, 5 e 6) como solvente dos meios.

## *Fermentação em Estado Sólido*

### *Testes Preliminares*

A fermentação foi conduzida em triplicatas, inicialmente considerando-se as seguintes variáveis:

- \* Concentração de bagaço de malte (10 e 20g/g).
- \* Temperaturas (25°C, 28°C e 32°C)

Após os testes preliminares, optou-se por selecionar para os próximos testes a massa de 10g de bagaço de malte, a qual gerou melhores resultados em termos de crescimento do micélio em comparação com a massa de 20g de bagaço de malte. A temperatura definida para continuidade dos testes foi 28°C diante de resultados superiores de atividade enzimática nessa temperatura.

### *Testes Posteriores*

A fermentação foi conduzida em duplicatas, considerando-se as seguintes variáveis:

- \* Solução-tampão fosfato pH (4,0, 5,0 e 6,0)
- \* Tempo de fermentação (24, 48 e 72 horas)

## *Obtenção do Extrato Bruto*

Após a fermentação, o extrato bruto foi obtido adicionando-se em frascos de erlenmeyer 100 ml de água destilada e 2 ml de tween 80 (Sigma Aldrich) e agitou-se com auxílio de um bastão de vidro durante 5 minutos, seguindo-se com filtração com papel de filtro qualitativo (ROCHA, 2010 modificado).

## *Determinação da Atividade da Amilase*

A partir do extrato bruto obtido foi realizada a determinação da atividade da amilase, onde foi adicionado 1 mL de extrato enzimático, 1 mL de solução de amido 1% e tampão fosfato 0,5 M pH 7,0 em um tubo de ensaio. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionado 1 ml da amostra juntamente com 1 ml de DNS e aquecido a 100°C por 5 minutos. Os açúcares redutores foram determinados por espectrofotometria com leitura a 570 nm, utilizando-se solução de glicose (100 mg/dl) como padrão (MILLER, 1959; ALVA *et al.*, 2007).

## **Resultados e Discussão**

### *Influência do Fungo *Aspergillus Niger* na Produção de Amilases*

Segundo Santos *et al.*, (2012), os fungos filamentosos possuem capacidade de realizar decomposição de polímeros orgânicos de lignina, celulose e hemicelulose, onde são responsáveis na formação de proteínas solúveis e enzimas extracelulares. A utilização do fungo filamentoso *Aspergillus niger* para produção enzimática se mostrou eficaz. A boa variação nutricional do bagaço de malte possibilitou o crescimento do microrganismo e a produção de enzimas.

De acordo com Spier (2005), a utilização do *Aspergillus niger* na fermentação em estado sólido apresenta vantagens como facilidade no cultivo, possibilita a fermentação de diversas matérias-primas de baixo valor, de modo a gerar rendimentos elevados de bioprodutos, sendo considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja seguro em aplicações relacionadas a alimentos, o que torna esse microrganismo acessível e bastante aplicável para fermentação em estado sólido.

### *Influência da Solução Nutriente na Produção de Amilases pelo Fungo *Aspergillus Niger**

Os meios nutricionais utilizados para a resposta das células fúngicas durante o crescimento podem apresentar variação de acordo com a concentração dos mesmos. Deste modo, necessita-se de um estudo relacionado às exigências nutricionais do microrganismo selecionado para estimular uma biossíntese enzimática efetiva atingindo uma produção convincente, como afirmam Rodrigues-Zúñiga *et al.*, (2011). Como suplementação de fonte de carbono utilizou-se

o bagaço de malte devido sua variação nutricional (Tabela.1) e como solução nutriente para o microrganismo o meio nutricional foi baseado no meio Czapeck.

Tabela 1: Composição centesimal do bagaço de malte de acordo com a literatura.

Composição centesimal	Freitas (2006)	Xiros et al., (2008)	Mussato et al., (2006)	Cordeiro et al., (2012)	Dragone (2007)
Celulose	-	12,0	16,8	-	16,78
Hemicelulose	-	40,2	-	-	28,42
Lignina	-	11,5	27,8	-	27,78
Proteínas	4,20 ± 0,18	14,2	15,2	5,37± 0,03	11,25
Carboidratos	16,62 ± 0,24	-	-	15,46± 0,03	-
Lípidios	1,87 ± 0,12	13,3	10,6	2,43± 0,05	-
Cinzas	0,77 ± 0,02	-	-	1,29± 0,02	4,60
Umidade	76,29 ± 0,21	3,3	-	75,45± 0,48	-
Fibras	0,24 ± 0,01	-	-	3,98± 0,04	-

#### *Influência da Quantidade de Substrato na Produção Enzimática pelo Fungo Aspergillus Niger*

A quantidade de substrato utilizado na fermentação também apresentou influência na produção enzimática e desenvolvimento do fungo. De acordo com os resultados dos experimentos, as amostras que continham 10 g de substrato foi observado crescimento de hifas e conseqüentemente a formação do micélio. Já nas amostras contendo 20 g de substrato não foi possível verificar esse crescimento. Uma possível explicação seria uma inibição da síntese enzimática devido ao aumento da quantidade de substrato, ligado a problemas relacionados à aeração do processo de fermentação, como afirma Maciel (2013). Dessa forma, o melhor desenvolvimento do fungo se apresentou com utilização de 10 g de substrato, proporcionando melhor atividade enzimática e viabilidade do fungo sobre o substrato e a solução nutriente.

O resíduo do bagaço de malte apresenta uma quantidade interessante de proteínas totais em sua composição. Segundo Santos *et al.*, (2003) o resíduo pode variar sua composição físico-química em diversos aspectos como de fato a matéria-prima utilizada para produção da cerveja, condições de armazenamento, qualidade e tipo de malte e outros ingredientes utilizados no processo de fabricação, que podem vir a serem alterados conforme a necessidade de produção ou a época do ano. Portanto isso demonstra que as características físico-químicas do bagaço de malte apresentam um ótimo potencial na produção de um composto de interesse de modo a contribuir para a economia do processo. A secagem do bagaço de malte à 50°C não prejudica os componentes nutricionais do bagaço de malte (Bourscheidt *et al.*, 2010).

## Influência da Temperatura na Produção de Amilases pelo Fungo *Aspergillus Niger*

As temperaturas testadas foram de 25°C, 28°C e 32°C, onde a faixa de temperatura no processo de fermentação que melhor apresentou atividade enzimática foi de 28°C como observado nos gráficos 1, 2 e 3, sendo esta temperatura definida para os próximos testes.

Gráfico 1: Análise da atividade amilásica a 25 °C pelo método DNS.

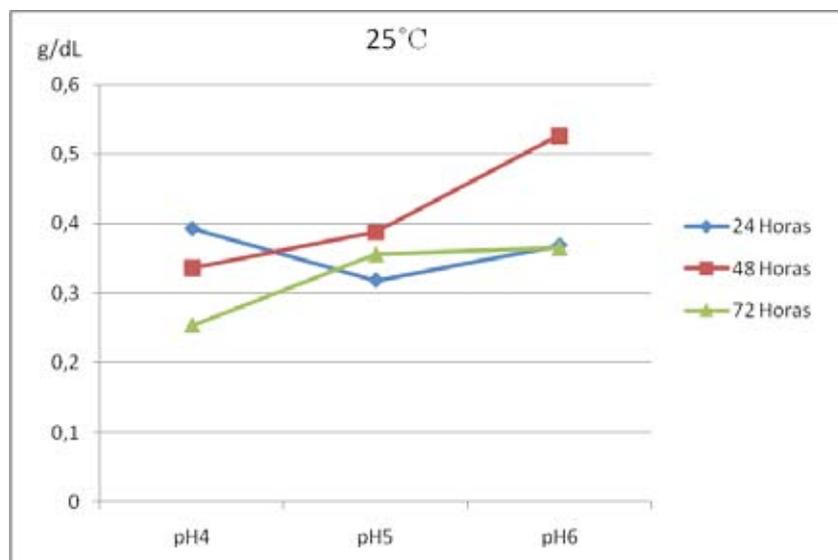


Gráfico 2: Análise da atividade amilásica a 28 °C pelo método DNS.

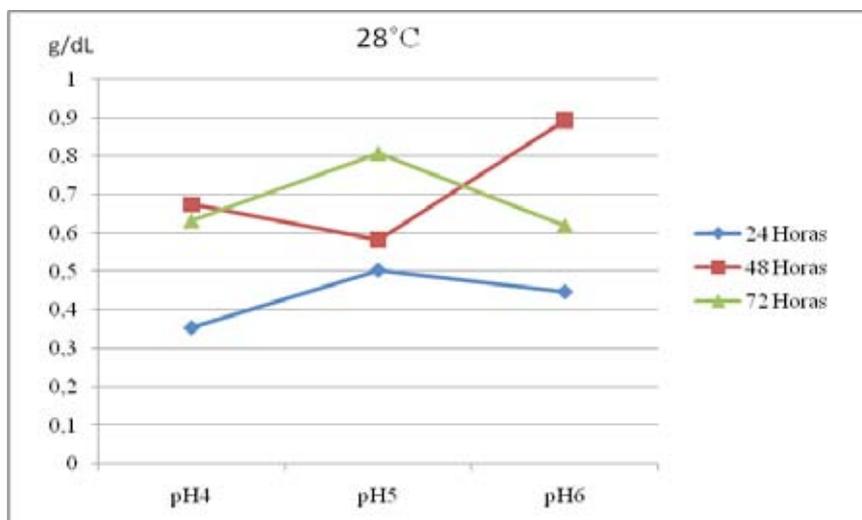
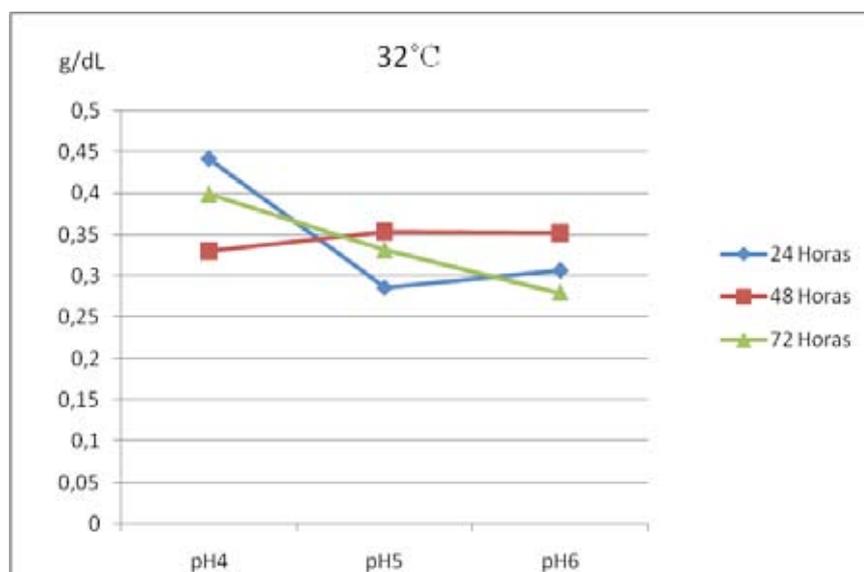


Gráfico 3: Análise da atividade amilásica a 32 °C pelo método DNS.



Da mesma forma, Khan e Yadav (2011), na produção de alfa-amilase utilizando *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido com substratos baratos (farelo de soja, arroz, trigo e resíduos vegetais) obtiveram como temperatura ideal 28°C, onde foi observada produção máxima da enzima. Resultados semelhantes foram obtidos por Kumar *et al.*, (2014), que obtiveram produção máxima de amilase à 28°C utilizando casca de limão como substrato e o fungo *Aspergillus niger* na fermentação em estado sólido. Escaramboni, (2014), otimizou a produção de amilases por *Rhizopus microsporus var. oligosporus* em fermentação em estado sólido com farelo de trigo onde resultados obtidos à 28° e 30°C foram semelhantes tendo em vista uma diferença de ( $p < 0,05$ ). De acordo com Palacios-Cabrera *et al.*, (2005), temperaturas entre 25° a 35° não afetam o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, sendo considerada uma temperatura ótima para desenvolvimento dos mesmos.

Saleem e Ebrahim (2013), obtiveram a produção máxima de amilases por *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* isolados de sementes de leguminosas à 30°C. Os autores relatam bons resultados à 25°C e 35°C. Chimata *et al.*, (2010), utilizaram um isolado de *Aspergillus niger* e como substratos farelo de trigo, arroz e grama verde para obtenção de amilase. Temperaturas que ultrapassavam 30°C levavam a um decréscimo da produção enzimática. Da mesma forma Irfan *et al.*, (2012), em trabalho de otimização da produção de  $\alpha$ -amilase utilizando *Aspergillus niger* e como substrato farelo de trigo, atingiu uma produção máxima à 30°C.

Alva *et al.*, (2007), alcançou atividade máxima de amilase utilizando *Aspergillus niger* e uma combinação de substrato com farelo de trigo, torta de resíduo de extração de óleo de amendoim e farelo de arroz em uma proporção (1:2:2) em uma temperatura à 30°C. Ainda de acordo com Alva *et al.*,(2007) destaca-se que a temperatura e o pH são dois parâmetros muito importantes que marcadamente influenciam a produção enzimática.

Santana (2012), destacou que a temperatura ótima para produção de amilases ocorre abaixo de 35°, ficando ativas entre 25° e 45°. Quando a fermentação ocorre nesta faixa de temperatura uma camada branca de micélio envolve totalmente o substrato (Figura.1), ou seja, acima de 35° não é possível observar um crescimento enzimático tão acentuado. Ao utilizar como substrato a palma forrageira para obtenção de amilase através do fungo *Rhizopus* sp obteve como temperatura ótima de produção enzimática 25°C.



Fig. 1: Bagaço de malte após a fermentação.  
Fonte: O autor.

De acordo com a análise dos autores citados, supõe-se que a temperatura ótima para produção enzimática seja próximo a 30°C onde sua atividade é máxima. A temperatura considerada ótima para produção de amilases neste trabalho foi 28°C, o que comparado com a literatura pode contribuir para uma redução significativa de gastos energéticos.

#### *Influência do pH na Produção de Amilases pelo Fungo *Aspergillus Niger**

Um dos fatores que apresentou influência durante a fermentação em estado sólido foi o pH do meio. Segundo Pandey *et al.*, (2001), o pH é um parâmetro de difícil controle e sua padronização pode se dar durante a sua preparação. Existem soluções tamponantes que podem ser adicionadas ao meio durante o preparo de modo a evitar fortes variações de pH. Assim pode-se realizar esta adição de modo que não afete o substrato ou exerça algum efeito prejudicial sobre a atividade biológica do microrganismo. Deste modo o controle do pH utilizando a solução tampão se deu ao preparo do substrato, sendo 4, 5 e 6 os valores de pH testados. A atividade enzimática apresentou diferenças consideráveis em relação aos valores de pH. De acordo com a tabela 2 é possível observar que o rendimento da atividade de amilase foi maior em pH 6.

Tabela 2: Análise da atividade amilásica em diferentes condições pelo método DNS.

pH	Temperatura	Tempo da FES	Concentração de açúcares redutores (g/dL)
4	28°	24 Horas	0,674979
5	28°	24 Horas	0,860553
6	28°	24 Horas	0,697571
4	28°	48 Horas	0,774368
5	28°	48 Horas	1,054195
6	28°	48 Horas	0,749209
4	28°	72 Horas	0,871849
5	28°	72 Horas	0,912191
6	28°	72 Horas	1,055809

Batista (2014), utilizou como substrato o resíduo do bagaço de malte para produção de dextranase através do fungo *Penicillium aculeatum* e obteve as melhores condições de cultivo em pH 5. Salmon (2011), utilizou o fungo *S. commune* para produção de fitase através do farelo de trigo e obteve seu pico de atividade em pH 5, sendo este considerado seu pH ótimo para produção enzimática. Resultado semelhante foi obtido por Spier *et al.*, (2010), onde utilizou o fungo *Aspergillus niger* para produção de fitase através da polpa cítrica, onde apresentou um pH ótimo de 5,5.

De acordo com Pereira (2014), na produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de trigo e farelo de banana como substratos na fermentação em estado sólido obtiveram maior atividade amilásica a pH 5. Correa (2015), no desenvolvimento de um bioprocessamento para produção de amilase (*Rhizopus oligosporus*) e etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizando farelo de trigo como substrato obteve produção máxima entre pH 4,0 e pH 5,5.

Os resultados obtidos em relação ao pH nos testes preliminares (gráficos 1, 2 e 3) indicaram melhor atividade em pH 6. Já nos resultados obtidos após a otimização de algumas variáveis, foi observada maior atividade amilásica em pH 5 para 48 horas de fermentação e pH 6 para 72 horas de fermentação (tabela.2). Diante disso, a fermentação em pH 5 em 48 horas de FES torna-se mais interessante, já que demonstrou-se equivalente ao pH 6 em 72 horas de FES, contribuindo para menor gasto energético.

#### *Influência do Tempo de Fermentação na Produção de Amilases pelo Fungo Aspergillus Niger*

Anto *et al.*, (2006) na produção de alfa amilase por *Bacillus cereus*, utilizando farelo de trigo e resíduos de fabricação de arroz em flocos como substrato, obtiveram maior produção após 72 horas de fermentação, havendo considerável redução da atividade enzimática após esse período de incubação.

De acordo com os resultados obtidos por Castro e Sato (2013), que utilizaram farelo de trigo como substrato e o fungo *Aspergillus oryzae* para fermentação em estado sólido obtiveram produção enzimática mais elevada de protease e alfa amilase a 48 e 72 horas de fermentação.

Andrade (2013), utilizou torta de canola como substrato e obteve maior produção enzimática de protease em 48 horas de fermentação utilizando a linhagem de *Aspergillus oryzae* em fermentação semi sólida. Penha *et al.*, (2016), obtiveram produção máxima de lipase utilizando torta de dendê como substrato através do fungo *Aspergillus niger* em 48 horas de fermentação. De acordo com Maciel (2013), na produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de *Melanoporia sp.* e *Mucor circinelloides* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato obteve maior produção da enzima em 48 horas de fermentação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Abud *et al.*, (2015) que obteve os melhores resultados em 48 de fermentação, utilizando como substrato residuo de laranja lima e casca de coco verde na produção de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado solido.

Em concordância com autores citados, supõe-se que 48 horas de fermentação é um período ideal como observado na Tabela 2, e suficiente para produção de amilases através do fungo *Aspergillus niger*, uma possível explicação seria a adaptação do fungo nas primeiras 24 horas do processo de fermentação, iniciando posteriormente o consumo dos nutrientes e fontes de carbono e produção de metabólitos como as amilases.

## Conclusão

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, o bagaço de malte pode ser considerado viável na utilização como substrato para produção de amilase. O fungo *Aspergillus niger* apresentou atividade amilásica mais interessante em temperatura de 28°C, pH 5 em um período de 48 horas de FES. Levando em conta o substrato, uma menor quantidade de bagaço de malte (10g) proporcionou melhor crescimento microbiológico. Estudos futuros relacionando as variáveis analisadas e a quantificação da biomassa, bem como a utilização de métodos de purificação enzimática se fazem necessários para otimização da técnica, visando sua melhor aplicabilidade em processos biotecnológicos.

## Referências

ABUD, A.K.S; ARAÚJO, M.L; ALMEIDA, R.M.R.G. Uso do resíduo de laranja lima e da casca de coco verde na produção de enzimas. Departamento de tecnologia de alimentos, programa de pós graduação em engenharia química. Universidade Federal de Alagoas, Macéio, AL. 8p, 2015.

ALVA, S; ANUPAMA, J; SALVA, J; CHIU, Y.Y; VYSHALI, P; SHRUTI, M; YOGEEETHA, B.S; BHAVYA, D; PURVI, J; RUCHI, K; KUMUDINI, B.S; VARALAKSHMI, K.N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.*, JGI 12 in solid state culture, *Afr. J. Biotechnol.* V6, n.5 p, 576–581, 2007.

ANTO, H; TRIVEDI, U; PATEL, K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state

fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44, p, 241–245, 2006.

ANDRADE, D.B. Produção de proteases por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo e canola. Centro de ciências sociais, saúde e tecnologia, curso de engenharia de alimentos. Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA. 52p, 2013.

BATISTA, M.C.T. Produção de dextranases a partir do bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria sucroalcooleira. Tese (doutorado). Universidade Federal do Paraná. 119 p, 2014.

BOURSCHEIDT, C. T; OLIVEIRA, B. H; SILVA, G. M. C. Avaliação do resíduo do bagaço de malte na alimentação animal. Anais do II ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. P. 41-45, 2010. Disponível em: < <https://www.yumpu.com/pt/document/view/12679082/avaliacao-do-residuo-do-bagaco-de-malte-naalimentacao-utfpr>>. Acesso em 11 de novembro de 2016.

CASTRO, R.J.S; SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and alfa-amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. *Department of Food Science, school of food engineering*. University of Campinas, SP. p. 813-821, 2013.

CERVBRASIL. Associação brasileira da indústria da cerveja. 2015. Disponível em: <[www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor](http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor)>. Acesso em 29 de outubro de 2016.

CHIMATA, M.K; SASIDHAR, P; CHALLA, S. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation, *Afr. J. Biotechnol.* 9 (32) p. 5162–5169, 2010.

CORDEIRO, L.G; EL-AOUAR, A.A; GUSMÃO, R.P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. *Revista verde*. V.7, n.3, p 20-22, 2012.

CORREIA, F.F.B. Desenvolvimentos de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista. Rio claro, SP. 79p, 2015.

DRAGONE, S.I.M. Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos. Tese (doutorado) – Escola de engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, SP. 175p, 2007. Disponível em: <<http://sistema.s.eel.usp.br/bibliotecas/antigas/2007/BIT07001.pdf>>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

ESCARAMBONI, B. Produção de amilases pelo cultivo em estado sólido de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose. Dissertação (mestrado)- Programa de pós graduação em ciências biológicas. Universidade estadual Paulista, Rio claro, SP. 62p, 2014.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/beta/en/#data>>. Acesso em 26 de setembro de 2016.

FREITAS, G.L. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e no bagaço de brassagem. Dissertação (mestrado) – Programa de pós graduação em ciência dos alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 86p, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88407/231715.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

HASAN, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium)* monoceras obtida por fermentação em estado sólido. Tese (doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP. 150p, 2002.

IRFAN, M; NADEEM, M; SYED, Q. Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains, *J. Cell Mol. Biol.* 10 (1) p, 55–64, 2012.

KHAN, J.A; YADAV, S.K. Production of alpha amylase by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing

solid state fermentation, *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 1 (3) p, 100–108, 2011.

KUMAR, M.S; SINGH, S.K; RAHINI, P; RAO, M.R.K. Production of amylase from fruit peel using *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *Der Pharmacia Lettre.* P, 173 – 179, 2014.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1ª ed. Editora Edgard Blucher Ltda. V3, 616p, 2001.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARGUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, *Food Technol. Biotechnol.*, v. 41: p. 105-110, 2003.

MACIEL, T.C. Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de *Melanoporia sp.* e *Mucor circinelloides* e utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Dissertação (mestrado)- Programa de pós graduação em engenharia química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 91p, 2013. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/7072/1/2013\\_dis\\_tcmaciel.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/7072/1/2013_dis_tcmaciel.pdf)>. Acesso em 11 de novembro de 2016.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Aplicada. *Revista Processos Químicos.* 2009. Disponível em: <[www.senaigo.com.br /repositoriosites/.../senail/.../processosquimicos\\_052009.pdf](http://www.senaigo.com.br/repositoriosites/.../senail/.../processosquimicos_052009.pdf)>. Acesso em 16 de junho de 2016.

MUSSATO, S.I; DRAGONE, G; ROBERTO, I.C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potencial applications. *Journal of cereal science.* 14p, 2006.

PALACIOS-CABRERA, H; TANIWAKI, M. H; HASHIMOTO, J. M; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Braz. J. Microbiol.* vol.36 no.1 São Paulo Jan/Mar. 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822005000100005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000100005)>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R; POONAM. N; Solid–state fermentation in biotechonogy: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech Publishers. 221p, 2001.

PARIS, L.D. Produção de enzimas fúngias por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. Dissertação (mestrado)- Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade estadual do oeste do Paraná, Toledo,PR. 115p, 2008.

PENHA, E.M; VIANA, L.A.N; GOTTSCHALK, L.M.F; TERZI, S.C; SOUZA, E.F; FREITAS, S.C; SANTOS, J.O; SALUM, T.F.C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. *Ciência rural*, V46, no.4, Santa Maria apr.2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782016000400755](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000400755)>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

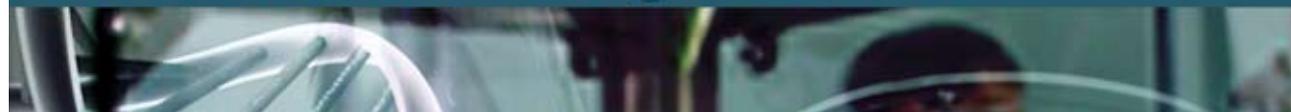
PEREIRA, J.L. Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação em estado sólido. Monografia de Conclusão de Curso de farmácia. Universidade de Brasília, Brasília, DF. 57p, 2014.

ROCHA, C.P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Dissertação (mestrado)- programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade federal de Uberlândia, MG. 136p, 2010.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U. F; FARINAS, C. S; NETO, V. B; COURI, S; e CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K.H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*, 97p, 2013.

SALMON, D. N. X. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção, caracterização e recuperação da fitase de *Schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação (mestrado) – Programa de pós graduação em processos biotecnológicos. Universidade federal do Paraná, PR. 107 p, 2011.



SANTOS, M; JIMÉNEZ, J.J; BARTOLOME, B; GO´MEZ-CORDOVE´S, C; DEL NOZAL, M.J. Variability of brewers' spent grain within a brewery. *Food Chemistry*. v. 80, p.17–21, 2003.

SANTOS, T. C; GOMES, D. P. P; BONOMO, R. C. F; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chemistry*, v. 133, n. 15, p. 1299-1304, 2012.

SANTANA, R.S.M. Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. Dissertação (mestrado)- Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos. Universidade estadual do sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA. 73p, 2012.

SINGHANIA, R.R; PATEL, A.K; SOCCOL, C.R; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SPIER, M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação em estado sólido. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 157p, 2005.

SPIER, M.R; FENDRICH, R; ALMEIDA, P.C; NOSEDA, M; GREINER, R; KONIETZNY, U; WOICIECHOWSKI, A.L; SOCCOL, V.T; SOCCOL, C.R. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. V 27, p 267-274, 2010.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid- state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146–161, 2013.

XIROS, C; TOPAKAS, E; KATAPODIS, P; CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5427–5435, 2008.