



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELOISI FEIJÓ DE ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA
NA PRODUÇÃO DE HIDROLASES FÚNGICAS**

Londrina
2020

ELOISI FEIJÓ DE ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA
NA PRODUÇÃO DE HIDROLASES FÚNGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rezende.
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Biz.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- E48 Araújo, Eloisi Feijó .
 VALORIZAÇÃO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA NA
 PRODUÇÃO DE HIDROLASES FÚNGICAS / Eloisi Feijó Araújo. - Londrina,
 2020.
 74 f. : il.
- Orientador: Maria Inês Rezende.
 Coorientador: Guilherme Biz.
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de
 Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia, 2020.
 Inclui bibliografia.
1. Análise da produção de hidrolases por fermentação em estado sólido e
 submerso, utilizando diferentes cepas de fungos do gênero *Trichoderma*, afim de
 selecionar o melhor meio fermentativo e o melhor fungo produtor. - Tese. I.
 Rezende, Maria Inês . II. Biz, Guilherme. III. Universidade Estadual de Londrina.
 Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV.
 Título.

CDU 66

ELOISI FEIJÓ DE ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA
NA PRODUÇÃO DE HIDROLASES FÚNGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Nicole Caldas Pan
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de novembro de 2020.

Dedico este trabalho a minha mãe Marli Feijó,
que com tanto amor me educou e incentivou!

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Maria Inês Rezende, minha orientadora, e ao Professor Dr. Guilherme Biz, meu co-orientador, que acompanharam e auxiliaram em todos os momentos de dificuldade.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, por compartilharem e auxiliarem na melhora e na correção deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e do departamento de Estatística da Universidade Estadual de Londrina, por todo conhecimento compartilhado, pois contribuíram para a realização desse trabalho

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia por todo auxílio dentro e fora dos laboratórios, sempre facilitando a realização prática deste trabalho.

Em especial aos amigos da turma de 2018 do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por todo carinho e apoio nesses anos.

ARAÚJO, Feijó Eloisi. **Valorização do resíduo da indústria cervejeira na produção de hidrolases fúngicas.** 2020, 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, e a maioria das indústrias cervejeiras do país estão localizadas na região Sul e Sudeste; cerca de 85 % de todo o resíduo gerado na indústria é de bagaço de malte, material composto de celulose, hemicelulose e lignina, disponível o ano todo a baixos ou nenhum custo. Neste estudo foi avaliado o potencial do resíduo da indústria cervejeira, como um substrato na produção de enzimas extracelulares microbianas (hidrolases) via fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). Em ambos os métodos foram avaliados a produção utilizando 13 espécies diferentes de *Trichoderma* isolados na região norte do Paraná, inoculadas individualmente em erlenmeyers de 125 mL, contendo 3,5 g de bagaço de malte umedecido com 10 mL de Vogel (FES) e 0,35 g de bagaço de malte em 25mL de Vogel (FS). O inóculo consistiu de 150 µL de suspensão de conídeos 10^7 UFC/mL preparada em salina estéril com 0,01 % de Tween 80. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com o delineamento fatorial em blocos casualizados, e os resultados analisados pelo programa R afim de eleger o melhor método produtor e a melhor espécie. A otimização da produção foi realizada através do delineamento fatorial com pontos centrais e pontos adicionais para verificar a curvatura, variando a quantidade de solução umedecedora (5 à 15mL) e temperatura (24 a 32 °C). O tempo de produção ótimo foi determinado avaliando a atividade enzimática ao longo de 10 dias. A produção máxima encontrada foi de xilanase e não houve diferença significativa entre os métodos FES e FS para a atividade xilanolítica, que foi de $146,72 \text{ U.mL}^{-1}$ na FS e de $136,77 \text{ U.mL}^{-1}$ na FES (*Trichoderma citroviridae*). A atividade celulolítica máxima obtida foi de $6,15 \text{ U.mL}^{-1}$ (*Trichoderma harzianum*) na FES, na FS a atividade celulolítica foi menor. Esses valores demonstram que o resíduo da indústria cervejeira tem potencial para ser utilizado em fermentações no estado sólido e submerso na produção de xilanases e celulases, a β -glicosidase não foi encontrada em valores significativos em nenhum dos métodos fermentativos para nenhuma espécie do genero *Trichoderma*. Os métodos FES e FS não diferem estatisticamente na produção de xilanase, mas diferem na produção de celulase, sendo a celulase melhor produzida por FES e pelo *Trichoderma harzianum* (T6), com os valores máximos de atividade encontrados em apenas 3 dias de produção para xilanase e de 4 dias para a celulase.

Palavras-chave: bagaço de malte; *Trichoderma harzianum*; celulase; xilanase; β -glicosidase.

ARAÚJO, Feijó. **Eloisil. Valorization of waste from the beer industry in the production of fungal hydrolases.** 2020, 74 f. Dissertation (Master degree in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Brazil is the third largest beer producer in the world, and most of the country's brewery industries are located in the South and Southeast; about 85% of the waste generated in the industry is malt bagasse, material composed of cellulose, hemicellulose and lignin, available all year at a low or no one cost. In this study was evaluated the potential of the beer industry residue, as a substrate in the production of extracellular microbial enzymes (hydrolases) via solid-state fermentation (FES) and submerged fermentation (FS). The production in both methods were evaluated using 13 different species of *Trichoderma*, isolated in the northern region of Paraná. These species were inoculated individually in 125 mL erlenmeyers, containing 3.5 g of malt bagasse moistened with 10 mL of Vogel (FES), and 0.35 g of malt bagasse with 25 mL of Vogel (FS). The inoculum consisted of 150 μ L the conidia suspension 1.10^7 CFU / mL prepared with sterile saline and 0.01% Tween 80. Were developed the experiments according to the factorial design in randomized blocks, and the R program analyzed the results in order to choose the best fermentation method and the best species for hydrolases production. The optimization were carried through a factorial design with central points and additional points to check the curvature, varying the amount of wetting solution (5 to 15 mL) and temperature (24 to 32 ° C). The optimal production time was determined by evaluating the enzymatic activity over 10 days. The maximum production found was xylanase and there was no significant difference between the FES and FS methods for xylanolytic activity, which was 146, 72 U.mL⁻¹ in the FS and 136.77 U.mL⁻¹ in the FES (*Trichoderma citroviridae*). The maximum cellulolytic activity obtained was 6.15 U.mL⁻¹ (*Trichoderma harzianum* T6) in FES, in FS the cellulolytic activity was decrease. There was no significant production of β -glycosidase in any of the methods. These values demonstrate that the residue from the brewing industry has the potential to be used in solid and submerged fermentations in the production of xylanases and cellulases and the FES and FS methods didn't differ statistically in the production of xylanase, but differ in the production of cellulase, being cellulase best produced by FES, with the maximum activity values found in only 3 days of production for xylanase and 4 days for cellulase.

Key-words: malt bagasse; *Trichoderma harzianum*; celulase; xylanase; β -glycosidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Composição da biomassa lignocelulósica.....	16
Figura 2	–	Morfologia do grão de cevada.....	20
Figura 3	–	Modo de ação das enzimas celulolíticas e liberação de glicose.....	24
Figura 4	–	Modo de ação das enzimas xilanolíticas e liberação de xilose.....	25
Figura 5	–	Ciclo de vida assexual de <i>Trichoderma</i> ssp	29
Figura 6	–	Fluxograma da metodologia para FDN e FDA	33
Figura 7	–	Fluxograma da metodologia para determinação de lignina.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade em toneladas de biomassa agroindustrial produzida	16
Tabela 2 – Composição lignocelulósica dos resíduos amplamente produzidos no mundo.....	18
Tabela 3 – Resíduo lignocelulósico utilizado na produção de hidrolases microbianas e condições de cultivo.....	26
Tabela 4 – Origem e classificação das cepas de <i>Trichoderma</i> sp	30
Tabela 5 – Preparo do meio descrito por Vogel, 1956	31
Tabela 6 – Preparo da solução de elementos traços utilizados no meio Vogel.....	31
Tabela 7 – Experimento fatorial no delineamento em blocos ao acaso, em blocos (A, B e C), avaliando a produção das diferentes cepas de fungos e dos processos fermentativos em estado sólido (FES), e em estado submerso (FS).....	36
Tabela 8 – Experimento de otimização utilizando fermentação em estado sólido e a cepa T8, variando temperatura e quantidade de solução umedecedora (Vogel).....	39
Tabela 9 – Pontos centrais adicionais para otimização das enzimas celulase e β -glicosidase	39
Tabela 10 – Pontos centrais adicionais e pontos para verificar a curvatura para otimização da enzima xilanase	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: GERAÇÃO, COMPOSIÇÃO E APROVEITAMENTO	16
3.1.1	Bagaço de Malte	18
3.2	PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	23
3.2.1	Fermentação em Estado Sólido	27
3.2.2	Fermentação Submersa	28
3.3	GÊNERO <i>TRICHODERMA</i>	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	MICROORGANISMO: ORIGEM E MANUTENÇÃO	30
4.2	SUBSTRATO LIGNOCELULÓSICO	31
4.3	MEIOS DE CULTIVO	31
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE	32
4.5	CULTIVOS EM BAGAÇO DE MALTE	34
4.5.1	Preparo do Inóculo	34
4.5.2	Cultivos de Fermentação em Estado Sólido (FES)	34
4.5.3	Cultivos de Fermentação em Estado Líquido (FS)	34
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
4.6.1	Celulase	35
4.6.2	Xilanase	35
4.6.3	β -Glicosidase	35
4.7	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULASE, XILANASE E B-GLICOSIDASE	36
4.7.1	Avaliação do Melhor Tempo de Fermentação	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICES	50
	APÊNDICE A – Artigo: “Valorização do Resíduo da Indústria Cervejeira na produção de hidrolases fúngicas”	51
	CONCLUSÃO	71

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais, também chamados de biomassa lignocelulósica, possuem potencial interesse biotecnológico, são materiais com baixo custo, disponíveis em grandes quantidades, e atualmente tem pouca utilização, como compostagem, queima em caldeiras para geração de energia e também como aditivo em rações. Mesmo com essas aplicações, a quantidade que sobra de resíduos ainda é grande, aproximadamente 30% de tudo o que é produzido na agricultura.

Afim de manter o produto e sua produção ao ecologicamente correto (*ecofriendly*), pesquisadores vem tentando mimetizar as condições e processos que já ocorrem naturalmente, como por exemplo a utilização de microrganismos capazes de converter esses resíduos em produtos de maior valor agregado, como enzimas, corantes, metabólitos secundários como os alcaloides, flavonoides, terpenos, entre outros.

As enzimas, biocatalisadores, desempenham papel fundamental nas reações bioquímicas, e podem ser utilizadas como substituintes de catalisadores químicos, os quais geralmente são poluentes ambientais. A aplicabilidade das enzimas é diversa, como a clarificação de polpas, sucos e papéis, produção de biocombustíveis, indústria têxtil, entre outras.

O fungo *Trichoderma* sp., ao ser cultivado em meio a biomassa lignocelulósica, produz enzimas que hidrolisam os polímeros da parede vegetal (hidrolases), obtendo para seu desenvolvimento monossacarídeos, como a glicose e a xilose. A dificuldade na hidrólise desses polímeros é a composição dos resíduos pois sua estrutura é polimérica e forma um emaranhado, onde a celulose é envolvida pela hemicelulose, e ligadas umas às outras pelos álcoois aromáticos da lignina, muito resistentes.

Esse trabalho, teve por objetivo, a utilização do resíduo da indústria cervejeira que ainda é pouco explorado, o bagaço de malte, como substrato para produção de hidrolases. Comparando entre os métodos fermentativos submerso e sólido, diferentes cepas de *Trichoderma* sp. na produção dessas enzimas, afim de otimizar a produção e valorizar o resíduo da indústria cervejeira, considerando que a produção de malte do país está 60% localizada no Estado do Paraná, e que este é um recurso disponível o ano todo a baixos custos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do bagaço de malte na produção de hidrolases por cepas do gênero *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o bagaço de malte pela determinação das proporções, celulose, hemicelulose e lignina;
- ✓ Reconhecer o melhor isolado nos cultivos de fermentação submersa e fermentação em estado sólido com bagaço de malte como substrato.
- ✓ Determinar a atividade das enzimas xilanase, celulase e β -glicosidase, produzidas pelos fungos nos diferentes processos fermentativos selecionando o melhor produtor de cada hidrolase no processo fermentativo;
- ✓ Otimizar a produção das enzimas através de planejamentos fatoriais;
- ✓ Relacionar o consumo de lignina, celulose e hemicelulose no material sólido fermentado com a produção enzimática;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: GERAÇÃO, COMPOSIÇÃO E APROVEITAMENTO.

A economia mundial está fortemente ligada ao agronegócio, que gera diversos produtos para alimentação da população e também para utilização como matéria prima de produtos industrializados, como a cana-de-açúcar para produção de açúcar e também etanol, a soja e o milho na produção de óleo vegetal e venda *in natura*.

Essa produção, gera constantemente diferentes resíduos, alguns em grandes quantidades, que podem impactar de várias formas o meio ambiente. Entre os vários impactos, a agricultura global é responsável por quase um terço de todas as emissões de gases de efeito estufa (McMICHAEL, 2009).

Os valores de biomassa produzidos podem ser calculados de acordo com o rendimento da safra. Para a cana-de-açúcar por exemplo 20 % da produção é convertida em resíduo e para o arroz 30 %. Os valores da Tabela 1 foram calculados de acordo com os dados de produção anual dos cultivos, disponíveis nos sites da Embrapa e no portal do agronegócio no site do Governo Brasileiro.

Tabela 1: Quantidade em toneladas de biomassa agroindustrial produzida.

Biomassa Lignocelulósica	Geração Mundial (milhões de toneladas)	Geração Brasil (milhões de toneladas)
Farelo de Soja *	130,8	36,8
Sabugo e casca de Milho *	341,85	30,24
Casca de Arroz *	97,25	2,49
Bagaço de Cana-de-açúcar **	467,85	190,68

* Geração de biomassa em 2018; ** Geração de biomassa em 2017

Fonte: o Autor.

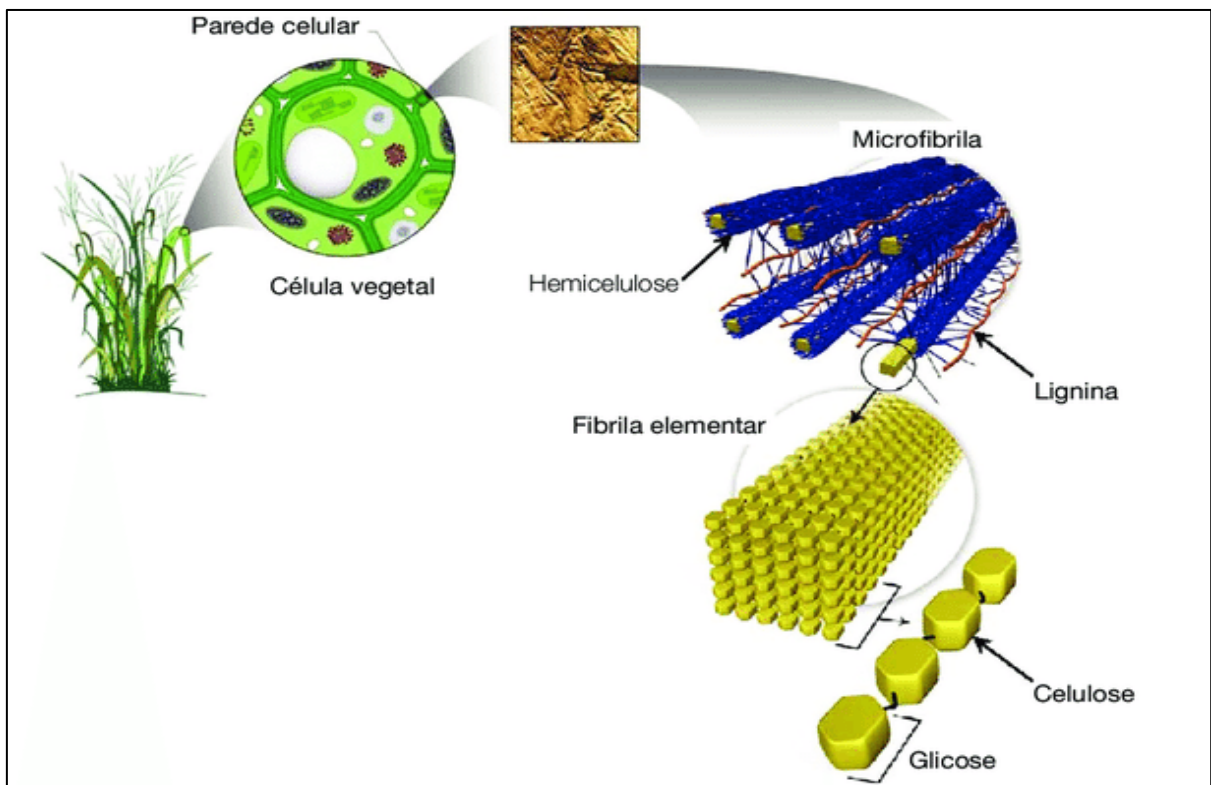
O Brasil, desde 2010 é o 3º maior exportador agrícola do mundo, sendo os primeiros exportadores os Estados Unidos e da União Europeia. A soja, açúcar, e o café estão entre os mais exportados pelo país.

No setor primário (fornece a matéria-prima para a indústria de transformação) o estado do Paraná é o maior produtor de soja, milho e café. Disponibilizando no estado uma grande quantidade de biomassa durante o ano inteiro. Esses resíduos

gerados são ricos em nutrientes que podem ser explorados em diversos processos biotecnológicos.

A biomassa lignocelulósica, figura 1, tem por composição básica de 10 a 25 % de lignina, 20 a 30 % de hemicelulose, e de 40 a 50 % de celulose. A celulose é o maior componente estrutural das plantas, e é responsável por conferir força mecânica, formada por monômeros de glicose; a hemicelulose são polímeros formados por pentoses e hexoses; a lignina contém três álcoois aromáticos (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool polivinílico), os quais formam uma rede protetora entre os polímeros de celulose e hemicelulose (ANWAR et al., 2014).

Figura 1: Composição da biomassa lignocelulósica



Fonte: US DOE, 2018.

De modo geral, a composição dos materiais lignocelulósicos (lignina, celulose e hemicelulose), variam de acordo com o tipo de vegetal, como exemplo: gramíneas, cereais e madeiras, exemplos na Tabela 2 (ANWAR et al., 2014).

Tabela 2: Composição lignocelulósica das diferentes biomassas amplamente produzidos no mundo.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Farelo de Soja	7,1	2,9	3,0
Sabugo de Milho	32,2	29,0	18,4
Palha de Milho	28,3	16,4	23,8
Casca de Arroz	32,4	13,9	27,8
Bagaço de Cana-de-açúcar	36,6	18,7	22,5

Fonte: Adaptado de RAJ T. et al., 2015.

No momento atual, as biorrefinarias têm sido almeçadas por sua aplicação, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, por se tratar de um processo onde o aproveitamento dos recursos naturais ocorre de forma completa. O resíduo lignocelulósico, tem ganhado interesse de pesquisadores por ser de fonte renovável e de baixo custo. As enormes quantidades de resíduos têm potencial para serem convertidos em diferentes produtos, como exemplo:

- *Farelo de Soja:* O farelo de soja tem sido utilizado para a alimentação animal. Segundo Coldebella (2002), o farelo de soja em conjunto com levedura de cana para substituir ração de peixes tem proporcionado um bom desenvolvimento dos peixes, Pongmaneerat et al, (1993) testaram diferentes concentrações de farelo de soja na alimentação de trutas e carpas. Em concentrações próximas a 11% de proteína houve um aumento no consumo da quantidade de ração de peixe, enquanto que concentrações maiores de proteína (subplementação do farelo de soja), o consumo de ração foi menor, porém o crescimento de todos os ensaios apresentou ganho de peso semelhante até o 21º dia da dieta.
- *Sabugo e casca de Milho:* Brandão et al., (2000 e 2003), realizaram estudo sobre a capacidade de adsorver poluentes de águas da suinocultura em filtros orgânicos, o resíduo do sabugo de milho foi acondicionado em tubos de PVC de diâmetro de 100 mm, constituindo colunas de 500 mm de altura. O sistema de filtragem foi mantido sob escoamento permanente, com fluxo em meio saturado. Significativa redução na concentração de Cu foi constatada, atingindo-se eficiência de remoção de até 43,6%. Eficiências de remoção superiores a 90% foram obtidas para sólidos sedimentáveis enquanto a

remoção de sólidos totais ficou abaixo de 33,0%. Outros autores também relatam eficiência na utilização do milho como adsorvente de poluentes. (DEY et al., 2002).

- *Casca de Arroz*: A casca de arroz, está entre os resíduos mais usados como suportes naturais para imobilização de substâncias, D'Souza e Godbole, (2002) citam que os estudos de reutilização da casca de arroz como um imobilizador de enzimas, indicam que esta abordagem de ligação da enzima/casca de arroz resulta em uma preparação enzimática estável e pode servir como uma técnica simples no futuro para a imobilização covalente de enzimas em suportes lignocelulósicos (CASTRO et al., 2001). Além de um promissor suporte de imobilização, as cascas de arroz também tem sido aplicadas em chapas aglomeradas de madeira, como um aditivo de massa (MELO, 2009; HIZIROGLU, 2005; NDAZI et al., 2006)
- *Bagaço de cana-de-açúcar*: No Brasil, existem 252 usinas geradoras de energia elétrica a partir do bagaço de cana-de-açúcar. A Aneel (Agência Nacional de Energia Elétrica) estima que para 2023 a produção de energia a partir do bagaço de cana-de-açúcar seja de 19,5 GW médios, o que equivale a 14% da geração de bioeletricidade no país. Além da geração de energia elétrica, o bagaço de cana-de-açúcar também tem sido estudado como matéria prima para produção de etanol de segunda geração utilizando microrganismos produtores de hidrolases para aproveitamento desse resíduo por completo (RAO e MENON, 2012; VIJAYALAXMI, 2013).

Dentre os diversos resíduos existentes, o bagaço de malte é amplamente produzido no sul do Brasil e tem alto valor nutricional, mas possui ainda pouca aplicabilidade. Tem sido utilizado na alimentação de animais e panificação, porém, a alta umidade é um fator prejudicial na alimentação de ruminantes, pois facilita a rápida proliferação de microrganismos, e essa contaminação pode levar a sérios problemas de saúde aos animais.

3.1.1 Bagaço De Malte

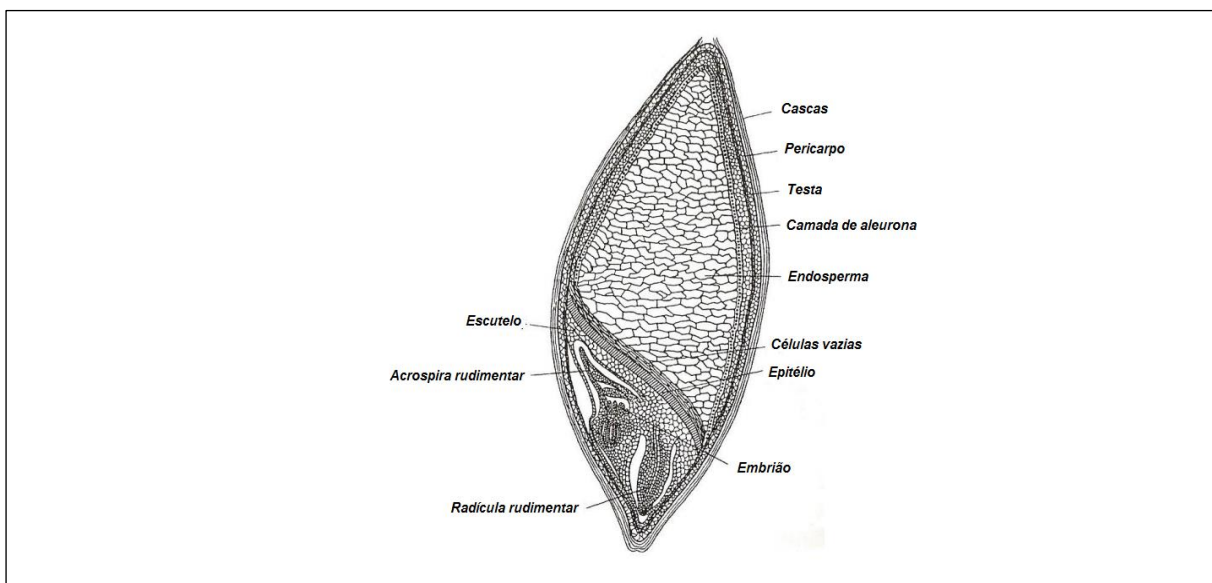
A cerveja é um produto obtido no setor secundário da economia, aquele que transforma as matérias primas em produtos industrializados e o Brasil é o terceiro produtor mundial de cerveja produzindo 13 bilhões de litros/ano; a China é o primeiro

produtor (48 bilhões de litros/ano) e os Estados Unidos é o segundo produtor mundial (22,5 bilhões de litros/ano) (CERVBRASIL, 2019).

O principal ingrediente utilizado para a produção da cerveja é a cevada, matéria prima do malte. A maior maltaria da América Latina está localizada em Guarapuava, no Paraná, a cooperativa Agrária, produz 350 mil toneladas de malte por ano, o equivalente a 60 % de toda produção do país, que é totalmente destinado a indústria cervejeira.

A fonte do malte é o grão de cevada, que é constituído de 3 partes principais, o germe (embrião), o endosperma (aleurona e o endosperma amiláceo) e as coberturas de grãos. As coberturas ainda podem ser divididas em (de dentro para fora) o revestimento da semente, camada do pericarpo e a casca, Figura 2 (LYNCH et al., 2016).

Figura 2: Morfologia do grão de Cevada.



Fonte: LYNCH et al., 2016.

O malte é utilizado para a preparação do mosto. Para a formação do mosto, o amido do endosperma da cevada maltada, é submetido a degradação enzimática, liberando os carboidratos fermentescíveis, (maltose e maltotriose), e os não fermentescíveis como as dextrinas, que são proteínas solúveis, polipeptídios e aminoácidos. O meio gerado, chamado de mosto, será fermentado por leveduras (LYNCH et al., 2016).

Os componentes insolúveis dos grãos (coberturas), são utilizados também para formação de um leito no filtro das dornas de fermentação, auxiliando na separação do

mosto. Por este motivo, a moagem inicial do malte deve ser feita de forma a manter a integridade da cobertura do grão, afim de obter maior eficiência na filtração. A parte sólida do mosto resultante após a filtração é chamado de bagaço de malte. Algumas cervejarias empregam outros tipos de filtro, realizando uma moagem melhor do malte e da casca (LYNCH et al., 2016).

O bagaço de malte corresponde a 85 % dos resíduos gerados na produção de cerveja, sendo aproximadamente 20 kg de bagaço a cada 100 litros de cerveja produzida (REINOLD, 1997). Segundo dados mais recentes do Ministério da Agricultura, o Brasil fabricou 14,1 bilhões de litros de cerveja em 2016 (MÜLLER, 2016), isso corresponde a aproximadamente 2,8 bilhões de quilos de bagaço de malte/ano.

De forma geral, a composição média do bagaço de malte é de 24 a 39 % de proteína, 21 a 29 % de hemicelulose, 19 a 28 % de lignina, 16 a 21 % de celulose, 11% de lipídios e 2 % de cinzas. (KANAUCHI et al., 2001; RIGO, 2017). Devido a variabilidade industrial da produção de cerveja, a composição do bagaço de malte difere entre si de acordo com os processos de obtenção do mosto, processo no qual as enzimas degradam o malte em açúcar disponível a fermentação (STEINMACHER, 2010).

Visto a disponibilidade e custo, o resíduo de malte tem sido estudado para uso na panificação, a melhor condição encontrada foi a de elaboração de pães com a adição da farinha de bagaço de malte à massa de forma lenta, com de 72 mL de água e 90 minutos de tempo de fermentação (STEINMACHER, 2010).

A celulose (polímero de glicose), hemicelulose (polímero de hexoses e pentoses) e a lignina presentes neste resíduo lignocelulósico constituem aproximadamente 50 % do bagaço de malte e podem ser utilizados como substratos de microrganismos produtores de enzimas capazes de hidrolisar esses polímeros, disponibilizando assim os açúcares para geração de produtos com maior valor agregado (KANAUCHI et al., 2001; RIGO, 2017).

Novos materiais e produtos utilizando o bagaço de malte também têm sido estudados, como por exemplo bandejas biodegradáveis (MALI, 2014), cuja principal aplicação é o armazenamento de alimentos perecíveis com vida útil curta, afim de substituir as bandejas EPS (poliestireno expandido) comumente utilizadas comercialmente que são derivadas do petróleo, as bandejas produzidas de amido de mandioca e contendo de 5 a 10 % de resíduo de malte apresentaram rendimentos de

100 % de produção, os autores obtiveram uma boa distribuição do bagaço de malte em toda a matriz polimérica, que apresentou estrutura amorfa.

O resíduo de malte também é utilizado como aditivo na alimentação animal (ALBUQUERQUE et al, 2011), neste último caso, a alta umidade do resíduo dificulta a armazenagem pois aumenta a susceptibilidade da proliferação de microrganismos. A utilização de forma empírica pelos proprietários e o armazenamento inadequado do bagaço de malte têm sido associadas a diversos distúrbios em animais, como acidose ruminal, botulismo e as intoxicações por fungos e etanol, uma forma de contornar a intoxicação por etanol seria deixá-lo evaporar antes de alimentar os animais (BRUST et al., 2011 e 2015; CERQUEIRA et al., 2018).

Outros estudos relatam a utilização do bagaço de malte na área de biosorvente de corantes, o grande problema envolvendo corantes é na indústria têxtil, pois pequenas concentrações de corante no efluente já são suficientes para adquirir cor intensa, dificultando o tratamento e descarte do efluente, sendo necessário um tratamento para retirada desses corantes. Os resultados dos trabalhos mostraram que o bagaço de malte se revelou um biosorvente efetivo na remoção do verde malaquita e do azul BF-5G. O azul BF-5G com remoção na dosagem de 14 g.L⁻¹, e para o verde malaquita, um corante catiônico, o bagaço de malte tem capacidade de adsorver 117.65 mg.g⁻¹, com a vantagem de possuir um baixo custo, de fonte renovável e presente em todas as estações do ano (COSSOLIN et al, 2018; JUCHEN et al, 2018).

O bagaço de malte, por ser fonte rica de açúcares também tem sido estudado como substrato de microrganismos para produção de enzimas, como por exemplo na produção de lipase, que é um catalisador de interesse biotecnológico na produção do biodiesel. Eischeler (2018), cita em seu trabalho, que a produção de lipases utilizando o bagaço de malte e *Aspergillus brasilienses*, via fermentação em estado sólido, a atividade máxima de lipase, em 96 h, para esse cultivo de 8,17 U.g⁻¹.

Além das lipases, o bagaço de malte também serve como substrato para produção de Xilanases, β-xilosidase e α-L-arabinofuranosidase, por *Penicillium janczewskii*, utilizando bagaço de malte para fermentação em estado sólido. As condições otimizadas de produção de altos níveis de xilanase, β-xilosidase e α-L-arabinofuranosidase, foram: 50 % de umidade inicial, que foi fornecida pela solução de sais de Vogel, sete dias de cultivo a 20-30°C. Com valores de atividade em U.g⁻¹ de 370,2 ± 10,7; 225,1 ± 5,7 e 403,4 ± 21,8, respectivamente. A fermentação enriqueceu o bioproduto com alguns aminoácidos e não adicionou micotoxinas a ele.

O uso de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de malte, usados como substrato para o cultivo de fungos e produção de enzimas pode agregar valor a esses resíduos e reduzir o custo de produção de enzimas xilanolíticas (TERRASAN; CARMONA, 2015).

3.2 PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O interesse envolvendo os materiais renováveis e biodegradáveis, aqueles materiais chamados amigos da natureza (*eco friendly*) tem aumentado, no sentido de unir o produto e sua produção ao ecologicamente sustentável.

Para isso, inúmeros estudos vêm tentando desenvolver tecnologias que mimetizem as reações naturais que acontecem no meio ambiente, como exemplo tem-se a utilização das enzimas, que são catalisadores, produzidos naturalmente pelos seres vivos, portanto, sua ação é considerada amiga do meio ambiente. Por serem bons substituintes dos produtos químicos nos processos industriais (os quais geralmente são poluidores), as enzimas ganham destaque por realizarem as mesmas reações, porém de forma limpa.

Entre as aplicações enzimáticas na indústria, destacam-se a clarificação de polpa e sucos (MEYER, 2001), clarificação de papel, produção de biocombustíveis (RAO e MENON, 2012; VIJAYALAXMI, 2013; ANWAR et al., 2014) etc. Se tratando de biocombustíveis, as enzimas celulolíticas se mostram promissoras, pois são capazes de converter um resíduo industrial em um material necessário e de valor comercial, já que a maioria dos combustíveis disponíveis no país são oriundos de fontes não renováveis como os derivados do petróleo (ANWAR et al., 2014).

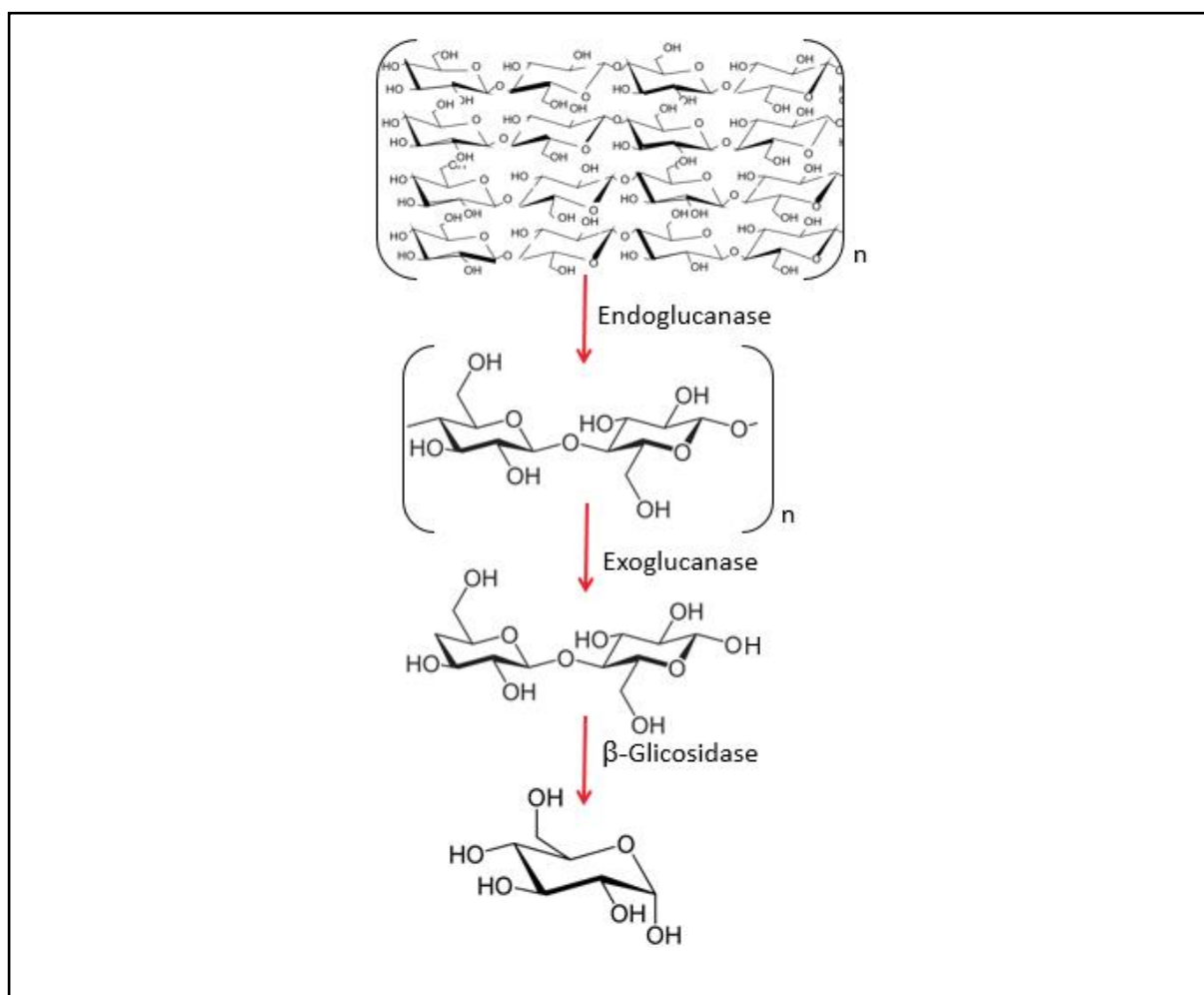
Os resíduos lignocelulósicos, são fontes de nutrientes para a fermentação e produção de enzimas, as hidrolases (celulase, xilanase e β -glicosidase), formam um complexo capaz de hidrolisar os materiais lignocelulósicos e liberar açúcares fermentescíveis, os quais podem ser fonte de nutrientes para microrganismos.

As enzimas celulolíticas e xilanolíticas são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.X, onde o valor de X varia com a enzima avaliada (HENRISSAT, 1991).

As enzimas celulolíticas são classificadas de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico (Figura 3), e são divididas em três grandes grupos:

endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica e é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose e são constituídas por celobio-hidrolases (CBH) e glucano-hidrolase (GH). As celobiohidrolases são divididas em celobiohidrolases I e II (CBH I) e (CBH II), a CBH I realiza a hidrólise de terminais redutores, e a CBH II a hidrólise de terminais não redutores; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis, em monômeros de glicose (LYND, 2002).

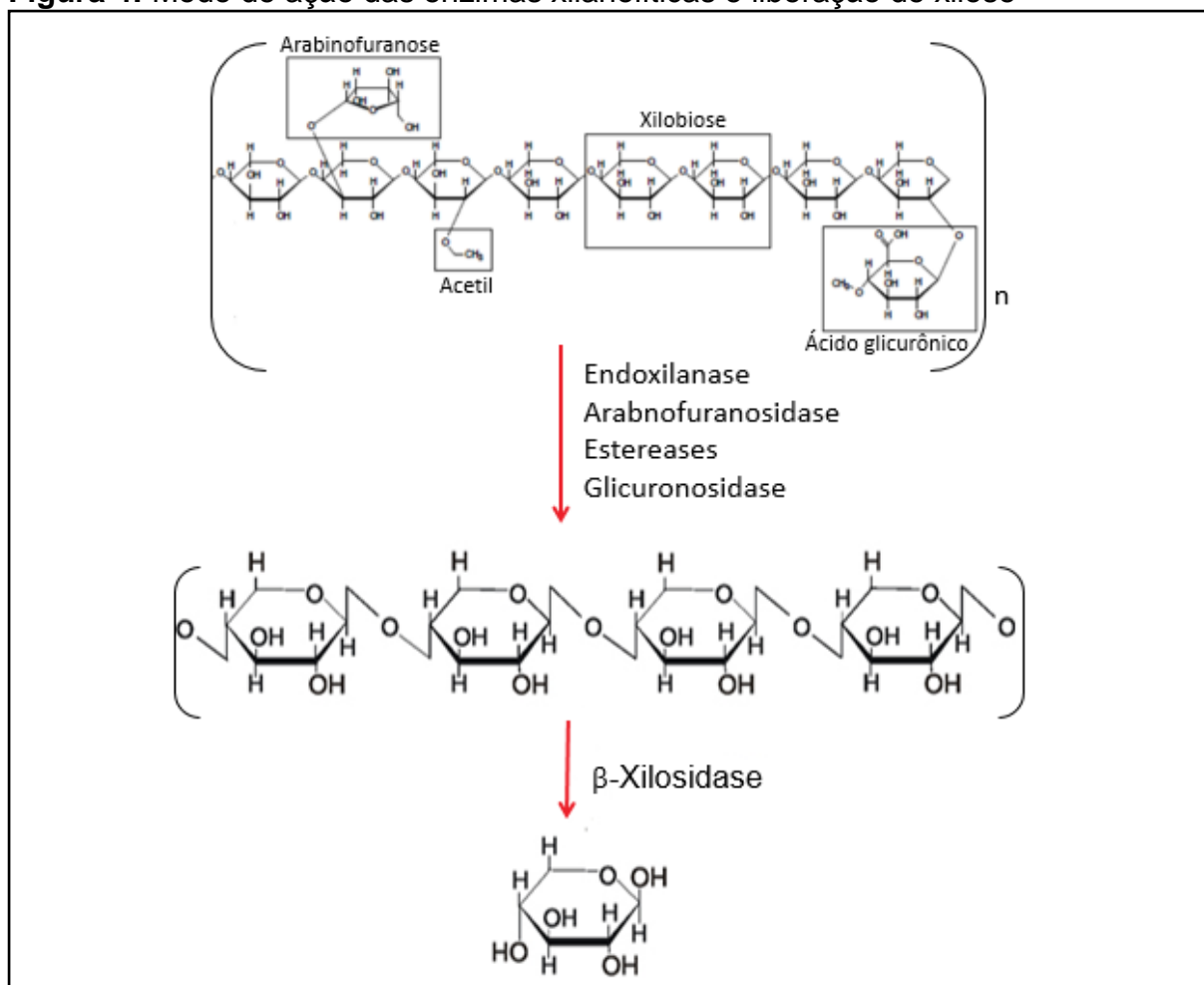
Figura 3: Modo de ação das enzimas celulolíticas e liberação de glicose



Fonte: O Autor.

A hidrólise enzimática das fibras vegetais pela ação das enzimas também envolve a participação das enzimas endo-xilanases e β -xilosidases levando a liberação de xilose pela quebra de xiloligossacarídeos. As L-arabinofuranosidases que hidrolisam os grupos terminais α -L-arabinofuranosil, as α -glucuronidases são importantes para a hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glicurônico, hidrolisando a hemicelulose (Figura 4) (SANTOS; ISHII, 2011).

Figura 4: Modo de ação das enzimas xilanolíticas e liberação de xilose



Fonte: O Autor.

A hidrólise enzimática é afetada pela acessibilidade da celulose e eficácia da celulase. Estudos revelaram que existe uma forte correlação entre taxa de hidrólise e adsorção enzimática. A acessibilidade da celulase à celulose é mais afetada pela remoção da xilana (principal componente da hemicelulose) do que pela remoção de lignina. Embora a remoção de xilana ou lignina aumente a taxa de sacarificação, a remoção de xilana impacta diretamente na acessibilidade da cadeia de glucana. Por isso, a remoção de xilana é mais vantajosa do que a remoção de lignina. A remoção da xilana ajuda na redução da inibição enzimática por xilo-oligômeros, bem como na redução da necessidade de enzimas acessórias. A digestibilidade enzimática da biomassa nativa é muito baixa, a menos que um excesso muito grande de enzima seja usado para a hidrólise, isso por causa das características estruturais do resíduo lignocelulósico (Figura 1) (SINDHU et al., 2015).

A produção dessas enzimas (Tabela 3), por microrganismos é feita via fermentação, a qual pode ser submersa ou sólida, utilizando um substrato como fonte de carbono e micronutrientes.

Tabela 3: Resíduo lignocelulósico utilizado na produção de hidrolases microbianas e condições de cultivo.

Microrganismo	Resíduo	Fermentação	Enzima Produzida	Atividade Enzimática	Ref
<i>Aspergillus niger</i> (NRRL 330, NRRL 576 e NRRL 1956)	Grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)	Submersa, 30°C, 18 dias	Xilanase	30 – 35 U.mL ⁻¹	Demirci, 2020
<i>Aspergillus niger</i>	Borra de Café	Sólido, 30°C, 3 dias	Xilanase	6496 U.g ⁻¹	Jaiswal, 2019
<i>Aspergillus niger</i> DWA8	Óleo de Palma	Sólido, 30°C, 5 dias	Celulase Xilanase	2,93 U.g ⁻¹ 5,23 U.g ⁻¹	Tai, 2019
<i>Trichoderma orientalis</i> EU7-22	Espiga de Milho e Farelo de Trigo	Submersa, 30°C, pH 5,2, 4 dias	Xilanase	108 U.mL ⁻¹	Long et al, 2017
<i>Penicillium janczewskii</i>	Bagaço de Malte	Estado Sólido, 28°C, 7 dias	Xilanases, β -xilosidase,	3370 U.g ⁻¹ 225 U.g ⁻¹	Terrasa n, 2015
<i>Trichoderma viride</i>-IR05	Bagaço de Cana pré tratado	Sólido, 30°C, 7 dias	Xilanase	72,4 U.g ⁻¹	Irfan, 2014
<i>Trichoderma reesei</i> SAF3	Farelo de Trigo	Sólido, 30°C, 4 dias	Xilanase	219 U.g ⁻¹	Kar, 2013
<i>Trichoderma viride</i>	Casca de Laranja	Estado Sólido, 30°C, pH 5,5, 4 dias	β -glucanase	2240 U.mL ⁻¹	Irshad, 2012
<i>Trichoderma viride</i>	Palha de Trigo	Estado Sólido,	Celulase	1148 U.mL ⁻¹	Iqbal, 2011

		55°C, pH 8, 7 dias			
<i>Aspergillus niger</i> IZ-9	Bagaço de cana	Submersa, 100 rpm, 30°C, 7 dias	β -glucanase Celulase e Xilanase	1,2 U.mL ⁻¹ 0,25 U.mL ⁻¹ 14 U.mL ⁻¹	Menezes, 2000

3.2.1 Fermentação Em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido, também chamada de fermentação semi-sólida (FSS), tem sido destaque nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento de resíduos agroindustriais pois reproduzem os processos naturais que ocorrem no meio ambiente. A FES pode ser aplicada com finalidade econômica lucrativa como a produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados, ou em aplicações sócio-econômicas, como agregar valor a produtos lignocelulósicos e a compostagem de resíduos (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). De forma geral, a FES é um processo fermentativo que se desenvolve na superfície de materiais sólidos (substrato sólido ou imobilizado em uma superfície) e que possui água intrínseca ao substrato, com ou sem nutrientes solúveis. Estes materiais sólidos podem ser biodegradáveis ou não. Para a FES, é necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes contidos no substrato sólido ou então na sua interface (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997). A FES pode ser caracterizada em 2 tipos: uma, em que as condições para o estado sólido são propiciadas pelo próprio substrato e a outra onde o desenvolvimento do processo se dá utilizando um suporte inerte (COUTO; SANROMÁN, 2005; LIMA et al, 2001).

O substrato sólido pode ser a fonte de carbono e nitrogênio e também de sustentação para o aumento do número e alongamento das células fúngicas. Outro fator a ser considerado é a aeração do substrato, afim de evitar que a oxigenação ocorra apenas na superfície da fase sólida. Devido à falta de homogeneidade do substrato, os nutrientes não ficam totalmente e uniformemente disponíveis ao microrganismo, ocorrendo diferenciações entre a fermentação estática e a sob agitação, sendo que a fermentação sob agitação se faz necessário instrumentalização da técnica (PINTO et al., 2005).

A FES tem se mostrado vantajosa por ter um menor risco de contaminação devido à ausência de água livre no sistema; por não ter diluição o produto final que é geralmente 3 a 4 vezes mais concentrado do que na fermentação submersa (FS) e pela falta de água livre no meio, a geração de resíduos líquidos é inexistente. As

desvantagens que o método apresenta é uma menor quantidade de microrganismos aptos a crescer nessas condições e conseqüentemente uma menor variedade de produtos gerados, e também a dificuldade de controle do processo como homogeneização e aeração do meio de cultivo (CASTRO; PEREIRA, 2010).

3.2.2 Fermentação Submersa (FS)

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio de cultura líquido, com nutrientes geralmente solúveis (ALONSO, 2001). O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle do pH, aeração e da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa estabilidade a variação de temperatura (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Este processo a nível industrial é viabilizado, pois existe maior facilidade nos processos difusionais e de mistura no sistema, aumentando assim a homogeneidade e o controle dos parâmetros cinéticos do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (COUTO; SANROMÁN, 2006).

O processo tem como desvantagem o alto custo devido a demanda energética necessária para esterilização do meio, pois a presença de água livre favorece o crescimento de outros microrganismos; outro fator importante é a extração dos produtos da solução que por estarem diluídos no meio, se faz necessário técnicas de extração para remoção e separação do produto de interesse (CASTRO; PEREIRA, 2010).

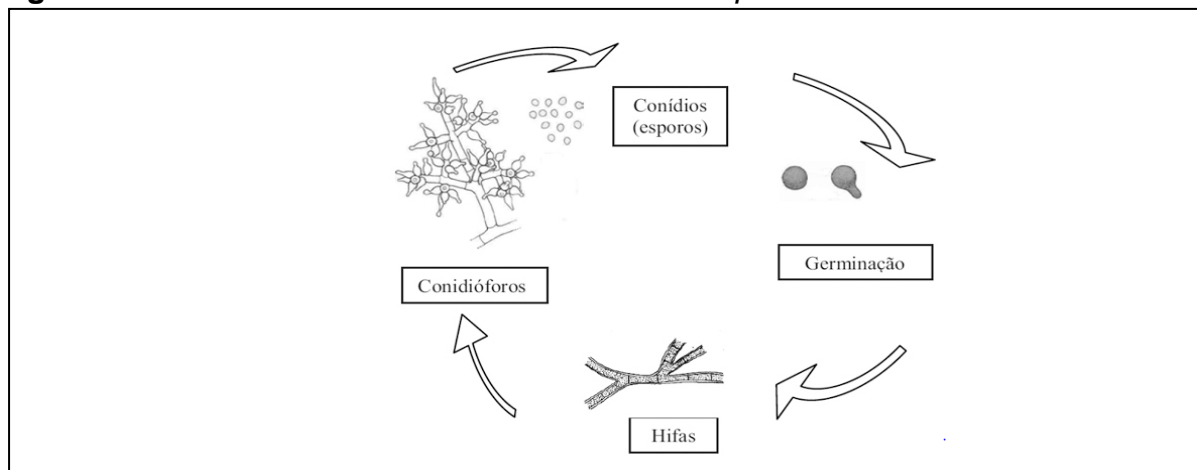
3.3 GÊNERO *TRICHODERMA*

Quando descoberto há aproximadamente 200 anos atrás, o gênero foi confundido com um *Gasteromiceto* (PERSOON, 1794) e presumido como uma única espécie. Apenas em 1969, Rifai em sua classificação para o gênero, reconheceu nove espécies: *Trichoderma viridi* Persoon, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma koningii* Lieckfeldt, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Bisset, *Trichoderma polysporum* Link e *Trichoderma glaucum* Rifai (RIFAI, 1969). Atualmente já são conhecidas mais de 254 espécies de *Trichoderma* (BISSET et al., 2015), porém a minoria teve seu genoma sequenciado.

Trichoderma sp., compreende fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente (Figura 5). Esses fungos também colonizam madeira, onde a fase sexual teleomorfa (gênero *Hypocrea*) é frequentemente encontrada. Muitas linhagens

não possuem ciclo sexual conhecido, sendo classificadas na sub-divisão Deuteromycotina. Os deuteromicetos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (MACHADO et al., 2012).

Figura 5: Ciclo de vida assexual de *Trichoderma ssp.*



Fonte: MACHADO et al., 2012.

Os fungos do gênero *Trichoderma* podem ser isolados de solos temperados e tropicais. Algumas linhagens de *Trichoderma* apresentam a capacidade de inibir fitopatógenos, promover o crescimento vegetal e de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças (MACHADO et al., 2012). Altomare et al. (1999) apontou em seu estudo, que o isolado T-22 do fungo *Trichoderma harzianum* Rifai promovia o crescimento dos vegetais através da sua habilidade de solubilizar nutrientes importantes para a planta, isso pois secretam complexos enzimáticos para a decomposição de substratos.

Além de todas as suas aplicabilidades, os fungos do gênero atuam também na produção de enzimas com interesse biotecnológico, como por exemplo na produção de celulases e xilanases (IRSHAD, 2012; IQBAL, 2011; ZIMMER et al., 2009; REZENDE et al, 2002). Essas enzimas em conjunto, através da hidrólise da parede vegetal de plantas em açúcares fermentescíveis, formam um complexo enzimático importante para o futuro das biorrefinarias.

Como visto o bagaço de malte é uma fonte nutricional importante, ainda pouco explorada, produzida em grandes quantidades no Sul do país e pode servir de substrato para o gênero *Trichoderma*, já que o mesmo tem a capacidade de produzir hidrolases, valorizando assim o resíduo da indústria cervejeira.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO: ORIGEM E MANUTENÇÃO

Foram utilizadas 13 cepas do gênero *Trichoderma*. O *Trichoderma harzianum* Rifai, foi isolado no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, a partir de um tronco de peroba em decomposição; classificado na Universidade Estadual de Pernambuco, pelo departamento de Micologia (BARBOSA, 1992). As outras cepas (Tabela 4) foram isoladas de solos de diferentes campos de cultivo da região norte do Paraná (Londrina e Bandeirantes) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ciro Hideki Sumida do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – PR, e identificadas no trabalho de Mariane Mendes (2019) no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - PR. A armazenagem destas cepas tem sido feita através da técnica de Castellani (CASTELLANI, 1963).

Dentre as 13 cepas utilizadas, 12 estão classificadas, e foram numeradas conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Origem e classificação das cepas de *Trichoderma sp.*

Código	Cepa de <i>Trichoderma</i>	Local isolado
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	Peroba/Londrina
T2	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T3	<i>Trichoderma asperellum</i>	Couve/Londrina
T4	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T5	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T6	<i>Trichoderma harzianum</i>	Milho/Londrina
T7	<i>Trichoderma sp</i>	Milho/Londrina
T8	<i>Trichoderma harzianum</i>	Milho/Londrina
T9	<i>Trichoderma yunnanense</i>	Tomate/Londrina
T10	<i>Trichoderma citroviridae</i>	Milho/Londrina
T11	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes
T12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes
T13	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes

Os repiques trimestrais das cepas se deu em meio de Vogel sólido acrescido de xilose 1% e ágar 2 %.

4.2 SUBSTRATO LIGNOCELULÓSICO

O substrato utilizado foi o bagaço de malte gentilmente fornecido pela Cervejaria Spoller, localizada na PR 445, número 17000, Londrina-PR. O material recebido foi seco em estufa a 70° C, até peso seco constante, e em seguida armazenado em sacolas Kraft a temperatura ambiente.

4.3 MEIOS DE CULTIVO

O meio de Vogel foi utilizado como meio basal para os cultivos de FES, FS e para manutenção dos microrganismos Tabela 5, e a solução de elementos traços conforme a Tabela 6.

Tabela 5: Preparo do Meio descrito por Vogel, 1956.

Reagentes	Concentração
Na ₃ citrato .5H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ 7. H ₂ O	10 g
CaCl ₂ 2. H ₂ O	5 g
Solução Elementos Traços	5 ml
Solução de Biotina	2,5 ml

O volume final foi acertado para 1L, esse meio foi diluído 50 vezes em água destilada. A solução de Biotina foi preparada dissolvendo-se 5,0 mg de biotina (Merck) em 50 mL de água destilada, o pH foi ajustado para 5,8 e 6.

Tabela 6: Preparo da solução de elementos traços utilizados no meio Vogel.

Reagentes	Concentração
Ácido cítrico hidratado	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5 g
Fe (NH ₄) (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ .1H ₂ O	0,25 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05 g

O volume final da solução de elementos traços é de 100 ml.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE

A composição das fibras dietéticas e umidade, foram determinadas de acordo com os métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

4.4.1 Umidade

O material a ser analisado foi colocado em um recipiente inerte, sem tendência a absorver umidade e com resistência a temperaturas acima de 100 °C, lavado e seco em estufa. A seguir, o conjunto material-recipiente foi levado à estufa a 105 ± 2 °C, por pelo menos três horas. Em seguida, o conjunto foi retirado e transferido para um dessecador até atingir a temperatura ambiente para pesagem. Para aumentar a precisão e a exatidão da análise, o conjunto foi recolocado na estufa por mais trinta minutos, no mínimo, e o procedimento de resfriamento-pesagem repetido até a obtenção de uma massa constante. Obtidos os valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra úmida (MAU), da massa do conjunto recipiente/ amostra úmida (MRAU) e da massa do conjunto recipiente/amostra seca (MRAS), obtém-se o peso da massa da amostra seca (AS) e, conseqüentemente, a determinação do teor de umidade (TU%), de acordo com a equação a seguir:

$$TU(\%) = \frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU}$$

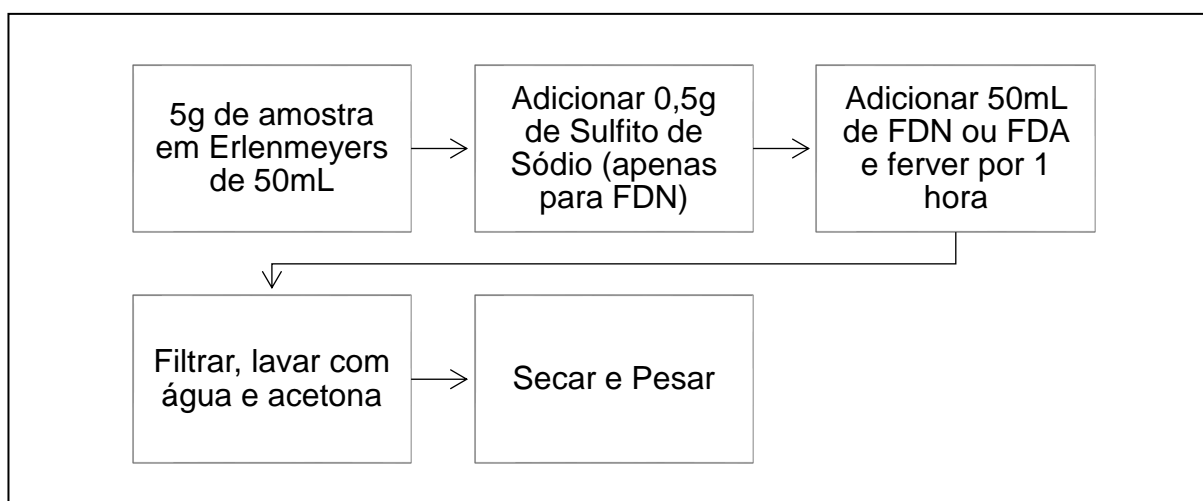
Os cálculos de porcentagem de umidade foram determinados utilizando a norma 44-01 do volume 2 de metodologias aprovadas pela associação Americana de químicos de Cereais (AACC Method, 1983).

4.4.2 Fibras dietéticas

O método utilizado para determinação das fibras dietéticas foi gravimétrico e denominado método detergente.

Para determinação de celulose e hemicelulose foi utilizado o detergente ácido (FDA – Fibra por detergente ácido) e o detergente neutro (FDN – Fibra por detergente neutro). A metodologia para ambos foi realizada como apresentado na Figura 6.

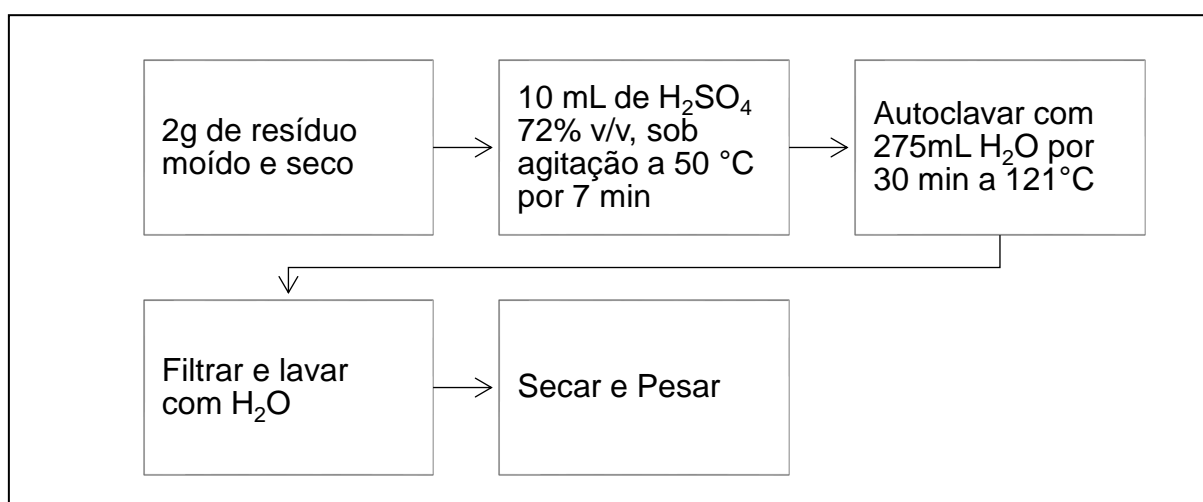
Figura 6: Fluxograma da metodologia para FDN e FDA.



O teor de hemicelulose foi calculado por (%FDN - %FDA). E o teor de celulose por (%FDA - %Lignina).

Para determinação da Lignina, foi utilizado o método proposto por Gouveia et al. (2009), conforme fluxograma da Figura 7.

Figura 7: Fluxograma da metodologia para determinação de lignina.



A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a equação:

$$L_{Ki} = \frac{Mk - Mc}{Ma} \cdot 100$$

* L_{Ki} – Lignina Klason insolúvel; Mk – massa de lignina insolúvel seca; Mc – massa de cinzas; Ma – massa da amostra seca.

4.5 CULTIVOS EM BAGAÇO DE MALTE

4.5.1 Preparo do Inóculo

As cepas foram transferidas do meio de manutenção para tubos de ensaio contendo meio de Vogel acrescido de 1 % (m/v) de xilose e 2 % ágar. Foram incubados a 28 ± 2 °C por 5 dias. Os esporos produzidos foram retirados assepticamente pela adição de salina fisiológica contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v); a suspensão obtida foi quantificada em câmara de Neubauer para conter de 10^7 a 10^8 UFC.mL⁻¹ (REZENDE et al., 2002) e utilizada como inóculo.

4.5.2 Cultivos de Fermentação em Estado Sólido (FES)

O microrganismo foi cultivado em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 3,5 g de bagaço de malte umedecidos com 10 mL do meio de Vogel (tabela 5). Foram inoculados assepticamente 150 µL do inóculo contendo 10^7 UFC.mL⁻¹ e os cultivos foram mantidos a 28 ± 2 °C por 5 dias (REZENDE et al., 2002). Posteriormente os cultivos foram interrompidos adicionando 25 mL de água destilada ao material fermentado e homogeneizado com bastão de vidro. Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido para tubos Falcon e centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos, o material obtido foi denominado extrato bruto enzimático (EBE) e utilizado para as determinações de atividade enzimática.

4.5.3 Cultivos de Fermentação Submersa

Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 0,35 g suspensos em 25 mL de meio de Vogel, incubados a 28 ± 2 °C, 180 rpm por 5 dias. A interrupção dos cultivos foi feita por centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto enzimático (EBE) e utilizado para as determinações de atividade enzimática.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.6.1 Celulase

Para a determinação da atividade celulásica do EBE, onde uma unidade de atividade é definida como µmols de glicose liberados por minuto por mL do EBE, utiliza-se do sistema de incubação com 0,5mL da mistura de tampão citrato 5 mM, pH

5 contendo CMCCase 1 % e 0,5 mL de EBE (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição de 1 mL de DNS (MILLER, 1958). Os açúcares redutores foram determinados pela técnica descrita por Miller, 1958.

Para a determinação da atividade em U/mL foram realizados os seguintes cálculos:

$$U/mL = \mu g \text{ de glicose} \times 2 \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \times \frac{1}{10} (\text{tempo incubação}) \times \frac{1}{180} (\mu mols \text{ glicose})$$

4.6.2 Xilanase

A unidade de atividade xilanásica é definida como μ mols de xilose liberados por minuto por mL do EBE. O sistema de incubação consistiu em 0,5 mL de uma solução de xilana de “Beechwood” 1 % (m/v) em tampão acetato 50 mM, pH 5 e 0,5 mL de extrato enzimático, totalizando 1,0 mL de volume final adaptado de Periyasamy et al., (2017). O ensaio foi mantido à 50 °C por 5 minutos e interrompido pela adição de 1 mL do reativo de DNS (MILLER, 1958). Os açúcares redutores foram determinados pela técnica descrita por Miller, 1958.

Para o cálculo da unidade de atividade Xilanásica foi utilizado a equação a seguir:

$$U/mL = \mu g \text{ de xilose} \times 40 \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \times \frac{1}{5} (\text{tempo incubação}) \times \frac{1}{150} (\mu mols \text{ xilose})$$

4.6.3 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de β -glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ M p-NP min^{-1} , nas condições experimentais. A atividade específica de β -glicosidase foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA mg^{-1} de proteínas. O sistema de incubação consiste em 1 mL da mistura de tampão citrato pH 5, com p-NPG 1 mM incubados por 10 minutos a 30°C, adicionando em seguida 0,25 mL de extrato enzimático que permanecem incubados por mais 30 minutos a 30 °C, a reação é paralisada pela adição de 1,25 mL de carbonato de sódio 0,5 M (SANTOS, 2010).

Para determinação da unidade de atividade β -glicosidase foi utilizado a equação a seguir:

$$U/mL = \mu g \text{ de } pNP \times 4 \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \times \frac{1}{30} (\text{tempo de incubação}) \times \frac{1}{139,11} (\mu\text{mols de } pNP)$$

4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULASE, XILANASE E β -GLICOSIDASE

DBC em esquema fatorial: Delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 13×2 foi realizado para determinação do melhor método fermentativo para produção de hidrolases. As variáveis em estudo foram tipo de fermentação, estado sólido (item 4.5.2) e submerso (item 4.5.3), e cepas de *Trichoderma*, sendo avaliadas 13 cepas. Os tratamentos em delineamento em blocos ao acaso foram repetidos em três tempos, considerando o dia de início do experimento como critério de bloqueamento (Bloco A, B e C). E realizado pelo software R (R Core Team, 2019), de acordo com a Tabela 7 a seguir:

Tabela 7: Delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial para avaliação da produção de enzimas por diferentes cepas de *Trichoderma* em fermentação em estado sólido (FES) e em estado submerso (FS).

Número Ensaio	Blocos	Cepa de <i>Trichoderma</i>	Tipo de Fermentação
1	A	T11	FS
2	A	T3	FES
3	A	T6	FES
4	A	T8	FES
5	A	T9	FS
6	A	T12	FS
7	A	T5	FES
8	A	T5	FS
9	A	T7	FS
10	A	T13	FS
11	A	T10	FES
12	A	T4	FS
13	A	T3	FS

14	A	T7	FES
15	A	T1	FES

Tabela 7: Delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial para avaliação da produção de enzimas por diferentes cepas de *Trichoderma* em fermentação em estado sólido (FES) e em estado submerso (FS).

16	A	T11	FES
17	A	T6	FS
18	A	T8	FS
19	A	T1	FS
20	A	T4	FES
21	A	T13	FES
22	A	T10	FS
23	A	T2	FES
24	A	T12	FES
25	A	T2	FS
26	A	T11	FES
27	B	T10	FES
28	B	T9	FS
29	B	T6	FES
30	B	T2	FES
31	B	T11	FS
32	B	T3	FES
33	B	T10	FS
34	B	T4	FS
35	B	T5	FES
36	B	T6	FS
37	B	T1	FS
38	B	T13	FES
39	B	T7	FS
40	B	T3	FS
41	B	T4	FES
42	B	T8	FES
43	B	T2	FS

44	B	T8	FS
Tabela 7: Delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial para avaliação da produção de enzimas por diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> em fermentação em estado sólido (FES) e em estado submerso (FS).			
45	B	T1	FES
46	B	T5	FS
47	B	T7	FES
48	B	T12	FES
49	B	T9	FES
50	B	T11	FES
51	B	T13	FS
52	B	T12	FS
53	C	T1	FS
54	C	T12	FES
55	C	T1	FES
56	C	T4	FES
57	C	T7	FS
58	C	T12	FS
59	C	T13	FES
60	C	T6	FS
61	C	T11	FES
62	C	T9	FES
63	C	T2	FS
64	C	T3	FES
65	C	T11	FS
66	C	T3	FS
67	C	T4	FES
68	C	T13	FS
69	C	T5	FS
70	C	T10	FES
71	C	T8	FS
72	C	T6	FES
73	C	T10	FS

74	C	T9	FS
Tabela 7: Delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial para avaliação da produção de enzimas por diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> em fermentação em estado sólido (FES) e em estado submerso (FS).			
75	C	T4	FS
76	C	T8	FES
77	C	T7	FES
78	C	T2	FES

Após seleção da cepa e tipo de fermentação pelo delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial, o delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2^2 com adição de pontos centrais foi realizado para avaliação das variáveis temperatura e volume de solução umedecedora, solução de Vogel (Tabela 8). A variável resposta do experimento foi a atividade enzimática. Posteriormente, ensaios foram conduzidos em pontos centrais adicionais para melhor compreensão do modelo estatístico (Tabela 9 e 10).

Tabela 8: Experimento de otimização utilizando fermentação em estado sólido e a cepa T8, variando temperatura e quantidade de solução umedecedora (Vogel).

Temperatura (°C)	Solução Umedecedora (mL)
24 (+1)	5 (-1)
24 (+1)	15 (+1)
32 (-1)	5 (-1)
32 (-1)	15 (+1)
28 (0)	10 (0)
28 (0)	10 (0)
28 (0)	10 (0)
28 (0)	10 (0)

Tabela 9: Pontos centrais adicionais para otimização das enzimas celulase e β -glicosidase.

Temperatura (°C)	Solução Umedecedora (mL)
28 (0)	5 (-1)
28 (0)	15 (+1)
24 (-1)	10 (0)
32 (-1)	10 (0)

Tabela 10: Pontos centrais adicionais e pontos para verificar a curvatura para otimização da enzima xilanase.

Temperatura (°C)	Solução Umedecedora (mL)
28	11,5
28	13
28	14,5
28	16
28	17,5
28	19

4.7.2 Avaliação do Melhor Tempo de Fermentação

Nas condições otimizadas definidas por meio dos experimentos fatoriais (item 4.7) realizou-se uma fermentação por 10 dias para avaliação do melhor tempo para produção das enzimas. A atividade enzimática foi avaliada diariamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico, intitulado de “Valorização do Resíduo da Indústria Cervejeira na Produção de Hidrolases Fúngicas”, apresentado no Apêndice A

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, D.M.N., et al. Resíduo desidratado de cervejaria para suínos em terminação [Dehydrated residue of brewery for finishing swine] **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 63, n. 2, p. 465-472, 2011.
- ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). **Dissertação de mestrado**, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T. E HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, n.65, v.7, p. 2926-2933, 1999.
- ANWAR, Z. GULFRAZ M., IRSHAD M., Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, pg. 163-173, 2014
- BISSET J, GAMS W, JAKLITSCH W, SAMUELS GJ (2015) Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**. v. 6, p. 263–295.
- BRANDÃO, V.S.; MATOS, A.T.; FONTES, M.P.F.; MARTINEZ, M.A. Retenção de poluentes em filtros orgânicos operando com águas residuárias da suinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.2, p.329-334, 2003.
- BRANDÃO, V.S.; MATOS, A.T.; MARTINEZ, M.A.; FONTES, M.P.P. Tratamento de águas residuárias de suinocultura utilizando-se de filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.3, p.327-333, 2000.

BRUST L.A.C., Intoxicação por etanol contido em “levedo de cerveja” em bovinos. **Tese de Doutorado**, Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p.68, 2011.

BRUST L.A.C.; ARAGÃO A.P.; BEZERRA Jr P.S.; GALVÃO A., et al., Enfermidades em bovinos associadas ao consumo de resíduos de cervejaria. **Pesq. Vet. Bras.** v.35, ed.12, p.956-964, 2015.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 283-284, 1963.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. **Biotechnology Progress**, v.17, p.1061-1064, 2001.

CERVBRASIL, Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. O Mercado Cervejeiro, Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/mercado-cervejeiro/>. Acessado em: 11 nov. 2018.

CERQUEIRA V. D. et al., Ethanol poisoning in cattle fed with malted barley waste with brewer’s yeast, **Pesq. Vet. Bras.** v.38 no.3, 2018.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p. 291-302, 2006.

COLDEBELLA, I. J.; RADÜNZ, J. N., Farelo de soja na alimentação de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*), **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p.499-503, 2002.

COSSOLIN A. S, et al., Malt Bagasse Waste as Biosorbent for Malachite Green: An Ecofriendly Approach for Dye Removal from Aqueous Solution, **International Journal of Biotechnology and Bioengineering** v. 12, n.4, 2018.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **J. of Bioch. and Biophysical Methods**, v.52, p.59-62, 2002.

DEY, G.; NAQPAL, V.; BANERJEE, R. Immobilization of alpha-amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. **Appl Biochem Biotechnol.**, p.303-313, 2002.

EICHLER P., Cultivo em Estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para produção de Lipases. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

EMBRAPA, Produção Anual de Cultivares, Disponível em:
<<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em: 10 nov. 2018.>

HENRISSAT, B. A.; A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. Journal**, p. 280-309, 1991.

HIZIROGLU, S. et al. Properties of bamboo-rice straw-eucalyptus composite panels. **Forest Products Journal**, Madison, v. 55, n. 12, p. 221-225, Dec. 2005.

IQBAL, H. M. N.; AHMED, I.; ZIA, M. A.; IRFAN, M., Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulose produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 149-156.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A., Characterization of Exo 1,4-b-glucanase produced from *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of orange peel waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 580-584, 2012.

JUCHEN P. T., et al., Biosorption of reactive blue BF-5G dye by malt bagasse: kinetic and equilibrium studies, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2018.

GOUVEIA E.R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HENRISSAT, B. A.; A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. Journal**, p. 280-309, 1991.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K; ARAKI, Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers spent grain for the treatment of ulcerative colitis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n.2, p. 223-228, 2010.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p. 249–278, 2001.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT E. K.; Brewers spent grain: a review with an emphasis on food and health, **Journal Inst. Brew**, pg. 122: 553, n. 56, 2016.

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; HAMINIUK, C. W. I.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, E. D.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental design. **Food Technol. Biotechnol.**, Zagreb, v. 46, p.183-189, 2008.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 26, p. 274-288, jan/jun 2012.

MALI, S.; MELLO R.P.F., Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch, **Industrial Crops and Products**, v.55, pg. 187–193, 2014.

MATSUURA, M.; OBATA, A. B-glicosidases from soyabeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 144-147, 2006.

McMICHAEL, P., A food regime genealogy. **Journal of Peasant Studies**. v. 36, n. 1, p. 139-169, 2009.

MELO, R. R. Propriedades físico-mecânicas e resistência a biodeterioradores de chapas aglomeradas constituídas por diferentes proporções de madeira e casca de arroz. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2009.

MENEZES, T. J. B.; AGUIAR, C. L., Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar, **B.CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

MEYER A. S.; KÖSER C.; ADLER-NISSEN J., Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice, **Journal Agriculture Food Chemical**, v.49, p.3644-3650, 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anal. Chemistry**, p. 426-428, 1958.

MITCHELL, D. A.; MEIEN, O. F. V.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochem. En. J.**, v.13, p. 137-147, 2003.

MÜLLER, Carlos Vitor. A cerveja no brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. **Ministério da Agricultura**, 2016.

NDAZI, B. et al. Production of rice husks composites with Acacia mimososa tannin-based resin. **Journal of Materials Science**, v. 41, p. 6978-6983, 2006.

PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESAN, S. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. **Arabian Journal for Science and Engineering**. v.42 (1), p. 53-63, 2017.

PERSOON C. H., Dispositio methodica fungorum. **Neues Magazin für die Botanik**, p. 81–128, 1794.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólida: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa**, p. 2-5, 2005.

PONGMANEERAT, J., WATANABE T. Nutritional evolution of the soybean meal for rainbow trout and carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, n.1, p.157-163, 1993.

R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL< <https://www.R-project.org/>>

RAJ T. et al., Physical and chemical characterization of various Indian agriculture residues for biofuels production. **Energy Fuels**, p. 1-27, 2015.

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

REINOLD, M.R., **Manual prático de cervejaria**, Aden Editora e Comunicações Ltda, São Paulo, p. 214, 1997.

REZENDE, M.I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; SAKURADA, A. E. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 67-72, 2002.

RIFAI MA, A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, 1969.

RIGO, M. et al. Physical-chemical and sensory characterization of cookies added with brewer's spent grain flour as fiber supply. **Ambiência Guarapuava (PR)** v.13, n.1, p. 47 – 57, 2017.

SANTOS, F. L.; ISHII, L. P. Xilanases: principais metodologias e parâmetros cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.2, p.7-15, 2011.

SHINDHU R., BINOD, P., PANDEY, B., Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview, **Bioresource Technology**, Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>>, Acessado em: 18 nov. 2018.

STEINMACHER, N. C. Xilanases e extrusão reativa na modificação de bagaço de malte para emprego em panificação. **Tese de Doutorado** em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

SUN, J., TIAN, C., DIAMOND, S., GLASS, N. L. Deciphering Transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 4, p. 482-493, 2012

TERRASAN C. R. F.; CARMONA E. C., Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 6, p. 1826–1836, 2015.

US DOE. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: A joint research agenda. DOE/SC-0095. U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 2006. Disponível em: <<https://genomicscience.energy.gov/biofuels/b2bworkshop.shtml>>. Acessado em: 26 nov. 2018.

VIJAYALAXMI, S. et al. Production of bioethanol from fermented sugars of sugarcane bagasse produced by lignocellulolytic enzymes of *Exiguobacterium sp.* VSG-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 1, p. 246-260, 2013.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) Advances in solid-state fermentation. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 1997.

VOGEL, H.A. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Benet_ Bull.**, v.13, p.42-43, 1956.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, L. G.; TRENTIN, S. D.; JÚNIOR, W. C.; FRASSON, P. A.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, J. A. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p.123-137, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo: “Valorização do Resíduo da Indústria Cervejeira na Produção de Hidrolases Fúngicas”

Título: Valorização do Resíduo da Indústria Cervejeira na Produção de Hidrolases Fúngicas.

Autores: Eloisi Feijó de Araújo¹, Maria Inês Rezende¹ e Guilherme Biz²

Afiliação: ¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

²Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondência do Autor: Eloisi Feijó de Araújo¹; e-mail: eloisifeijo@outlook.com; Tel: +55 43 99630-7602

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, e a maioria das indústrias cervejeiras do país estão localizadas na região Sul e Sudeste, cerca de 85 % de todo o resíduo gerado na indústria cervejeira é de bagaço de malte, material composto de celulose, hemicelulose e lignina, disponível o ano todo a baixos ou nenhum custo. Neste estudo foi avaliado o potencial do resíduo da indústria cervejeira, como um substrato na produção de enzimas extracelulares microbianas (hidrolases) via fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). Esquemas fatoriais foram utilizados para otimização do processo fermentativo, sendo estudado o efeito dos tipos de fermentação, estado sólido e submersos, diferentes cepas de *Trichoderma*, além da temperatura e volume de solução umedecedora, visando obter maior atividade enzimática. O melhor tempo de produção foi determinado avaliando a atividade enzimática ao longo de 10 dias em condições otimizadas. A produção máxima encontrada foi de xilanase e não houve diferença significativa entre os métodos FES e FS para a atividade xilanolítica, que foi de 146,72 U.mL⁻¹ na FS e de 136,77 U.mL⁻¹ na FES (*Trichoderma citroviridae*). A atividade celulolítica máxima obtida foi de 6,15 U.mL⁻¹ (*Trichoderma harzianum*) na FES, na FS a atividade celulolítica foi menor. Esses valores demonstram que o resíduo da indústria cervejeira tem potencial para ser utilizado em fermentações no estado sólido e submerso na produção de xilanases e celulases, a β -glicosidase não foi encontrada em valores significativos em nenhum dos métodos fermentativos para nenhuma espécie do gênero *Trichoderma*. Os métodos FES e FS não diferem estatisticamente na produção de xilanase, mas diferem na produção de celulase, sendo a celulase melhor produzida por FES e pelo *Trichoderma harzianum* (T6), com os valores máximos de atividade encontrados em apenas 3 dias de produção para xilanase e de 4 dias para a celulase.

Palavras-chave: Bagaço de malte, *Trichoderma harzianum*, Celulase, Xilanase, β -glicosidase.

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica do bagaço de malte, gerado em grandes quantidades no Sul do Brasil, é rico em nutrientes com composição básica de 10 – 20 % de celulose, 20 – 30 % de hemicelulose e 10 – 30 % de lignina (KANAUCHI et al, 2001; MALI, 2014; RIGO, 2017). O bagaço de malte é um resíduo ainda pouco explorado, tem sido aplicado em pequenas quantidades na alimentação animal e na panificação, além disso, tem sido estudado para aplicação em bandejas biodegradáveis e como biosorvente de corantes (STEINMACHER, 2010; MALI, 2014; ALBUQUERQUE et al, 2011; COSSOLIN et al, 2018; JUCHEN et al, 2018).

Os substratos lignocelulósicos, podem ser aplicados com finalidade econômica lucrativa na produção das hidrolases, via fermentação submersa (FS) ou fermentação no estado sólido (FES). Nas fermentações submersas, as condições de cultivo são viabilizadas industrialmente pela facilidade de controle dos parâmetros cinéticos, dos processos difusionais e na homogeneidade do sistema (COUTO; SANROMÁN, 2006), a desvantagem da FS é a demanda energética para esterilização do meio, pois a demanda de água livre favorece o crescimento de outros microrganismos (CASTRO; PEREIRA, 2010). Essa desvantagem é reduzida na FES, pois sem água livre no sistema, diminuem os riscos de contaminação e os custos de esterilização, além de ser menos susceptível a inibição pelo substrato, permite a utilização da energia em sua forma natural, mimetizando as condições da natureza, facilitando assim a destinação de resíduos agroindustriais (SOCCOL et al., 2017). Outra vantagem da FES é que as atividades catalíticas e termodinâmicas se mostraram mais eficientes, além de uma maior estabilidade enzimática em relação a concentração de sais e variações de pH (KAR et al, 2013).

O objetivo deste trabalho foi a utilização do bagaço de malte, como substrato na otimização da produção de hidrolases, selecionando entre 13 diferentes cepas do gênero *Trichoderma* sp. e os métodos fermentativos FS e FES as melhores condições para produção. Possibilitar a conversão dessa biomassa que é disponibilizada nos diferentes processos o ano todo a baixos ou nenhum custo, em produtos de alto valor agregado como as hidrolases, permite a diversificação e o desenvolvimento econômico, além de contribuir com o controle dos problemas ambientais gerados pela formação de resíduos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO: ORIGEM E MANUTENÇÃO

As cepas de *Trichoderma*, foram isoladas de solos de diferentes campos de cultivo da região norte do Paraná (Londrina e Bandeirantes), e gentilmente cedidas pelo professor Dr. Ciro Hideki Sumida do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – PR. O *Trichoderma harzianum* Rifai, foi isolado no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, a partir da peroba em decomposição; classificado na Universidade Estadual de Pernambuco, pelo departamento de Micologia (BARBOSA, 1992). As demais cepas foram identificadas por Mariane Mendes no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - PR.. A manutenção destas cepas tem sido feita através da técnica de Castellani (CASTELLANI, 1963).

Tabela 1: Origem e identificação das cepas de *Trichoderma*.

Código	Espécie	Local isolado
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	Peroba/Londrina
T2	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T3	<i>Trichoderma asperellum</i>	Couve/Londrina
T4	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T5	<i>Trichoderma asperellum</i>	Milho/Londrina
T6	<i>Trichoderma harzianum</i>	Milho/Londrina
T7	<i>Trichoderma spp.</i>	Milho/Londrina
T8	<i>Trichoderma harzianum</i>	Milho/Londrina
T9	<i>Trichoderma yunnanense</i>	Tomate/Londrina
T10	<i>Trichoderma citroviridae</i>	Milho/Londrina
T11	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes
T12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes
T13	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cana/Bandeirantes

2.2 PREPARO DO INÓCULO

As cepas foram transferidas do meio de manutenção para tubos de ensaio contendo meio descrito por Vogel, (1956), acrescido de 1 % (m/v) de xilose e 2% (m/v) de ágar, e incubados a 28 ± 2 °C por 5 dias. Os esporos produzidos foram retirados

asépticamente pela adição de salina fisiológica contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v); a suspensão obtida foi quantificada em câmara de Neubauer e transferido para os cultivos em bagaço de malte 150 μ L contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ (REZENDE et al., 2002).

2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

O microrganismo foi cultivado em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 3,5 g de bagaço de malte e como solução umedecedora 10 mL do meio de Vogel. Foram inoculados 150 μ L contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ e os cultivos foram mantidos a 28 ± 2 °C por 5 dias (REZENDE et al., 2002). Após o período de incubação os cultivos foram interrompidos, adicionando 25 mL de água destilada. Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido para tubos Falcon e centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto enzimático (EBE).

2.4 CULTIVOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS)

Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 0,35 g (m/v) em 25 mL de meio de Vogel, incubados a 28 ± 2 °C, 180 rpm por 5 dias. A interrupção dos cultivos foi feita por centrifugação a 0 °C, 9000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto enzimático (EBE).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE NO PRÉ E PÓS FERMENTAÇÃO

O material proveniente da indústria foi seco em estufa a 70 °C *overnight*, resfriado em dessecador e pesado, colocado na estufa novamente por mais uma hora, resfriado e pesado, até massa constante. As fibras dietéticas do material foram quantificadas pelo método detergente adaptado de Van Soest (1965).

O valor percentual de FDA e FDN foram obtidos adicionando 50 mL de detergente neutro (FDN) ou ácido (FDA) em 5 g de bagaço de malte moído e seco, em erlenmeyers de 50 mL, a mistura foi colocada em banho fervente por 1 hora e em seguida filtrados e lavados com água e acetona, secos e pesados. Os resultados da pesagem de ambos procedimentos foram utilizados para o cálculo das porcentagens em FDN e FDA. O teor de hemicelulose foi calculado por (%FDN - %FDA). E o teor de celulose por (%FDA - %Lignina).

A lignina foi determinada pelo método proposto por Gouveia et al. (2009); foram colocados em erlenmeyeres, 2 g de bagaço de malte moído e seco e 10 mL de H₂SO₄

foram colocados sob agitação a 50 °C por 7 minutos, em seguida autoclavados com 275 mL de água por 30 minutos, filtrados, lavados com água secos e pesados.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.6.1 CELULASE

A unidade de atividade celulásica é definida como μmols de glicose liberados por minuto por mL do EBE. O sistema de incubação consistiu em 0,5 mL da mistura de tampão citrato 5 mM, pH 5 contendo CMCase 1 % e 0,5 mL de EBE (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição de 1 mL de DNS (MILLER, 1958). Os açúcares redutores foram determinados pela técnica descrita por Miller, 1958.

2.6.2 XILANASE

A unidade de atividade xilanásica é definida como μmols de xilose liberados por minuto por mL do EBE. O sistema de incubação consistiu em 0,5 mL de uma solução de xilana de "Beechwood" 1 % em tampão acetato 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático, totalizando 1,0 mL de volume final adaptado de Periyasamy et al., (2017). O sistema foi mantido à 50 °C por 5 minutos e interrompido pela adição de 1 mL de DNS (MILLER, 1958). Os açúcares redutores foram determinados pela técnica descrita por Miller, 1958.

2.6.3 β -GLICOSIDASE

A unidade de atividade de β -glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μM p-NP min^{-1} , nas condições experimentais. A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). A atividade específica de β -glicosidase foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas.

2.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 13×2 foi realizado para determinação do melhor método fermentativo para produção de hidrolases. As variáveis em estudo foram tipo de fermentação, estado sólido e submerso, e cepas de *Trichoderma*, sendo avaliadas 13 cepas (Tabela 1). Os tratamentos em delineamento

em blocos ao acaso foram repetidos em três tempos, considerando o dia de início do experimento como critério de bloqueamento (Bloco A, B e C) totalizando 79 ensaios. A variável resposta foi a atividade enzimática (U mL^{-1}) das hidrolases.

2.8 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULASE, B-GLICOSIDASE E XILANASE

Delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2^2 composto de face centrada foi realizado para avaliação do efeito da temperatura (24; 28; 32°C) e volume de solução umedecedora (5; 10; 15 mL). A variável resposta foi atividade enzimática (U mL^{-1}) das hidrolases.

2.9 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO DAS HIDROLASES

Também foi avaliado após a otimização, a produção das enzimas ao longo de 10 dias de experimento, utilizando a fermentação em estado sólido e o *Trichoderma harzianum* (T6), foram fermentados em triplicatas nas condições otimizadas e diariamente paralisados 3 erlenmeyers para determinação da atividade enzimática, afim de definir em quanto tempo é obtido produção máxima de cada uma das enzimas avaliadas.

2.10 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2019). Para os modelos apresentados, a qualidade de ajuste da equação foi expressa pelo coeficiente de determinação ajustado e sua significância estatística foi avaliada pelo teste F. Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979). E teste de Tukey a um nível de 5% de significância para comparação múltipla dos resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALORIZAÇÃO DO RESÍDUO CERVEJEIRO ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE CELULASE, XILANASE E B-GLICOSIDASE POR FES E FS

As treze diferentes cepas do gênero *Trichoderma* analisadas, se mostraram capazes de produzir as três enzimas na FES (Tabela 2) e na FS (Tabela 3), sendo os maiores valores encontrados na FES para a celulase, β -glicosidase e xilanase de 6,151 U.mL⁻¹, 0,1824 mU.mL⁻¹ e 136,7 U.mL⁻¹, respectivamente. Numericamente, o maior produtor de celulase foi o *Trichoderma harzianum* (T8), e o maior produtor da β -glicosidase e xilanase foi o *Trichoderma citroviridae* (T10). Estatisticamente, a produção de xilanase e celulase pelo *Trichoderma harzianum* e pelo *Trichoderma citroviridae* não diferem entre si, ou seja, ambos são bons produtores tanto de celulase quanto de xilanase. O *Trichoderma harzianum* (T8) produz 6,151 U.mL⁻¹ de celulase e 108,8 U.mL⁻¹ de xilanase, e o *Trichoderma citroviridae* (T10) produz 5,467 U.mL⁻¹ de celulase 136,3 U.mL⁻¹ de xilanase. Os valores produzidos de β -glicosidase foram os mais baixos encontrados neste trabalho.

A produção enzimática por FS (tabela 3) apresentou valores inferiores de atividade celulósica para dez cepas (T1, T3, T4, T6, T7, T8, T10, T11, T12 e T13) quando comparada a fermentação em estado sólido. O *Trichoderma harzianum* (T8) maior produtor de celulase na FES (6,151 U.mL⁻¹) também foi um dos maiores produtores na FS (4,382 U.mL⁻¹), para a β -glicosidase e celulase o melhor produtor numericamente na FS foi o *Trichoderma yunnanense* (T9) (0,1110 mU.mL⁻¹ e 4,717 U.mL⁻¹) e para a xilanase o *Trichoderma citroviridae* (T10) (146,7 U.mL⁻¹) foi o maior produtor na FS assim como na FES. Com os dados obtidos, é possível observar que todas as diferentes espécies de *Trichoderma* obtiveram maior atividade da enzima xilanase (aproximadamente 27 vezes a mais), mostrando serem xilanolíticos quando fermentados em bagaço de malte tanto por FES quanto por FS. Outros autores também relatam o potencial xilanolítico de diferentes cepas de *Trichoderma*, como Long et al. (2017), utilizando como resíduo vegetal na FS, farelo de trigo e espigas de milho, por 4 dias à 30 °C, obteve atividade enzimática de 108 U.mL⁻¹.

Tabela 2: Atividade enzimática da Celulase, β -Glicosidase e Xilanase (média das triplicatas), para as 13 diferentes espécies de *Trichoderma* (Tabela 1), 5 dias de fermentação em bagaço de malte em estado sólido a 28 ± 2 °C.

Fermentação em Estado Sólido						
Código <i>Trichoderma</i>	Celulase		β -Glicosidase		Xilanase	
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Tukey	Atividade (mU.mL ⁻¹)	Tukey	Atividade (U.mL ⁻¹)	Tukey
T1	4,527	abcd	0,02192	def	28,45	c
T2	3,527	bcd	0,08391	bcd	69,98	abc
T3	4,545	abcd	0,04967	bcdef	64,29	bc
T4	2,475	d	0,03970	cdef	60,15	bc
T5	2,894	d	0,04339	cdef	36,89	bc
T6	5,937	ab	0,02875	cdef	84,68	abc
T7	4,160	abcd	0,08654	bc	103,3	ab
T8	6,151	<i>a</i>	0,07452	bcde	108,8	ab
T9	4,446	abcd	0,1098	b	45,95	bc
T10	5,467	abc	0,1824	<i>a</i>	136,7	<i>a</i>
T11	3,168	cd	0,01423	ef	41,21	bc
T12	3,153	cd	0,04550	f	29,05	c
T13	4,605	abcd	0,03319	cdef	103,7	ab

Para cada enzima, o maior valor numérico está destacado em negrito, e os valores com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, no teste de Tukey a um nível de 5% de significância, com coeficientes de variação de 25,64% para celulase, 41,65% para β -glicosidase e 31,61% para xilanase.

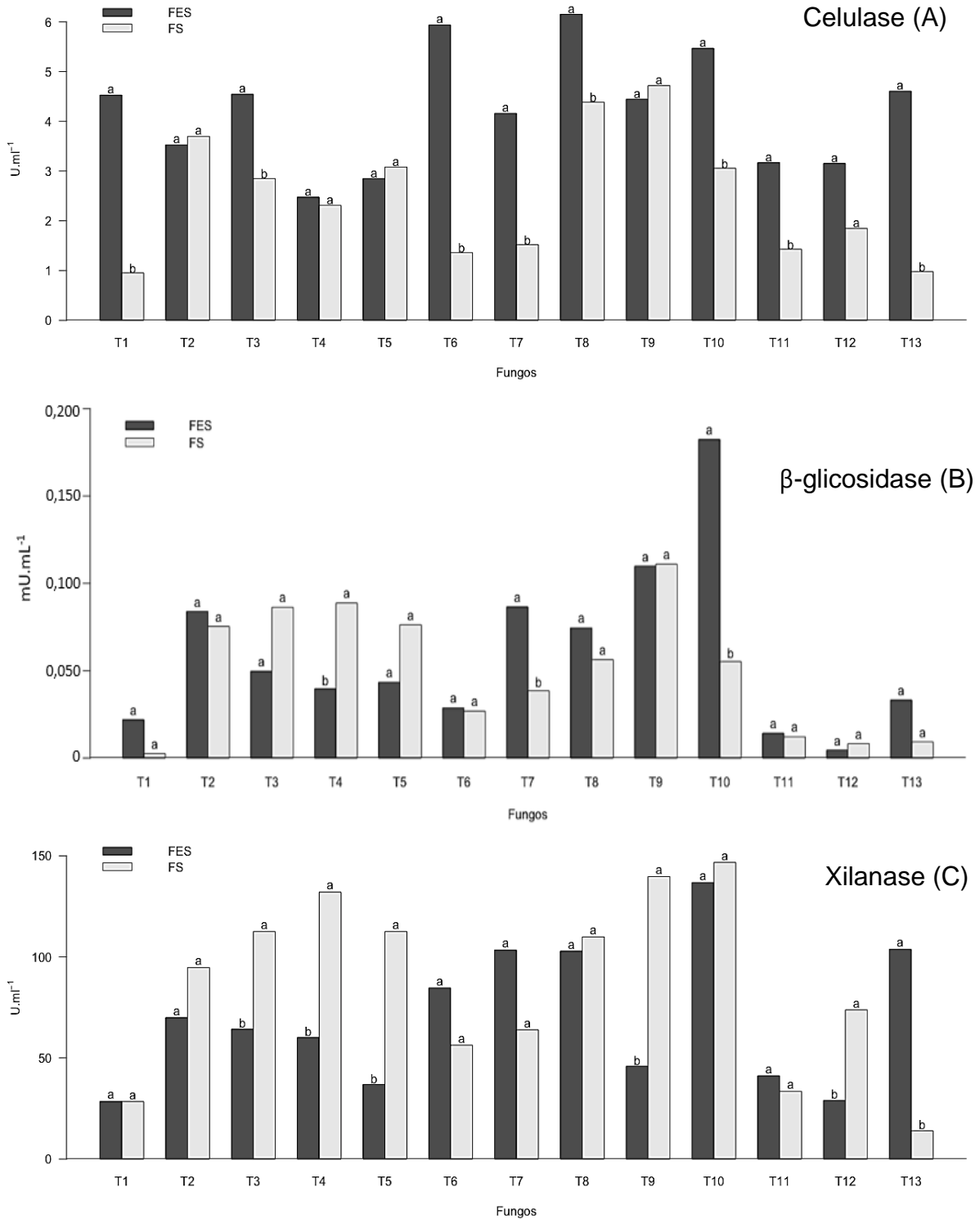
Tabela 3: Atividade enzimática da Celulase, β -Glicosidase e Xilanase (média das triplicatas), para as 13 diferentes cepas de *Trichoderma* (Tabela 1), 5 dias de fermentação submersa em bagaço de malte a 28 ± 2 °C e 180 rpm.

Fermentação Submersa						
Código <i>Trichoderma</i>	Celulase		β -Glicosidase		Xilanase	
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Tukey	Atividade (mU.mL ⁻¹)	Tukey	Atividade (U.mL ⁻¹)	Tukey
T1	0,9544	c	0,008227	d	28,44	ef
T2	3,696	ab	0,07529	abc	94,65	abcde
T3	2,849	abc	0,08632	ab	112,5	abcd
T4	2,313	abc	0,08878	ab	132,0	abc
T5	3,081	abc	0,07625	abc	112,5	abcd
T6	1,430	bc	0,02688	bcd	56,34	def
T7	1,520	bc	0,03847	bcd	63,92	cdef
T8	4,382	a	0,05634	abcd	109,8	abcde
T9	4,717	a	0,1110	a	139,7	abc
T10	3,057	abc	0,05526	abcd	146,7	a
T11	1,430	bc	0,01213	cd	33,44	ef
T12	2,313	bc	0,008227	d	73,78	bcdef
T13	0,9816	c	0,009256	d	13,98	f

Para cada enzima, o maior valor numérico está destacado em negrito, e os valores com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, no teste de Tukey a um nível de 5% de significância, com coeficientes de variação de 25,64% para celulase, 41,65% para β -glicosidase e 31,61% para xilanase.

Foram comparados por meio do Teste F (ANOVA), as médias para cada *Trichoderma* (Figura 1), afim de avaliar a produção individual das enzimas em cada método fermentativo.

Figura 1: Atividades enzimáticas de celulase (A) U.mL⁻¹, β-glicosidase (B) mU.mL⁻¹ e xilanase (C) U.mL⁻¹, para cada um dos fungos, comparando estatisticamente os métodos fermentativos em estado sólido e submerso.



Os valores com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância, com coeficientes de variação de 25,64% para celulase, 41,65% para β-glicosidase e 31,61% para xilanase.

A análise mostrou que a celulase (Figura 2 A), foi produzida pelas cepas *Trichoderma asperellum* (T2, T4 e T5), *Trichoderma citroviridae* (T10) e *Trichoderma harzianum* (T12) sem diferença significativa entre a FES e FS, ou seja, obteve-se a mesma atividade enzimática mesmo mudando as condições de fermentação de sólida para submersa. Já as cepas *Trichoderma harzianum* Rifai (T1), *Trichoderma Asperellum* (T3), *Trichoderma harzianum* (T6, T8, T11 e T13), *Trichoderma* spp. (T7), e *Trichoderma citroviridae* (T10) apresentaram melhores atividades para a celulase quando cultivadas por FES. Segundo Salomão (2017), os fungos filamentosos são bons produtores do complexo celulolítico extracelular, e a baixa quantidade de água livre diminui a competição, elevando assim os valores obtidos por FES.

A atividade enzimática da β -glicosidase de 10 espécies não diferiram quanto ao método fermentativo, apenas para o *Trichoderma asperellum* (T4), a fermentação submersa se mostrou melhor do que a fermentação em estado sólido, e para o *Trichoderma* sp. e o *Trichoderma citroviridae* a FES obteve melhores atividades do que FS.

Para a xilanase, os melhores produtores *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma citroviridae* (T8 e T10) não diferem estatisticamente quanto ao método fermentativo (FES e FS) nas condições experimentais, além destes, *Trichoderma harzianum* Rifai e o *Trichoderma harzianum* (T6) também não diferem estatisticamente na produção por FES e FS, ao contrário da celulase, para a xilanase 5 cepas apresentaram rendimentos maiores quando utilizada a FS em comparação com a FES como mostrado na figura 1 (C).

É possível observar com estes resultados, que a produção é influenciada mais pelo tipo de substrato e pelo tipo de microrganismo, do que pela quantidade de água livre no sistema. Utilizando palha de trigo como substrato e *Trichoderma viride*, Iqbal (2011) obteve atividade celulásica de 1148 U.mL⁻¹ via FES, valor superior ao encontrado neste trabalho para a enzima celulase. O estudo de Tai (2019), obteve atividade celulásica de 2,93 U.g⁻¹ e xilanásica de 5,23 U.g⁻¹ por FES em óleo de palma e como microrganismo produtor *Aspergillus niger* DWA8, mostrando assim como neste trabalho, uma maior produção de xilanase em comparação a celulase. Long et al. (2017), relatou atividade enzimática de 108 U.mL⁻¹ para a xilanase produzida por *Trichoderma orientalis* EU7-22, via FS a 30° C e 4 dias de fermentação, valor inferior ao valor máximo encontrado neste trabalho que foi de 146,7 U.mL⁻¹ via FS a 28 °C e 5 dias de fermentação utilizando *Trichoderma citroviridae*.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS HIDROLASES

Comparando os resultados obtidos, o *Trichoderma harzianum* (T8) e o *Trichoderma citroviridae* (T10) foram os melhores produtores das hidrolases analisadas, não diferindo entre si quanto a produção de xilanase, porém, o *Trichoderma harzianum*, produziu melhor celulase na FES do que o *Trichoderma citroviridae*, sendo então o escolhido para otimização da produção. Dentre os processos fermentativos, a FES se destacou na produção de celulase, e para a xilanase a FES e a FS produziram nas mesmas quantidades estatisticamente, sendo então a FES a escolhida para a otimização, já que apresenta vantagens como a baixa probabilidade de contaminação e a menor geração de efluentes residuais quando comparada a FS. Os parâmetros avaliados foram a quantidade de solução umedecedora [Umed] e temperatura [T °C], e a equação de regressão que demonstrou essa relação empiricamente, considerando a atividade enzimática real obtida estão descritas abaixo.

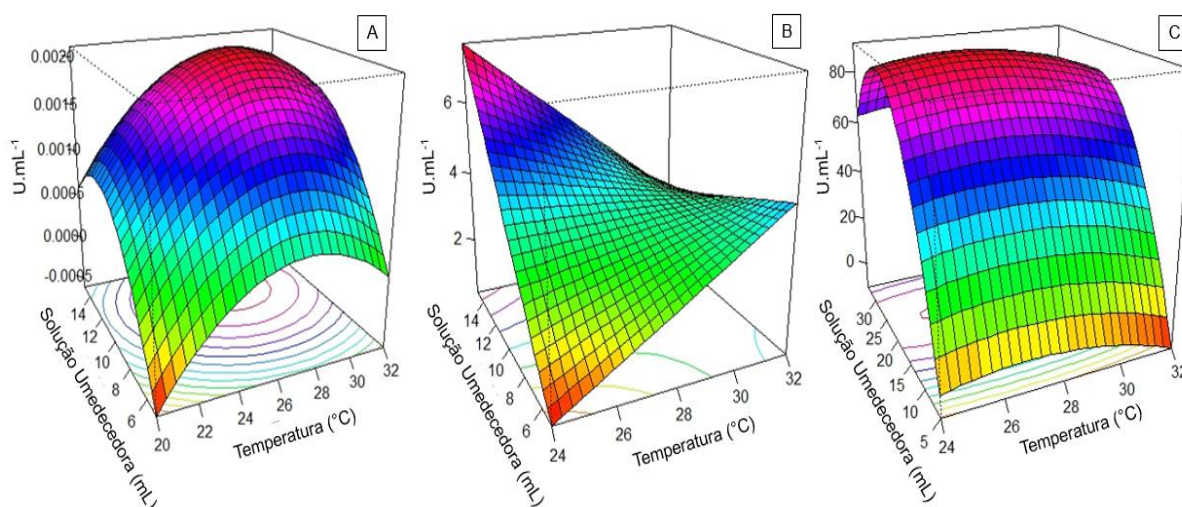
$$Y_{\text{celulase}} (\text{U.mL}^{-1}) = 3,69 - 0,27[T \text{ } ^\circ\text{C}] + 1,31[\text{Umed}] - 2,30 [T \text{ } ^\circ\text{C}].[Umed]$$

$$Y_{\text{xilanase}} (\text{U.mL}^{-1}) = 41,49 - 4,33 [T \text{ } ^\circ\text{C}] + 34,98[\text{Umed}] - 6,86[T \text{ } ^\circ\text{C}] - 6,25[\text{Umed}]^2$$

$$Y_{\beta\text{-glicosidase}} (\text{U.mL}^{-1}) = 19,94 \times 10^{-4} - 75,05 \times 10^{-6}[T \text{ } ^\circ\text{C}] + 5,9 \times 10^{-4}[\text{Umed}] - 32,74 \times 10^{-5} [T \text{ } ^\circ\text{C}]^2 - 8,5 \times 10^{-4}[\text{Umed}]^2$$

As equações foram utilizadas para elaboração dos gráficos de superfície de contorno (Figura 3), para a β -glicosidase (figura 3 A), o contorno obtido foi circular e o R^2 de 0,7844, para a celulase (figura 3 B), o contorno obtido foi no formato de sela e R^2 de 0,5884, e para a xilanase (figura 3 C), o contorno obtido foi no formato circular com e R^2 de 0,8076.

Figura 2: Superfícies de respostas e gráficos de contornos dos modelos selecionados com a produção de β -glicosidase (A), celulase (B) e xilanase (C).



$$R^2_A = 0,7844; R^2_B = 0,5884; R^2_C = 0,8076$$

A celulase e β -glicosidase apresentaram melhor produção no bagaço de malte com menor volume de solução umedecedora, enquanto a xilanase foi melhor produzida utilizando o dobro de solução umedecedora. Para as três enzimas, a temperatura também apresentou variação, a celulase e a β -glicosidase podem ser obtidas em maiores valores de atividade em temperaturas de fermentação de 28 ± 2 °C, e a xilanase não foi praticamente afetada pela temperatura nas condições testadas, como mostram os pontos máximos estacionários no quadro 1. A variável solução umedecedora, que disponibiliza a quantidade de água livre e nutrientes no sistema, foi o fator que mais influenciou o aumento da atividade da xilanase, a temperatura não causou efeitos significativos.

Tai et al. (2019), observou que variar a temperatura de 28 a 32 °C na produção de xilanase em FES, causa pouco efeito na produção enzimática, e que a atividade máxima foi alcançada em ambas as temperaturas. Já para a celulase e β -glicosidase ambos os fatores influenciaram a atividade de forma significativa, o que sugere que a temperatura ótima de produção dessas enzimas depende do tipo de microrganismo utilizado (TAI et al, 2019)

Quadro 1: Condições ótimas de T (°C) e volume (mL) de solução umedecedora para produção de hidrolases pelo *Trichoderma harzianum* (T8) propostas pelo modelo estatístico.

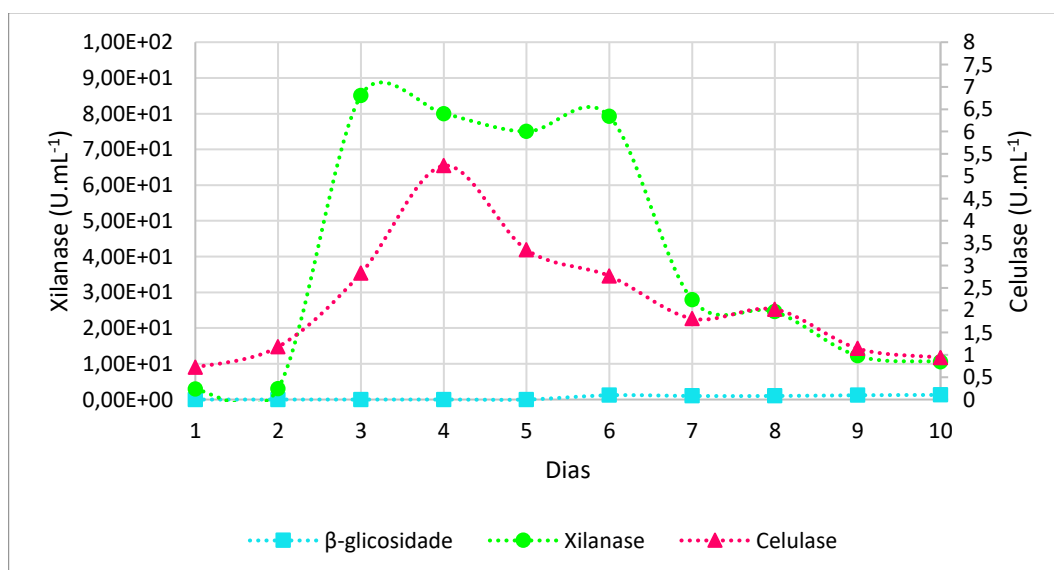
	<i>Celulase</i>	<i>β-Glicosidase</i>	<i>Xilanase</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	30,2	27,5	26,7
<i>Solução Umedecedora (mL)</i>	9,4	11,7	23,9

Após a otimização, foram comparados os valores obtidos de atividades das hidrolases produzidas por T8 nas condições não otimizadas (25°C e 10 mL solução umedecedora) e nas otimizadas (quadro 1), afim de avaliar se houve aumento na produção. Antes da otimização os valores de celulase, β-glicosidase e xilanase eram de 5,23 U.mL⁻¹, 0,002 U.mL⁻¹ e 85,07 U.mL⁻¹, após otimização os valores passaram a ser de 6,15 U.mL⁻¹, 0,074 U.mL⁻¹ e 108,8 U.mL⁻¹, respectivamente, um aumento de 14,9 % para celulase, 97% para a β-glicosidase e de 21,86% para a xilanase.

3.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO

O tempo de fermentação em estado sólido também foi analisado ao longo de 10 dias de fermentação, utilizando apenas as condições FES e o *Trichoderma harzianum* (T8), os resultados obtidos estão na Figura 3.

Figura 3: Produção de celulase, xilanase e β-glicosidase ao longo de 10 dias de fermentação em estado sólido, utilizando 3,5 g de bagaço de malte e 10 mL de solução umedecedora para todas as hidrolases.



Entre os dias 1 e 2, não são encontrados valores altos de atividade enzimática, entre os dias 2 e 3, observa-se um aumento na produção, atingindo o seu valor máximo no 3º dia para a xilanase e no 4º dia para a celulase, a partir do 6º dia de fermentação os valores diminuem e seguem diminuindo até o décimo dia, os valores encontrados de β -glicosidase foram muito baixos, mas observa-se um aumento na produção a partir do 6º dia de fermentação.

A xilanase, enzima mais produzida nessas condições, atinge produção máxima no terceiro dia de fermentação, e como mostrado na tabela 4, de 3 a 4 dias para produção máxima é um tempo inferior ao que é encontrado na maioria dos estudos.

Tabela 4: Condições de fermentação e enzimas produzidas bem como sua atividade enzimática, para diferentes microrganismos e resíduos lignocelulósicos.

Microrganismo	Resíduo	Fermentação	Enzima Produzida	Atividade Enzimática	Ref
<i>Aspergillus niger</i> (NRRL 330, NRRL 576 e NRRL 1956)	Grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)	Submersa, 30°C, 18 dias	Xilanase	30 – 35 U.mL ⁻¹	Demirci, 2020
<i>Aspergillus niger</i>	Borra de Café	Sólido, 30°C, 3 dias	Xilanase	6496 U.g ⁻¹	Jaiswal, 2019
<i>Aspergillus niger</i> DWA8	Óleo de Palma	Sólido, 30°C, 5 dias	Celulase Xilanase	2,93 U.g ⁻¹ 5,23 U.g ⁻¹	Tai, 2019
<i>Trichoderma orientalis</i> EU7-22	Espiga de Milho e Farelo de Trigo	Submersa, 30°C, pH 5,2, 4 dias	Xilanase	108 U.mL ⁻¹	Long et al, 2017
<i>Penicillium janczewskii</i>	Bagaço de Malte	Estado Sólido, 28°C, 7 dias	Xilanases, β -xilosidase,	3370 U.g ⁻¹ 225 U.g ⁻¹	Terrasan, 2015
<i>Trichoderma viride</i>-IR05	Bagaço de Cana pré tratado	Sólido, 30°C, 7 dias	Xilanase	72,4 U.g ⁻¹	Irfan, 2014
<i>Trichoderma reesei</i> SAF3	Farelo de Trigo	Sólido, 30°C, 4 dias	Xilanase	219 U.g ⁻¹	Kar, 2013
<i>Trichoderma viride</i>	Palha de Trigo	Estado Sólido, 55°C, pH 8, 7 dias	Celulase	1148 U.mL ⁻¹	Iqbal, 2011
<i>Aspergillus niger</i> IZ-9	Bagaço de cana	Submersa, 100 rpm, 30°C, 7 dias	Celulase e Xilanase	0,25 U.mL ⁻¹ 14 U.mL ⁻¹	Menezes, 2000

Além das condições experimentais afetarem a produção enzimática, existe também uma forte correlação entre a taxa de hidrólise enzimática e a adsorção enzimática, os materiais lignocelulósicos quando não são pré-tratados afim de aumentar a adsorção através da quebra das ligações entre os polímeros vegetais (celulose, hemicelulose e lignina), possuem uma taxa de hidrólise menor do que aqueles pré-tratados (SINDHU et al., 2015).

A dificuldade de acessibilidade da celulase à celulose, é diretamente afetada pela remoção da xilana e da lignina, quando são removidas ou quando o microrganismo é capaz de produzir em altas concentrações o complexo xilanolítico para a hidrólise da hemicelulose, ocorre um aumento na taxa de sacarificação da celulose (MENON; RAO, 2012), além de diminuir a inibição da celulase por xilo-oligômeros. A hidrólise no material lignocelulósico nativo é muito baixa, a menos que sejam utilizadas altas concentrações enzimáticas, isso por causa das características estruturais da parede vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) (SINDHU et al., 2015).

3.4 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DAS FIBRAS DIETÉTICAS POR *TRICHODERMA HARZIANUM* (T8) EM CONDIÇÕES DE FES OTIMIZADA

O bagaço de malte, possui em média 75 % de carboidratos, 13,6 % de proteínas, 4,44 % de lipídeos, 5,34 % de umidade e 2,78 % de cinzas (MALI, 2014). Os valores encontrados no resíduo fornecido pela cervejaria Spoller - Londrina, foram de 39,9 % de lignina, 22,1 % de hemicelulose e 9,4 % de celulose, valores próximos aos encontrados por Mali (2014), que foram de 26,13 % de lignina, 23,41 % de hemicelulose e 12,29 % de celulose. O lote utilizado de bagaço de malte, cedido pela cervejaria Spoller - Londrina, possuía após a produção de cerveja umidade de 66 %, após seco em estufa e resfriado para utilização nas análises a umidade intrínseca era de 7,36 %. Após fermentação, os valores observados de lignina, hemicelulose e celulose foram de 40,6 %, 13,9 % e 8,7 %, respectivamente.

Tabela 5: Média dos valores em % das quantidades de fibra lignocelulósica (lignina, hemicelulose e celulose) presentes no bagaço de malte, pré e pós fermentação em estado sólido nas condições otimizadas para a xilanase, 27°C e 24 mL de Vogel como solução umedecedora.

	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)
Pré-Fermentação	39,9 ^a	22,1 ^a	9,4 ^a
Pós-Fermentação	40,6 ^a	13,9 ^b	8,7 ^b

Apenas a celulose e hemicelulose apresentaram diferenças nas análises pré e pós fermentação do bagaço de malte. A diminuição da concentração de celulose foi de 7,5%, e de hemicelulose de 38 % após fermentação em estado sólido, demonstrando um alto consumo dessa fibra pelo *Trichoderma harzianum* (T8), a maior diminuição da fibra de hemicelulose pode ser atribuída a maior atividade de xilanase, e, portanto, maior consumo e liberação dos monômeros de xilose.

Quando ocorre o consumo da hemicelulose, a celulose fica mais exposta, facilitando a adsorção enzimática do complexo celulolítico, segundo Menon (2012), a retirada da hemicelulose diminui também a inibição enzimática do complexo celulolítico, o que aumenta a sacarificação.

As cepas do gênero *Trichoderma* se mostraram xilanolíticas quando fermentadas em bagaço de malte, com valores de atividade enzimática vinte vezes maiores do que a atividade celulolítica máxima encontrada, sendo uma via para o pré-tratamento da biomassa nativa, aumentando sua biodisponibilidade e contornando os pré-tratamentos usuais (base, ácido e oxidação).

4. CONCLUSÃO

O bagaço de malte utilizado neste estudo apresentou composição de 39,9 % de lignina, 22,1 % de hemicelulose e 9,4 % de celulose e foi capaz de induzir a produção de hidrolases por *Trichoderma* em cultivos de FES e FS.

O *Trichoderma harzianum* e o *Trichoderma citroviridae* (T8 e T10), foram os melhores produtores de hidrolases concomitantemente por FES com produção de 6,15 U.mL⁻¹ e 5,46 U.mL⁻¹ de celulase, e 108,87 U.mL⁻¹ e 136,77 U.mL⁻¹ de xilanase, respectivamente.

O uso de delineamento estatístico e seus modelos para o cultivo de *Trichoderma harzianum* elevaram a produção de hidrolases em 14,9 % para a celulase, 97 % para a β -glicosidase e 21,86 % para a xilanase em relação as condições iniciais de cultivo.

A temperatura ótima de produção para a xilanase foi de 26,7 °C, para a celulase de 30,2 °C e para a β -glicosidase de 27,5. A quantidade em mL de solução umedecedora que melhor proporcionou a produção das enzimas foi de 23,9 mL para a xilanase, 9,4 mL para a celulase e 11,7 mL para a β -glicosidase, em erlenmeyers de 125 mL e 3,5 g de bagaço de malte. O tempo de produção também foi avaliado, sendo o 3° dia o máximo de produção de xilanase, o 4° dia de celulase e o 6° dia de β -glicosidase.

O cultivo de *Trichoderma harzianum* em bagaço de malte, resultou na degradação de 38% de hemicelulose e de 7,5% de celulose, mostrando que o *Trichoderma harzianum* é xilanolítico quando cultivado em bagaço de malte nas condições testadas.

Microrganismos que são produtores do complexo xilanolítico como as cepas do gênero *Trichoderma*, podem ser utilizados como um pré-tratamento substituto ao pré-tratamento químico dos materiais lignocelulósicos, permitindo o aumento da taxa de hidrólise por facilitar a adsorção enzimática nas fibras de celulose.

5. REFERÊNCIAS

1. Aguiar, C. L. & Menezes, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment.* (2000) doi:10.5380/cep.v18i1.1125.
2. Albuquerque, D. M. N. *et al.* Resíduo desidratado de cervejaria para suínos em terminação. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* (2011) doi:10.1590/S0102-09352011000200026.
3. Castellani, A. The watere cultivation of pathogenic. *Ann. des sociétés belges médecine Trop.* (1964).
4. Couto, S. R. & Sanromán, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J. Food Eng.* (2006) doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
5. De Castro, A. M. & Pereira, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* (2010) doi:10.1590/s0100-40422010000100031.
6. Gouveia, E. R., Nascimento, R. T. do, Souto-Maior, A. M. & Rocha, G. J. de M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova* (2009) doi:10.1590/s0100-40422009000600026.
7. Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, M. A. & Irfan, M. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Adv. Biosci. Biotechnol.* (2011) doi:10.4236/abb.2011.23024.
8. Iram, A., Cekmecelioglu, D. & Demirci, A. Screening of bacterial and fungal strains for cellulase and xylanase production using distillers' dried grains with solubles (DDGS) as the main feedstock. *Biomass Convers. Biorefinery* (2020) doi:10.1007/s13399-019-00588-x.
9. Irfan, M., Nadeem, M. & Syed, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* -IR05 in solid-state fermentation . *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* (2014) doi:10.1016/j.jrras.2014.04.004.

10. Irshad, M., Anwar, Z. & Afroz, A. Characterization of Exo 1, 4-glucanase produced from *Trichoderma Viridi*; MBL through solid-state bio-processing of orange peel waste. *Adv. Biosci. Biotechnol.* (2012) doi:10.4236/abb.2012.35075.
11. Juchen, P. T. *et al.* Biosorption of reactive blue BF-5G dye by malt bagasse: Kinetic and equilibrium studies. *J. Environ. Chem. Eng.* (2018) doi:10.1016/j.jece.2018.11.009.
12. Kanauchi, O., Mitsuyama, K. & Araki, Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* (2001) doi:10.1094/asbcj-59-0059.
13. Kar, S. *et al.* Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2013) doi:10.1007/s00449-012-0761-x.
14. Long, C., Liu, J., Gan, L., Zeng, B. & Long, M. Optimization of Xylanase Production by *Trichoderma orientalis* Using Corn Cobs and Wheat Bran via Statistical Strategy. *Waste and Biomass Valorization* (2019) doi:10.1007/s12649-017-0149-x.
15. Mello, L. R. P. F. & Mali, S. Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. *Ind. Crops Prod.* **55**, 187–193 (2014).
16. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* (1959) doi:10.1021/ac60147a030.
17. Periyasamy, K. *et al.* Production, Partial Purification and Characterization of Enzyme Cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 Through Solid-State Fermentation. *Arab. J. Sci. Eng.* (2017) doi:10.1007/s13369-016-2110-x.
18. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

19. Ravindran, R., Williams, G. A. & Jaiswal, A. K. Spent coffee waste as a potential media component for xylanase production and potential application in juice enrichment. *Foods* (2019) doi:10.3390/foods8110585.
20. Reis, H. C. O. *et al.* Malt Bagasse Waste as Biosorbent for Malachite Green: An Ecofriendly Approach for Dye Removal from Aqueous Solution. *Int. J. Biol. Life Agric. Sci.* (2018) doi:10.5281/zenodo.1340591.
21. Rezende, M. I., Barbosa, A. D. M., Vasconcelos, A. F. D. & Endo, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian J. Microbiol.* (2002) doi:10.1590/S1517-83822002000100014.
22. Rigo, M., Bezerra, J. R. M. V., Rodrigues, D. D. & Teixeira, Â. M. Physical-chemical and sensory characterization of cookies added with brewer`s spent grain flour as fiber supply. *Ambiência* (2017) doi:10.5935/ambiencia.2017.01.03.
23. Salomão, G. Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato (2017). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Espírito Santo.
23. Sindhu, R., Binod, P. & Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology* (2016) doi:10.1016/j.biortech.2015.08.030.
24. Tai, W. Y., Tan, J. S., Lim, V. & Lee, C. K. Comprehensive studies on optimization of cellulase and xylanase production by a local indigenous fungus strain via solid state fermentation using oil palm frond as substrate. *Biotechnol. Prog.* (2019) doi:10.1002/btpr.2781.
25. Terrasan, C. R. F. & Carmona, E. C. Solid-state fermentation of brewer`s spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. *Biosci. J.* (2015) doi:10.14393/bj-v31n6a2015-30044.

