

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELY KARINE KLEIN

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO BAGAÇO DE MALTE COMO SUBSTRATO
PARA SÍNTESE DE ENZIMAS FÚNGICAS

PALOTINA

2025

MICHELY KARINE KLEIN

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO BAGAÇO DE MALTE COMO SUBSTRATO
PARA SÍNTESE DE ENZIMAS FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel Ströher

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eliane Hermes

Coorientador: Prof^a. Dr. Dile Pontarolo Stremel

PALOTINA

2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

K64 Klein, Michely Karine
Potencial biotecnológico do bagaço de malte como substrato
para síntese de enzimas fúngicas / Michely Karine Klein.
– Palotina, PR, 2025.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Prof^a. Dra Raquel Ströher.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Eliane Hermes.
Coorientador: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel.

1. Amilases. 2. Celulases. 3. Fermentação em estado sólido.
I. Ströher, Raquel. II. Hermes, Eliane. III. Stremel,
Dile Pontarolo. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDU 60

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MICHELY KARINE KLEIN**, intitulada: **Potencial biotecnológico do bagaço de malte como substrato para a síntese de enzimas fúngicas**, sob orientação da Profa. Dra. RAQUEL STROHER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 25 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

28/02/2025 13:28:10.0

RAQUEL STROHER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/02/2025 15:32:30.0

TANIA SILA CAMPIONI MAGON

Avaliador Externo

Assinatura Eletrônica

10/03/2025 18:39:32.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho a minha família,
pelo amor, incentivo e exemplo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pela oportunidade, pela sabedoria e determinação, essenciais para alcançar essa conquista.

Aos meus pais, Teresa Reckzieguel Klein e Jacinto Zeferino Klein, e à minha irmã Nicolý Karoline Klein, que sempre estiveram ao meu lado e cujo amor e dedicação incondicional, tornaram possível a realização deste sonho.

Ao meu namorado e colega, Gabriel Luca de Lima, pelo apoio, carinho e empenho que sempre demonstrou.

Aos colegas e amigos, pela parceria, auxílio e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Raquel Ströher, por todo o incentivo e pelos aconselhamentos valiosos que me permitiram crescer tanto acadêmica quanto pessoalmente.

À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Eliane Hermes, pelas contribuições enriquecedoras e pelo apoio antes mesmo de iniciar a coorientação.

Ao Professor Dile Pontarolo Stremel pelas orientações e apoio na realização da análise estatística.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Adriana Fiorini Rosado e Profa. Dra. Tania Sila Campioni Magon, por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

Agradeço também à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, aos técnicos e demais servidores, pelo ambiente acolhedor e pelos recursos necessários para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À Gabrieli Maria Huff, a Núbia Goehlen e a Mariana Nascimento Martins pelo apoio nas atividades laboratoriais.

Ao Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), por disponibilizar os microrganismos que foram fundamentais para este estudo.

À empresa que forneceu o bagaço de malte essencial para a realização dos experimentos.

E, por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade. Muito obrigada de coração.

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso."

John Ruskin

RESUMO

O bagaço de malte é um subproduto lignocelulósico gerado em grandes volumes no processo de fabricação da cerveja. Suas características incluem altos teores de proteínas e carboidratos, demonstrando potencial aproveitamento como substrato na obtenção de produtos de maior valor agregado, dos quais as enzimas se destacam. Dentre as mais utilizadas a nível industrial estão as hidrolases, especialmente amilases e celulasas, que são amplamente empregadas no setor de alimentos e bebidas, bem como para produção de biocombustíveis. Essas enzimas podem ser obtidas por processos fermentativos, conduzidos na presença de fungos filamentosos, de modo que, sua obtenção utilizando resíduos agroindustriais, surge como uma alternativa biotecnológica promissora, considerando aspectos econômicos e ganhos ambientais. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente o subproduto proveniente de uma indústria cervejeira do oeste do Paraná e avaliar a produção de enzimas amilolíticas e celulolíticas e a cinética de produção envolvida a partir da fermentação em estado sólido do bagaço de malte, utilizando cepas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperellum*. Um planejamento experimental do tipo fatorial 2³ completo com quadruplicatas no ponto central foi realizado para o estudo dos efeitos de granulometria (10 mesh e 14 mesh), temperatura (28 °C e 32 °C) e teor de umidade (60% e 80%). Os erlenmeyers foram inoculados separadamente, incubados por 7 dias e as amostras foram retiradas para quantificação da atividade de amilases, CMCases e FPases. Os principais resultados obtidos para a atividade de amilases foram verificados nos ensaios 6 ($87,01 \pm 2,06 \text{ U.mL}^{-1}$) e 3 ($77,33 \pm 4,82 \text{ U.mL}^{-1}$), conduzidos com 80% de umidade, 10 mesh de granulometria e 28 °C, e 60% de umidade, 10 mesh e 32 °C, respectivamente, inoculados com *A. niger*. Para CMCases as maiores produções foram verificadas nas repetições do ponto central (70% umidade, 12 mesh, 30 °C) também para os tratamentos inoculados com *A. niger*, cujos valores variaram entre $23,10 \pm 0,34 \text{ U.mL}^{-1}$ e $26,72 \pm 0,45 \text{ U.mL}^{-1}$. Enquanto para FPases os maiores valores obtidos foram observados nos ensaios inoculados com *T. asperellum* variando entre $24,92 \pm 1,87 \text{ U.mL}^{-1}$ e $35,46 \pm 1,77 \text{ U.mL}^{-1}$, também para os tratamentos do ponto central. Adicionalmente, os dados foram tratados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e regressão linear múltipla, sendo possível encontrar equações dos modelos que representam a maior parte dos dados obtidos nos intervalos considerados no estudo, bem como avaliar presença de curvatura e falta de ajuste inerentes aos dados experimentais. Desse modo, o estudo possibilitou o conhecimento das principais características do bagaço de malte, e a avaliação das atividades de amilases, CMCases e FPases, demonstrando que as características do substrato, as condições cultivo, especialmente temperatura, umidade e granulometria, bem como os microrganismos empregados, são fatores essenciais no processo.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido; amilases; celulasas; *Trichoderma asperellum*; *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Brewer's spent grain is a lignocellulosic byproduct generated in large volumes during the beer manufacturing process. Its characteristics include high levels of proteins and carbohydrates, demonstrating potential use as a substrate for obtaining value-added products, among which enzymes stand out. Among the most used at the industrial level are hydrolases, especially amylases and cellulases, which are widely employed in the food and beverage sector, as well as for biofuel production. These enzymes can be obtained by fermentative processes, conducted in the presence of filamentous fungi, so that their production using agro-industrial residues emerges as a promising biotechnological alternative, considering economic aspects and environmental gains. In this sense, the study aimed to chemically characterize the byproduct from a brewing industry in western Paraná and evaluate the production of amylolytic and cellulolytic enzymes and the production kinetics involved from the solid-state fermentation of brewer's spent grain, using *Aspergillus niger* and *Trichoderma asperellum* strains. A full 2^3 factorial experimental design with four replicates at the central point was carried out to study the effects of particle size (10 mesh and 14 mesh), temperature (28 °C and 32 °C), and moisture content (60% and 80%). The Erlenmeyer flasks were inoculated separately, incubated for 7 days, and samples were taken for quantification of amylase, CMCase, and FPase activity. The main results obtained for amylase activity were verified in assays 6 ($87.01 \pm 2.06 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 3 ($77.33 \pm 4.82 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), conducted with 80% moisture, 10 mesh particle size and 28 °C, and 60% moisture, 10 mesh and 32 °C, respectively, inoculated with *A. niger*. For CMCases, the highest productions were verified in the central point repetitions (70% moisture, 12 mesh, 30 °C), also for the treatments inoculated with *A. niger*, whose values ranged from $23.10 \pm 0.34 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $26.72 \pm 0.45 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. While for FPases, the highest values obtained were observed in the assays inoculated with *T. asperellum*, ranging from $24.92 \pm 1.87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $35.46 \pm 1.77 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, also for the central point treatments. Additionally, the data were statistically processed through analysis of variance (ANOVA) and multiple linear regression, making it possible to find model equations that represent most of the data obtained within the intervals considered in the study, as well as to evaluate the presence of curvature and lack of fit inherent to the experimental data. In this way, the study enabled the understanding of the main characteristics of brewer's spent grain and the evaluation of amylase, CMCase, and FPase activities, demonstrating that the substrate characteristics, cultivation conditions, especially temperature, moisture, and particle size, as well as the microorganisms employed, are essential factors in the process.

Keywords: solid-state fermentation; amylases; cellulases; *Trichoderma asperellum*; *Aspergillus niger*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CELULÓSICA DO BAGAÇO DE MALTE.....	26
TABELA 2 - METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.....	44
TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	48
TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ³ COM QUADRUPLICATA DO PONTO CENTRAL PARA OS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	48
TABELA 5 - PARÂMETROS PARA ENSAIOS DE CINÉTICA.....	49
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.....	54
TABELA 7 - SÍNTESE DE AMILASES E CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADA COM <i>A. niger</i> EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ³ COM QUADRUPLICATAS DO PONTO CENTRAL.....	56
TABELA 8 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	58
TABELA 9 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	64
TABELA 10 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	65
TABELA 11 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	71
TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES DETERMINADOS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ³	72
TABELA 13 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E	

SUAS INTERAÇÕES.....	74
TABELA 14 - SÍNTESE DE AMILASES E CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADA COM <i>T. asperellum</i>	78
TABELA 15 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES DETERMINADOS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ³	80
TABELA 16 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	83
TABELA 17 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	84
TABELA 18 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	89
TABELA 19 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	90
TABELA 20 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	94
TABELA 21 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO.....	97
TABELA 22 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À PRODUÇÃO DE CMCases POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO.....	99
TABELA 23 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À PRODUÇÃO DE FPases POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO.....	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	23
FIGURA 2 - CRESCIMENTO DO <i>A. niger</i> EM MEIO DE CULTURA BDA, VISUALIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA.....	34
FIGURA 3 - COLÔNIAS DE <i>Trichoderma sp.</i> EM MEIO DE CULTURA E CONDIÓFORO COM FIÁLIDES PENICILADAS E CONÍDIOS DE <i>T. virens</i>	35
FIGURA 4 - <i>Trichoderma</i> EM SUAS FASES DE CRESCIMENTO: A) HIFA, B) CONIDIÓFORO JOVEM, C) FIÁLIDES MUCRONADAS D) ESPOROS IMATUROS, E) ESPOROS MADUROS.....	36
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	38
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	40
FIGURA 7 - CULTIVO EM PLACA DE PETRI DO FUNGO <i>A. niger</i> EM MEIO BDA.	44
FIGURA 8 - CULTIVO EM PLACA DE PETRI DO FUNGO <i>T. asperellum</i> EM MEIO BDA.....	45
FIGURA 9 - FRAÇÕES GRANULOMÉTRICAS DO BAGAÇO DE MALTE.....	46
FIGURA 10 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	60
FIGURA 11 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	61
FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	62
FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE AMILASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	

CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	63
FIGURA 14 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	67
FIGURA 15 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	68
FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	69
FIGURA 17 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE CMCases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	70
FIGURA 18 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE FPases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i>	73
FIGURA 19 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE FPases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>A. niger</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	74
FIGURA 20 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE INOCULADA COM <i>A. niger</i>	76
FIGURA 21 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA UMIDADE E GRANULOMETRIA, COM TEMPERATURA A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	81
FIGURA 22 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE A AMILASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	82

FIGURA 23 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA UMIDADE E GRANULOMETRIA, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	85
FIGURA 24 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA UMIDADE E TEMPERATURA, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	86
FIGURA 25 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E TEMPERATURA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	87
FIGURA 26 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE A CMCases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	88
FIGURA 27 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE FPases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A)10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	91
FIGURA 28- SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE FPases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i>	92
FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE FPases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM <i>T. asperellum</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	93
FIGURA 30 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE INOCULADA COM <i>T. asperellum</i>	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.2 OBJETIVOS GERAIS.....	18
1.2.1 Objetivos específicos.....	18
1.3 JUSTIFICATIVA.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 CADEIA CERVEJEIRA.....	21
2.1.1 Etapas envolvidas na fabricação de cerveja.....	23
2.1.2 Bagaço de Malte.....	26
2.1.2.1 Aplicações do Bagaço de Malte.....	27
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	27
2.2.1 Granulometria.....	28
2.2.2 Umidade.....	29
2.2.3 Temperatura.....	29
2.2.4 pH.....	30
2.2.5 Concentração do inóculo.....	30
2.3.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	32
2.3.2 Gênero <i>Trichoderma</i>	34
2.4 ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	37
2.4.1 Amilases.....	37
2.4.2 Celulases.....	39
2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR FUNGOS FILAMENTOSOS PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	43
3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO BAGAÇO DE MALTE.....	43
3.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>A. niger</i> E <i>T. asperellum</i>	43
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE.....	43

3.5 PREPARO DO INÓCULO.....	44
3.6 PREPARO DO SUBSTRATO.....	46
3.7 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	47
3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.9 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	48
3.10 EXTRAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO.....	49
3.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	49
3.11.1 Determinação da atividade da amilases.....	49
3.11.2 Determinação da atividade de celulasas.....	50
3.11.2.1 CMCases.....	51
3.11.2.2 FPases.....	51
3.12 AVALIAÇÃO DOS DADOS ESTATÍSTICOS.....	52
4 DISCUSSÕES E RESULTADOS.....	54
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.....	54
4.2 OBTENÇÃO DE AMILASES E CELULASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR <i>A. niger</i>	56
4.2.1 Avaliação estatística da produção enzimática utilizando <i>A. niger</i>	58
4.2.1.1 Síntese de amilases por <i>A. niger</i>	58
4.2.1.2 Síntese de CMCases por <i>A. niger</i>	65
4.2.1.3 Síntese de FPases por <i>A. niger</i>	71
4.2.2 Cinética da produção em estado sólido das enzimas amilases e celulasas por <i>A. niger</i>	75
4.3 OBTENÇÃO DE AMILASES E CELULASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR <i>T. asperellum</i>	78
4.3.1 Avaliação estatística da produção enzimática utilizando <i>T. asperellum</i>	80
4.3.1.1 Síntese de amilases por <i>T. asperellum</i>	80
4.3.1.2 Síntese de CMCases por <i>T. asperellum</i>	83
4.3.1.3 Síntese de FPases por <i>T. asperellum</i>	90
4.3.2 Cinética da produção em estado sólido das enzimas amilases e celulasas por <i>T. asperellum</i>	95

4.4 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS POR <i>A. niger</i> E <i>T. asperellum</i>	96
5 CONCLUSÃO.....	103
5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE 1 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE.....	116
APÊNDICE 2 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³.....	121
APÊNDICE 3 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³ COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL.....	123

1 INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira no Brasil cresce a cada ano, sobressaindo-se de forma relevante dentre os maiores produtores de cerveja global, ultrapassando, em 2023, a marca de 15,3 bilhões de litros produzidos (Marcusso; Oliveira, 2024; Marcusso; Muller, 2020). Segundo Maciel (2023), o setor representa 2% de todo o PIB nacional, gerando mais de 2,5 milhões de empregos diretos e indiretos. Ainda, de acordo com dados do IBGE (2024), apesar de pouco expressivo, o cultivo e malteação da cevada no país atinge cerca de 375 mil toneladas anualmente, e, juntamente com a produção de lúpulo, vem ganhando espaço nesses índices.

O processo de fabricação da cerveja envolve várias etapas que vão desde o preparo do mosto, fermentação, maturação, filtração, envase, até a pasteurização da bebida. Para o preparo do mosto é realizada a moagem do malte de cevada, seguido pela fervura da água, malte e adjuntos. Posteriormente, o mosto é filtrado para separação da fase sólida, resultando em um caldo açucarado e a torta de filtro ou bagaço de malte (Aquarone *et al.*, 2001).

O bagaço de malte é um dos principais subprodutos da indústria cervejeira, representando cerca de 85% de todo resíduo gerado no setor (Reinold, 1997). De acordo com Kunze (2014), estima-se que para cada 100 litros de cerveja produzidos sejam gerados em torno de 20 kg de bagaço de malte, o que, considerando a produção de 2023, equivale a cerca de 3 milhões de toneladas gerados por ano no Brasil. Trata-se de um composto rico em proteínas e carboidratos, com potencial aproveitamento na suplementação alimentar de animais. Além disso, estudos demonstram aplicações na produção de energia por queima direta e através da produção de biogás via fermentação anaeróbia, bem como na produção de carvão vegetal (Mathias; Mello; Servulo, 2014; Reinold, 1997).

Devido às suas características, o bagaço de malte tem sido investigado como fonte de nutrientes e como suporte para processos de cultivo em estado sólido, favorecendo o crescimento de microrganismos produtores de enzimas (Aleixo-Júnior, 2018). A utilização desse meio de cultivo surge como uma alternativa sustentável para o reaproveitamento do bagaço de malte, que, em condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento de fungos filamentosos, viabiliza a produção de enzimas de interesse industrial, gerando produtos com maior valor agregado (Araújo, 2018; Silva *et al.*, 2024).

Nesses processos biotecnológicos, os fungos filamentosos são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos e enzimas, incluindo as hidrolases, como amilases e celulases. O principal interesse na utilização desses microrganismos em larga escala consiste no fato deles secretarem as enzimas para o meio extracelular, sendo portanto, de fácil obtenção (Andrade *et al.*, 2022; Kerber, 2020).

As amilases catalisam reações de hidrólise, especificamente de moléculas de amido, gerando maltose, dextrina e glicose (Coelho *et al.*, 2018). Tal fato faz com que sejam bastante utilizadas, nas indústrias de bebidas e alimentos, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, indústria de detergentes, entre outras (Benassi; Almeida, 2018).

As enzimas celulolíticas catalisam a bioconversão de celulose em açúcares solúveis e glicose. São enzimas compostas por endoglucanases, exoglucanases e α -glicosidases encontradas separadamente ou na forma de complexos. A eficiência e especificidade destas enzimas tornam-as ferramentas valiosas em processos industriais relacionados à degradação da celulose e à produção de biocombustíveis. Além disso, têm aplicações na indústria de alimentos, papel e bioenergia, contribuindo para a produção de diversos produtos e processos sustentáveis (Bhat; Bhat, 1997; Dias, 2024).

1.1 OBJETIVOS

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a produção de enzimas amilases e celulases através da fermentação em estado sólido do bagaço de malte proveniente da indústria cervejeira, inoculado com cepas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperellum*, separadamente.

1.2.1 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização do bagaço de malte quanto à sua composição química;
- Avaliar a influência dos parâmetros umidade, granulometria e temperatura no processo de fermentação em estado sólido do bagaço de malte através de um planejamento experimental fatorial 2^3 completo com quadruplicatas no ponto

central;

- Avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos *A. niger* e *T. asperellum* e quantificar a produção de amilases e celulasas;
- Avaliar a cinética de síntese de amilases e celulasas produzidas durante a fermentação em estado sólido do bagaço de malte com *A. niger* e *T. asperellum*.

1.3 JUSTIFICATIVA

O crescimento exponencial da indústria cervejeira no Brasil, consolidando o país como um dos maiores produtores globais, apresenta impacto substancial na geração de bagaço de malte (Maciel, 2023; Reinold, 1997). Paralelamente, a utilização desse subproduto de cervejaria na alimentação de bovinos tem crescido nos últimos anos. No entanto, apesar de uma excelente alternativa na manutenção ou aumento da produtividade na bovinocultura, o uso incorreto ou sem os devidos cuidados, bem como o armazenamento de forma inadequada desse subproduto, podem ser responsáveis por quadros de intoxicação por etanol, neurotoxicose por *Aspergillus clavatus*, acidose ruminal e botulismo nos rebanhos, ocasionando sérios prejuízos econômicos à pecuária (Brust *et al.*, 2015).

Além disso, o descarte inadequado do bagaço de malte pode gerar significativos impactos ambientais, especialmente em função da sua rica composição em matéria orgânica, o que dificulta sua disposição final de forma sustentável. Nesse sentido, apesar de boa parte do bagaço gerado ser destinada à formulação de ração animal ou à adubação em campos agrícolas, muitas cervejarias ainda deixam de reaproveitar esse material de maneira eficiente. Isso intensifica problemas como o acúmulo de resíduos, emissão de gases de efeito estufa provenientes da decomposição, contaminação ambiental e desperdício de um recurso com alto potencial de reutilização (Pereira; Mathias, 2019).

A ausência de práticas adequadas para o manejo do bagaço de malte representa não apenas um desperdício econômico, mas também uma ameaça ambiental, especialmente em regiões onde a produção cervejeira é intensa. No entanto, estudos demonstram que este resíduo pode ser transformado em um recurso valioso por meio de bioprocessos. O bagaço de malte, além de ser um material de baixo custo, possui elevado valor nutricional, tornando-se uma base ideal para a

obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (Aleixo-Júnior, 2018; Pereira; Mathias, 2019).

Sua aplicação em biotecnologia, como na fermentação em estado sólido, possibilita a produção de enzimas como amilases e celulases, que possuem ampla aplicação nos setores de alimentos, bebidas, bioenergia, têxtil e papel e celulose (Andrade *et al.*, 2022; Benassi; Almeida, 2018; Dias, 2024).

Desse modo, a fermentação em estado sólido, utilizando microrganismos como *A. niger* e *T. asperellum*, emerge como uma alternativa sustentável para o aproveitamento deste resíduo, alinhada às necessidades industriais e aos objetivos do desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), através da Food Agriculture Organization (FAO). O processo não apenas reduz o impacto ambiental dos resíduos, mas também favorece a geração de produtos com maior valor comercial, como as enzimas, contribuindo para a economia circular (Araújo, 2018; Silva *et al.*, 2024).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CADEIA CERVEJEIRA

A fabricação de cervejas se caracteriza como um dos mais antigos processos de produção de bebidas da humanidade. Os primeiros relatos remontam entre 6 mil a 8 mil anos, por civilizações antigas que habitavam a região da Mesopotâmia. Atualmente, a indústria cervejeira representa posição de destaque na economia, figurando como a terceira em volume de consumo de bebidas no mundo (Lourenço, 2022).

De acordo com Meier (2024) no ano de 2023, a produção mundial de cerveja enfrentou um declínio de 1%, em comparação com o ano anterior, alcançando a marca de 1,88 bilhões de hectolitros produzidos. Na União Europeia, a produção caiu 2,5%, com reduções significativas no Reino Unido, Alemanha e Polônia. A produção na América do Norte caiu 2,7%, enquanto a América do Sul viu um aumento modesto de 1,0%. No Brasil a produção aumentou 1,5 bilhões de litros com relação ao ano anterior.

A indústria cervejeira no Brasil cresce continuamente, colocando o país em terceiro lugar no *ranking* dos maiores produtores mundiais. De acordo com Marcusso e Oliveira (2024) a produção nacional ultrapassou 15,3 bilhões de litros em 2023, ficando atrás apenas da China com 35,9 bilhões de litros e Estados Unidos com 19,3 bilhões de litros produzidos (Meier, 2024).

Com relação a produção nacional, a região Sudeste possui o maior volume declarado, atingindo cerca de 8,2 bilhões de litros de cerveja, representando 53,4% do total produzido, seguido das regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste com volumes menos expressivos. A região Norte é a única que não ultrapassa a marca de 1 bilhão de litros de cerveja produzidos, possuindo o menor volume de produção declarado, com 2,4 milhões de litros produzidos, o que corresponde a apenas 1,5% da produção brasileira. Além disso, o número de estabelecimentos registrados no Brasil em 2023 apresentou um crescimento de 6,8%, com aumento de 118 cervejarias em relação ao ano de 2022 (Marcusso; Oliveira, 2024).

O setor de cerveja no Brasil é historicamente relevante para a economia nacional, e a geração de empregos é um fator primordial nesse cenário. O segmento representa 2% do PIB nacional e gera mais de 2,5 milhões de empregos diretos e

indiretos. No ano de 2023, o setor atingiu a marca de 41.346 empregos diretos, apesar da queda de 1,9% quando comparado com o ano anterior (Maciel, 2023; Marcusso; Oliveira, 2024).

Embora o cultivo e a malteação da cevada no Brasil sejam pouco expressivos, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2023 a quantidade de cevada produzida no país foi de 375.423 toneladas, sendo 276.733 toneladas produzidas pelo estado do Paraná, seguido do Rio Grande do Sul com 71.295 toneladas, São Paulo com 21.686 toneladas produzidas, além dos estados de Santa Catarina e Minas Gerais com produções menos significativas (IBGE, 2024).

O Paraná conta com a maior maltaria da América Latina, com capacidade produtiva de 360 mil toneladas de malte por ano, atendendo aproximadamente 30% da demanda do mercado brasileiro de cerveja com malte fabricado a partir de cevada nacional. Além disso, em 2024, foi inaugurada no estado a Maltaria Campos Gerais, com capacidade produtiva de 240 mil toneladas por ano, ampliando a capacidade produtiva do Paraná para 600 mil toneladas de malte por ano, consolidando assim o estado como o maior produtor brasileiro de malte (Agrária, 2024).

Apesar do crescimento da indústria cervejeira, o Brasil ainda depende da importação para suprir grande parte da demanda do lúpulo utilizado no setor. No entanto, esse panorama está mudando. Nos últimos anos, o cultivo de lúpulo tem ganhado destaque e se expandido rapidamente, impulsionado pelos avanços tecnológicos e pelo potencial agrícola do país (Brazilian Farmers, 2023; Maciel, 2023).

O crescimento do cultivo de lúpulo é evidenciado pelos números. A produção brasileira teve um notável avanço em 2023, sendo que na safra 2022/2023, foram colhidos 88 toneladas de lúpulo, representando um aumento de 203% em comparação com a safra anterior. Também foi observado um salto na área total dedicada ao cultivo de lúpulo, atingindo 111,18 hectares, crescimento de 133% (Brazilian Farmers, 2023; APROLÚPULO, 2024).

Além disso, observou-se um aumento considerável no número de produtores envolvidos na atividade, em 2015 era apenas 1 produtor de lúpulo no Brasil, em 2023 somavam-se 114 produtores, um incremento anual de 40%, concentrando-se especialmente nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Brazilian Farmers, 2023; APROLÚPULO, 2024).

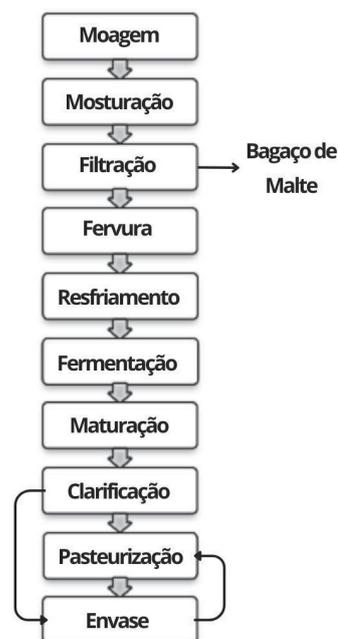
Além do aumento na produção e área plantada, o lúpulo do Brasil tem ganhado

espaço nas cervejarias do país, especialmente nas artesanais. Atualmente, pelo menos 110 cervejarias utilizam o lúpulo brasileiro, integrando os produtores à cadeia cervejeira (APROLÚPULO, 2024).

2.1.1 Etapas envolvidas na fabricação de cerveja

A fabricação da cerveja envolve etapas que transformam água, malte, lúpulo, por meio de leveduras, na bebida final. O processo pode variar dependendo do tipo de cerveja e da escala de produção (Brugger, 2024). Na Figura 1, constam as principais etapas da produção cervejeira, as quais são descritas em detalhes na sequência.

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE CERVEJA



FONTE: Adaptado de Barbosa (2018).

A etapa inicial consiste na moagem dos grãos de malte para romper a casca e expor o material amiláceo do interior. No processo podem ser empregados moinhos de rolos, moinhos de martelo ou de discos. A granulometria resultante do processo de moagem é fator essencial para as reações enzimáticas, pois a diminuição das partículas de amido aumenta a velocidade de hidrólise. No entanto, deve-se controlar a granulometria para não obter um produto fino que cause a obstrução de

equipamentos (Dragone; Silva; Silva, 2016; Pina, 2022; Yin *et al.*, 2023).

Em seguida ocorre a mosturação ou brassagem. Nessa etapa o malte é acondicionado em tanques e é adicionada água. A mistura é então aquecida em rampas de temperaturas que podem variar de 40 a 78 °C. No processo ocorre a ativação enzimática, entre 40 e 45 °C, através da solubilização do amido por meio de β -glucanases. Na faixa de temperatura de 50 a 55 °C, ocorre o repouso proteolítico, onde pode ser observada a quebra de proteínas do malte em peptídeos e aminoácidos, por meio da ação das enzimas proteolíticas, deixando o amido suscetível à ação das enzimas de sacarificação. Durante a sacarificação, que ocorre entre 60 e 72 °C, o amido é convertido em açúcares fermentescíveis pelas enzimas α -amilases e β -amilases. Por fim, entre 76 e 78 °C, ocorre a inativação enzimática, estabilizando o mosto e impedindo a ação contínua das enzimas durante a filtração (Morado, 2017; Yin *et al.*, 2023).

Posteriormente, o bagaço de malte, fração sólida, é separado do mosto, fase líquida, na etapa de filtração, por meio de filtros de placas ou tinas de clarificação (tina-filtro) (Morado, 2017).

Após a filtração o mosto é aquecido, seguindo para a etapa de fervura. O aquecimento do mosto é essencial para garantir a qualidade da cerveja, promovendo a estabilidade bioquímica, biológica e coloidal do mosto devido a inativação das enzimas e microrganismos, evaporação de substâncias indesejadas e precipitação de compostos floculantes. Nessa etapa também é adicionado o lúpulo, geralmente no início e no final do processo, a fim de proporcionar o amargor e aroma, respectivamente (Biazotto, 2024; Morado, 2017).

Em seguida o mosto é resfriado de 100 °C para cerca de 20 °C, normalmente em trocadores de calor de placas com água gelada, a fim de evitar amargor excessivo, preservar os aromas do lúpulo, prevenir contaminações e impedir a formação de dimetil sulfeto. Além disso, nessa etapa, o mosto é separado do *trub* (proteínas coaguladas, partículas de lúpulo e outros subprodutos, resultantes do processo de fervura) por centrifugação ou pelo método *Whirlpool*. Por fim, o mosto é aerado para fornecer oxigênio à levedura antes de ser transferido para os tanques fermentadores (Carvalho, 2007; Batista, 2021; Brugger, 2024; Morado, 2017).

Finalmente é iniciada a fermentação, processo no qual o mosto recebe as leveduras que convertem açúcares em CO₂ e etanol, além de ésteres, ácidos orgânicos, álcoois superiores alifáticos e aromáticos, compostos carbonílicos,

sulfurados e álcoois polihídricos (Alves, 2014; Batista, 2021). O tempo do processo fermentativo depende do tipo de cerveja, para *lagers* dura entre 5 e 7 dias com a temperatura variando de 7 a 14 °C e, para *ales*, de 3 a 5 dias com a faixa de temperatura de 15 a 20 °C (Michel *et al.*, 2016).

Após a remoção do fermento, ocorre a etapa de maturação em baixas temperaturas por um período de até 72 horas. Nessa fase, ocorre a redução de compostos indesejáveis como ácido sulfídrico, acetaldeído e diacetil que são responsáveis pelo sabor desagradável, além de promover a estabilidade coloidal e a sedimentação dos microrganismos residuais, aprimorando seu perfil sensorial. Nessa etapa do processo, podem ser adicionados ingredientes como especiarias, frutas e lascas de madeira para intensificar os aromas (Batista, 2021; Biazotto, 2024; Morado, 2017).

Em seguida vem a etapa da clarificação, em que ocorre a remoção de turbidez através de centrífugas, terra diatomácea ou perlita, eliminando células de leveduras e partículas sólidas. O processo melhora o aspecto visual da bebida sem alterar significativamente o sabor e composição (Alves, 2014; Morado, 2017).

Normalmente após a clarificação ocorre ainda uma etapa de carbonatação da cerveja, podendo ser feita por injeção direta gás carbônico ou pelo método *priming*, que adiciona açúcar para uma fermentação secundária. Essa etapa melhora as características sensoriais da bebida e ajuda a inibir bactérias que reduzem sua validade (Lentz, 2018).

Por fim, o envase da bebida convencionalmente é feito utilizando garrafas de vidro, latas metálicas ou barris e a pasteurização pode ocorrer antes ou depois do envase, dependendo do processo fabril (Mosher; Trantham, 2017). Desse modo, a cerveja pode ser pasteurizada em temperaturas próximas a 75 °C, por alguns segundos, e envasada assepticamente após essa etapa. Ou ela pode ser acondicionada em garrafas, latas ou barris e em seguida passar pelo processo de pasteurização ao atravessar o túnel do pasteurizador, recebendo calor por aspersão de água quente, resultando em uma temperatura interna em torno de 60 a 65 °C, por alguns minutos (Brunelli, 2012). O processo garante a estabilidade biológica, através da eliminação de microrganismos que podem alterar as características da cerveja, além de oferecer segurança durante o envase (Batista, 2021).

2.1.2 Bagaço de Malte

O bagaço de malte gerado na indústria cervejeira, caracteriza-se como subproduto primário da atividade, sendo composto pela fração sólida obtida após a filtração do mosto, conforme identificado no fluxograma de etapas da Figura 1. Configura-se como subproduto mais abundante da indústria, representando cerca de 85% de todo o resíduo gerado no setor (Céspedes-Villalba, 2022; Coronado, 2020; Reinold, 1997). Estima-se que a cada 100 litros de cerveja fabricados, sejam gerados em torno de 20 kg de bagaço de malte (Kunze, 2014).

Trata-se de um subproduto lignocelulósico, composto predominantemente por cascas de grãos de malte de cevada em mistura com parte do pericarpo e camadas de tegumento dos grãos. É rico em proteínas e carboidratos sendo constituído por celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas, lipídios, minerais, vitaminas e aminoácidos. A casca contém quantidades significativas de sílica, polifenóis e minerais (Coronado, 2020; Mussatto, 2014). A composição lignocelulósica do bagaço de malte pode ser observada na Tabela 1.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CELULÓSICA DO BAGAÇO DE MALTE

Composição	Qin, Johansen e Mussato (2018)	Massardi, Massini e De Jesus Silva (2020)	Coronado (2020)
Celulose (como glicose) (%)	20,56 ± 0,62	15,99 ± 0,88	26,80
Hemicelulose (%)	25,97 ± 0,58	29,92 ± 1,60	37,17
como xilose (%)	16,35 ± 0,42	25,22 ± 1,46	*
como arabinose (%)	7,19 ± 0,13	4,71 ± 0,14	*
como galactose (%)	1,15 ± 0,02	*	*
como manose (%)	1,28 ± 0,05	*	*
Lignina (%)	19,57 ± 0,94	20,80 ± 0,42	17,13
Lignina solúvel (%)	4,30 ± 0,05	3,02 ± 0,01	*
Lignina insolúvel (%)	15,27 ± 0,88	17,78 ± 0,41	*

* Valores não especificados.

FONTE: A autora (2025).

De acordo com a literatura, o teor de celulose varia em torno de 15 a 25%, hemicelulose de 25 a 35% e lignina entre 15 e 20%. Tal composição confere a esse subproduto uma versatilidade notável para diversas aplicações industriais e sustentáveis. No entanto, a composição do bagaço de malte pode apresentar variações significativas em decorrência de fatores como o clima de cultivo do cereal, o tempo de colheita, o processo de malteação, a variedade da cevada e o processo cervejeiro do mosto (Massardi; Massini; De-Jesus-Silva, 2020; Mussatto, 2014).

2.1.2.1 Aplicações do Bagaço de Malte

A utilização mais comum do bagaço de malte atualmente é a suplementação alimentar de animais, em função das suas características nutricionais (Céspedes-Villalba, 2022).

No entanto, estudos demonstram potencial aplicação do bagaço de malte como matéria-prima em diferentes processos, incluindo a produção de biocombustíveis, especialmente etanol de segunda geração. Também são citados a produção de compostos químicos de alto valor agregado em nível comercial, como ácidos orgânicos, biocarvões, ou ainda suplementos que podem ser utilizados na nutrição humana (Massardi; Massini; De-Jesus-Silva, 2020).

Alguns autores estudam aplicações do bagaço de malte em outras áreas não tão usuais. Vieira (2022) propôs a aplicação do bagaço de malte na composição de embalagens biodegradáveis. Piffer *et al.* (2024) sugeriram incorporar o bagaço de malte em espumas de poliuretano (PU) em função do seu baixo custo, leveza e resistência.

Além disso, a utilização do bagaço de malte também vem sendo estudada nos processos biotecnológicos, empregando-o como substrato ou suporte para processos fermentativos e produção enzimática (Céspedes-Villalba, 2022).

2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido surge como uma alternativa sustentável para utilização de resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo de microrganismos, visando a obtenção de bioprodutos, incluindo enzimas, antibióticos, pigmentos e outros biocompostos (Rocha, 2019; Schmidell *et al.*, 2021).

O conceito de fermentação em estado sólido foi descrito por Lonsane *et al.* (1985), que definiram a fermentação em estado sólido como processos que envolvem o crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas de uma matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido associado está em um nível de atividade de água que assegura o crescimento e metabolismo das células, sem exceder a capacidade de retenção de água da matriz sólida.

O processo consiste em um sistema trifásico, envolvendo as fases sólida, líquida e gasosa. Os microrganismos se desenvolvem na superfície das partículas de

um substrato sólido úmido. A água presente no sistema apresenta-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas e desempenha um papel essencial no metabolismo e no transporte de nutrientes. Além disso, os espaços intersticiais entre as partículas do substrato são preenchidos pela fase gasosa, que fornece oxigênio e facilita a troca de gases, fatores essenciais para o crescimento microbiano e a produção de metabólitos de interesse (Lonsane *et al.*, 1985; Schmidell *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024).

As características do meio de cultura para a fermentação em estado sólido propiciam a utilização de bolores e leveduras, pois são microrganismos com maior capacidade de desenvolvimento em ambientes com baixa atividade de água quando comparados às bactérias, além de apresentarem rápido desenvolvimento (López-Pérez; Viniegra-González, 2016).

Embora seja um processo com baixa demanda de tecnologia, como em todo processo fermentativo, o controle de determinados parâmetros se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Os substratos e os microrganismos precisam ser selecionados de acordo com suas características e a demanda do processo. Também é necessária a adaptação e controle da umidade, granulometria do substrato sólido, pH, temperatura, aeração, concentração do inóculo e suplementação nutricional, que influenciam diretamente a taxa de crescimento dos microrganismos (López-Pérez; Viniegra-González, 2016; Schmidell *et al.*, 2021).

2.2.1 Granulometria

O tamanho da partícula é um dos fatores mais importantes na fermentação em estado sólido pois está diretamente associado às trocas gasosas do meio fermentado, além de interferir diretamente na difusividade, permeabilidade e condutividade dos nutrientes (Schmidell *et al.*, 2021).

Uma distribuição granulométrica adequada pode favorecer a eficiência de processos bioquímicos, resultando em maiores rendimentos na produção de subprodutos desejáveis (Alves, 2023). Meios muito empacotados dificultam o fornecimento de nutrientes, troca térmica, oxigenação, além de apresentarem significativa redução na superfície de contato, acarretando um baixo crescimento do microrganismo. Todavia, partículas maiores favorecem a respiração e aeração, porém limitam o fornecimento dos nutrientes, acarretando também em um baixo crescimento

microbiano (Mitchell; Berovic; Krieger, 2006).

O tamanho ideal de partícula depende do microrganismo, do substrato e/ou do suporte que estão sendo empregados. De acordo com Lima (2019) a fim de otimizar o processo, uma granulometria adequada para o aumento da porosidade da matriz sólida deve ser inferior a 2 mm.

2.2.2 Umidade

De acordo com Schmidell *et al.* (2021) o teor de umidade do substrato é um fator essencial na fermentação em estado sólido, influenciando o crescimento microbiano e a obtenção de produtos de interesse.

A umidade adequada deve permitir a dissolução e transferência de nutrientes e oxigênio, mantendo canais entre as partículas para troca gasosa e dissipação de calor. Umidade excessiva reduz a porosidade do substrato, dificultando a difusão de oxigênio e aumentando o risco de contaminação. Por outro lado, umidade insuficiente compromete a difusão de nutrientes, limitando o crescimento microbiano (Lonsane *et al.*, 1985; Schmidell *et al.*, 2021).

Na fermentação em estado sólido, o teor de umidade pode variar de 18 a 85%, dependendo do substrato e do microrganismo. Para o crescimento de microrganismos em substratos lignocelulósicos, o teor de umidade normalmente varia entre 70 e 80% (Schmidell *et al.*, 2021).

2.2.3 Temperatura

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida na fermentação em estado sólido, sendo primordial o controle de temperatura durante o processo (Schmidell *et al.*, 2021).

Elevadas temperaturas afetam a germinação dos esporos, o crescimento e esporulação dos microrganismos, além de comprometer a formação dos produtos de interesse. Desse modo, a fim de facilitar a troca térmica do meio fermentado com o ambiente, é necessário que haja porosidade suficiente para que o ar possa percorrer entre o meio fermentado propiciando a dissipação imediata do calor (Schmidell *et al.*, 2021).

Outras alternativas podem ser empregadas, desde a introdução de ar comprimido através do meio de cultura, o controle da temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, até o uso de sistemas de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante, a fim de reduzir a temperatura na fermentação em estado sólido (Lonsane *et al.*, 1985).

2.2.4 pH

De acordo com Pandey (1991) o pH é uma variável crucial em processos fermentativos. Cada microrganismo possui uma faixa de pH ideal para seu crescimento e atividade, apresentando valores ótimos que variam de acordo com o microrganismo. O crescimento de fungos, em geral, ocorre melhor em ambientes com pH levemente ácido, entre 4,5 e 5,0, refletindo suas condições naturais de habitat. Já para bactérias, o pH ideal tende a ser próximo da neutralidade, variando entre 6,5 e 7,0.

Apesar da importância do pH para a otimização de processos em estado sólido, o controle e o monitoramento desse parâmetro apresenta desafios significativos devido a falta de equipamentos e eletrodos adequados para determinar o pH em materiais sólidos e a existência de gradientes de pH devido às características heterogêneas do processo. Dessa forma, a determinação precisa do pH em substratos sólidos é geralmente possível apenas no início e ao final do processo fermentativo e são fundamentais para otimizar o crescimento microbiano em aplicações laboratoriais e industriais (Palma, 2003; Pandey, 1991).

2.2.5 Concentração do inóculo

A concentração de inóculo na fermentação em estado sólido influencia diretamente o crescimento microbiano, a produtividade e a eficiência na conversão do substrato. Uma concentração adequada de inóculo permite que os microrganismos utilizem os nutrientes de forma eficiente, otimizando a produção de metabólitos desejados, como enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos. Além disso, garante o rápido estabelecimento dos microrganismos no substrato, reduzindo o tempo de latência e prevenindo o crescimento de contaminantes (Raimbault, 1998).

Baixas concentrações de inóculo provocam crescimento lento do

microrganismo de interesse, podendo prevalecer a proliferação de agentes contaminantes comprometendo a fermentação e a qualidade do produto final (Sandhya *et al.*, 2005; Rimbault 1998).

Em contrapartida, se a concentração de inóculo for muito alta, ocorre a geração de biomassa excessiva, o que ocasiona competição por nutrientes e leva ao acúmulo de calor metabólico, reduzindo a eficiência do processo, além de prejudicar o crescimento microbiano através da inativação de enzimas essenciais (Sandhya *et al.*, 2005; Rimbault 1998).

De acordo com Rimbault (1998), a concentração ideal de inóculo na fermentação em estado sólido pode variar entre 10^4 a 10^8 esporos ou células viáveis por grama de substrato, dependendo do tipo de microrganismo e do produto desejado. A otimização dessa variável é essencial para garantir um processo eficiente e economicamente viável.

2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Atualmente são cerca de 155.869 espécies de fungos descritas (Catalogue of Life, 2025). Os fungos filamentosos pertencem ao reino Fungi, são quimio-heterotróficos e adquirem alimentos por absorção. São multicelulares, com exceção das leveduras. Seu crescimento, ocorre através da extensão apical e ramificação das hifas, permitindo a penetração no substrato e formação do micélio, que facilita a captação de nutrientes da superfície interna do material (Maciel, 2006; Tortora; Funke; Case, 2017).

O ciclo de vida desses microrganismos envolve duas formas de reprodução: sexuada e assexuada. Na forma assexuada, os fungos se reproduzem por meio da formação de conidióforos ou esporangiosporos, esporos assexuados, ou através da fragmentação e propagação das hifas. Na reprodução sexuada, são formados esporos sexuados, através da fusão de material genético, que se separam das células parentais e germinam, originando novos fungos (Abbas; Khudor; Alkhursan, 2021; Tortora; Funke; Case, 2017).

Encontrados em habitats variados, desde solo até alimentos em decomposição e ambientes aquáticos, esses organismos desempenham papéis essenciais nos ecossistemas. Atuam na decomposição de matéria orgânica, contribuindo para a mineralização do carbono e reciclagem de nutrientes. Alguns formam relações

simbióticas com plantas, auxiliando na absorção de minerais do solo, enquanto outros são parasitários, afetando plantas e animais, incluindo humanos (Dias, 2025; Takahashi *et al.*, 2018; Tortora; Funke; Case, 2017).

Além disso, os fungos têm grande importância econômica, sendo amplamente utilizados para a produção de medicamentos e alimentos, resolução de racematos, obtenção de substâncias de interesse por meio de processos fermentativos, degradação natural de resíduos ambientais (Dias, 2025; McKelvey; Murphy, 2018; Takahashi *et al.*, 2018).

Na biotecnologia os fungos são utilizados há muitos anos. São organismos versáteis e amplamente empregados em processos envolvendo fermentação em estado sólido, uma vez que são extremamente adaptáveis à condições na ausência de água livre, em substratos sólidos e resistentes a altas pressões osmóticas. Além disso, suas propriedades fisiológicas e bioquímicas permitem controlar a produção de enzimas de acordo com suas necessidades e com a disponibilidade de substratos, gerando eficientemente compostos de interesse a baixos custos (Silva *et al.*, 2024; Socol *et al.*, 1994).

De acordo com Socol *et al.* (1994), dentre os melhores fungos produtores de enzimas encontram-se em espécies pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

2.3.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus*, descrito pela primeira vez no ano de 729 pelo Padre Florentino e pelo micologista Pietro Antonio Micheli, compreende mais de 340 espécies aceitas, sendo de grande relevância ecológica e econômica (Abdel-Azeem *et al.*, 2019).

Trata-se de um gênero que ocorre em todo o mundo, com espécies principalmente terrícolas. Atuam como decompositores de materiais orgânicos e causam podridões destrutivas em produtos agrícolas e na indústria alimentícia, onde produzem uma ampla gama de micotoxinas (Abbas; Khudor; Alkhursan, 2021).

Apesar disso, fungos do gênero *Aspergillus* demonstram grande relevância em processos biotecnológicos destinados à agricultura, produção de alimentos e saúde humana e animal, especialmente devido à sua capacidade de produzir substâncias de interesse. Ele é amplamente empregado na biotransformação de produtos já

existentes, aprimorando suas aplicações, além disso, é utilizado em ensaios laboratoriais, para análise da atividade antifúngica de produtos farmacêuticos e em testes de esterilidade, fazendo parte do procedimento de controle de qualidade de vários produtos (Abdel-Azeem *et al.*, 2019; Afonso, 2015).

Estudos têm demonstrado a capacidade desses microrganismos na síntese de metabólitos de interesse, especialmente de cepas pertencentes à espécie *A. niger*, em função da sua eficiência na síntese de enzimas hidrolíticas (Zhang *et al.*, 2025). De-França e Da-Silva (2021) por meio da fermentação submersa de meios formulados com cascas de batata inglesa e macaxeira, utilizaram cepas de *A. niger* para produção de amilases. Rodrigues (2022) avaliou a produção e caracterizou amilases obtidas através de fermentação no estado sólido, empregando *A. niger*, visando alternativas para o reaproveitamento de subproduto oriundo da indústria cervejeira. Zhang e colaboradores (2025) identificaram uma cepa de *A. niger* isolado da floresta tropical paranaense e avaliaram sua atividade celulolítica, demonstrando potencial para aplicação no processamento de biomassa celulósica em escala industrial.

A classificação taxonômica de *A. niger* é dada pelo domínio Eukaryota, reino Fungi, divisão Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, gênero *Aspergillus* e espécie *A. niger* (Schoch, 2020).

Morfologicamente as colônias de *A. niger* consistem em um micélio vegetativo de coloração branca ou creme, coberto por uma densa camada de conídios globosos ou subgloboso, com 3,5 a 5 µm de diâmetro, marrom-escuros a pretos, com paredes ásperas. Os conídios são bisseriados com as fiáides nas métulas marrons, geralmente septadas. Os estipes dos conidióforos apresentam paredes lisas, hialinas ou escurecendo em direção à vesícula. Os conidióforos são estruturas longas, largas e de paredes espessas, predominantemente pretos, com largura variando entre 15 e 20 µm. As vesículas possuem um formato globoso, com diâmetro entre 50 e 80 µm. Os esterigmas estão organizados em primários, com coloração marrom escuro, dimensões entre 20 e 25 µm de comprimento e 8 e 10 µm de largura, e secundários, apresentando formato de garrafa, com 6 a 10 µm de comprimento e 2,5 a 3,5 µm de largura. O reverso das colônias é incolor, não demonstra exsudatos e possui um leve odor característico (Abbas; Khudor; Alkhursan, 2021; Díaz *et al.*, 2021). As características podem ser observadas na Figura 2:

FIGURA 2 - CRESCIMENTO DO *A. niger* EM MEIO DE CULTURA BDA, VISUALIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA



FONTE: Abbas, Khudor e Alkhursan (2021).

A. niger é considerado um fungo não patogênico e na produção de alguns compostos é reconhecido como seguro (Generally Recognized As Safe - GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. No entanto, algumas estirpes industriais de *A. niger* podem produzir micotoxinas, sendo essencial a produção em condições que não favorecem a formação desses metabólitos, bem como, o posterior controle dos compostos gerados, a fim de garantir a segurança durante sua utilização na indústria (Afonso, 2015).

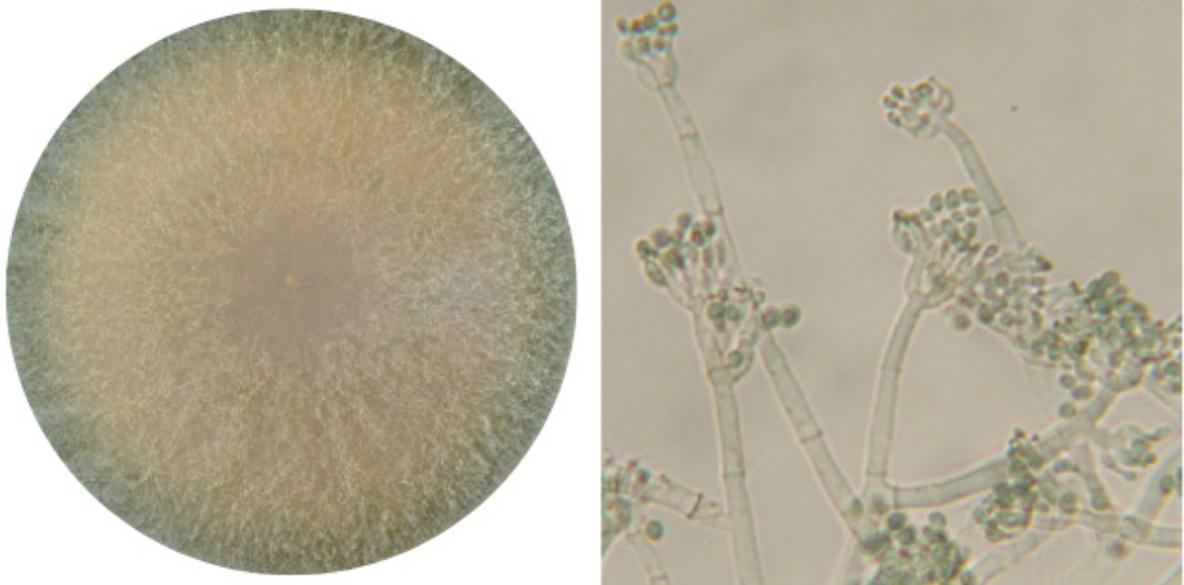
2.3.2 Gênero *Trichoderma*

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* foram descritos por Persoon e Gray em 1801. Eles pertencem ao filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales* e família *Hypocreaceae* (Schoch, 2020). São fungos saprófitos mesofílicos, amplamente distribuídos na natureza, frequentemente encontrados em materiais vegetais em decomposição e na rizosfera de plantas, onde podem induzir resistência sistêmica a patógenos (Kubicek; Komon-Zelazowska; Druzhinina, 2008; Jaklitsch, 2009).

Esses fungos possuem um crescimento rápido, com colônias que atingem de 2 a 9 cm de diâmetro em até quatro dias de cultivo dependendo do meio de cultura (Esposito, Silva, 1998). Macroscopicamente, fungos do gênero *Trichoderma*

caracterizam-se por apresentar crescimento micelial aveludado, cuja cor varia do branco ao verde de acordo com o tempo de incubação. As colônias podem ser dispersas e flocosas ou compactadas em tufos, com conídios de coloração variável, incluindo tons de verde brilhante, amarelo ou verde-amarelado (Carrera-Parra, 2022; Pelczar; Reid; Chan, 1980; Silveira, 1995). O tamanho e o formato dos conídios são bastante variáveis, com valor taxonômico limitado. Eventualmente, podem ser observados clamidósporos, esporos assexuais, formados por modificações em segmentos das hifas, localizados de forma intercalar ou terminal (Howell, 2003). Na Figura 3 podem ser observadas as características morfológicas de fungos do gênero.

FIGURA 3 - COLÔNIAS DE *Trichoderma* sp. EM MEIO DE CULTURA E CONIDIÓFORO COM FIÁLIDES PENICILADAS E CONÍDIOS DE *T. virens*

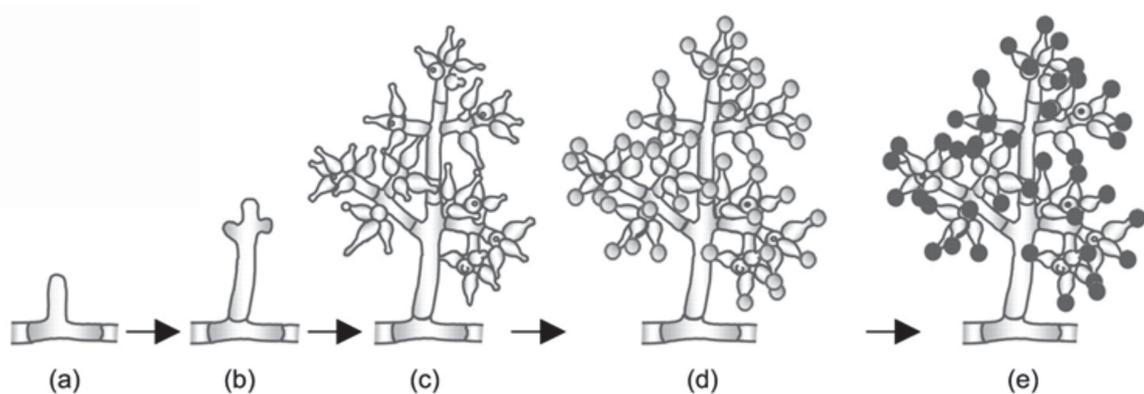


FONTE: Adaptado de Meyer, Mazaro e Silva (2019).

O mecanismo de propagação desses microrganismos pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. Na fase sexuada, formam peritécios em estromas de cores variadas, contendo ascos cilíndricos com oito ascósporos bicelulares, que se fragmentam em esporos esverdeados ou hialinos. Já na fase assexuada, mais comum, os conidióforos são formados, a partir do micélio vegetativo, com um eixo central e ramificações laterais, que terminam em espirais divergentes de células conidiogênicas do tipo fiálide, com formato de garrafa ou alongadas. Na ponta das fiálides são produzidos os típicos conídios unicelulares, podendo ser esféricos, ovais ou alongados, com coloração verde na maior parte das espécies. Os conidióforos são

comumente agregados em pústulas ou ‘tufos’ espalhados pela colônia (Jaklitsch, 2009; Pfenning; Abreu, 2008). O esquema de reprodução assexuada está representado na Figura 4.

FIGURA 4 - *Trichoderma* EM SUAS FASES DE CRESCIMENTO: A) HIFA, B) CONIDIÓFORO JOVEM, C) FIÁLIDES MUCRONADAS D) ESPOROS IMATUROS, E) ESPOROS MADUROS



FONTE: Adaptada de Steyaert *et al.* (2010).

O gênero *Trichoderma* é cosmopolita, com ampla distribuição em praticamente todos os tipos de solos e habitats naturais, especialmente aqueles ricos em matéria orgânica, sendo um componente dominante da microbiota do solo em diversos ambientes. Esses fungos estão presentes tanto em climas temperados quanto tropicais, podendo ser isolados de serapilheiras ricas em micélio e de madeira em decomposição, onde frequentemente ocorre a fase sexual (teleomórfica) associada ao gênero *Hypocrea* (Karboune; Geraert; Kermacha, 2008; Machado *et al.*, 2012).

Além disso, eles desempenham importantes funções ecológicas, como a decomposição e mineralização de resíduos vegetais, contribuindo para a ciclagem de nutrientes no solo. A sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou em substratos é influenciada por fatores como temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica (Howell, 2003; Meyer; Mazaro; Silva, 2019).

Fungos do gênero *Trichoderma*, especialmente pertencentes a espécie *T. asperellum*, demonstram potencial para biocontrole, tanto direto quanto indireto, contra uma ampla gama de fitopatógenos do solo. Eles agem por meio de vários mecanismos complexos, como micoparasitismo, degradação de paredes celulares de patógenos, competição por nutrientes e espaço, e indução de resistência de plantas. Em função do seu estilo de vida saprotrófico e micoparasitário, caracterizam-se como

hospedeiros interessantes para expressão gênica heteróloga (Afonso, 2015; Neto, 2024; Tyśkiewicz, 2021).

Sua versatilidade também se reflete na capacidade de colonizar desde ambientes ricos e complexos, como florestas tropicais, até condições extremas, como biorreatores e fermentadores biotecnológicos, adaptando seu crescimento, produção de conídios e secreção de enzimas conforme as condições ambientais. Além disso, alguns membros deste gênero são geralmente reconhecidos como seguros (status GRAS), o que torna o gênero *Trichoderma* de grande relevância para estudos em biotecnologia e ecologia microbiana (Afonso, 2015; Lima, 2021; Schuster; Schmoll, 2010).

2.4 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

As enzimas são um grupo de proteínas que desempenham funções essenciais no metabolismo atuando como catalisadoras de processos bioquímicos. São heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente através de ligações peptídicas. Elas detêm um importante papel principalmente na degradação da matéria orgânica originando novos produtos, na deterioração de alimentos e infecção de hospedeiros (Lehninger; Nelson; Cox, 1995, Borzani *et al.*, 1993).

As enzimas são divididas em sete classes de acordo com as reações que catalisam, sendo elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases (Borzani *et al.*, 1993; IUBMB, 2024).

As hidrolases catalisam reações de hidrólise, através da transferência de grupos funcionais para a água. Elas podem ser obtidas por meio de processos biotecnológicos como a fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e são amplamente empregadas em produtos e processos sustentáveis, especialmente no ramo alimentício, têxtil, farmacêutico, de papel e celulose e bioenergia (Borzani *et al.*, 1993; Dias, 2024).

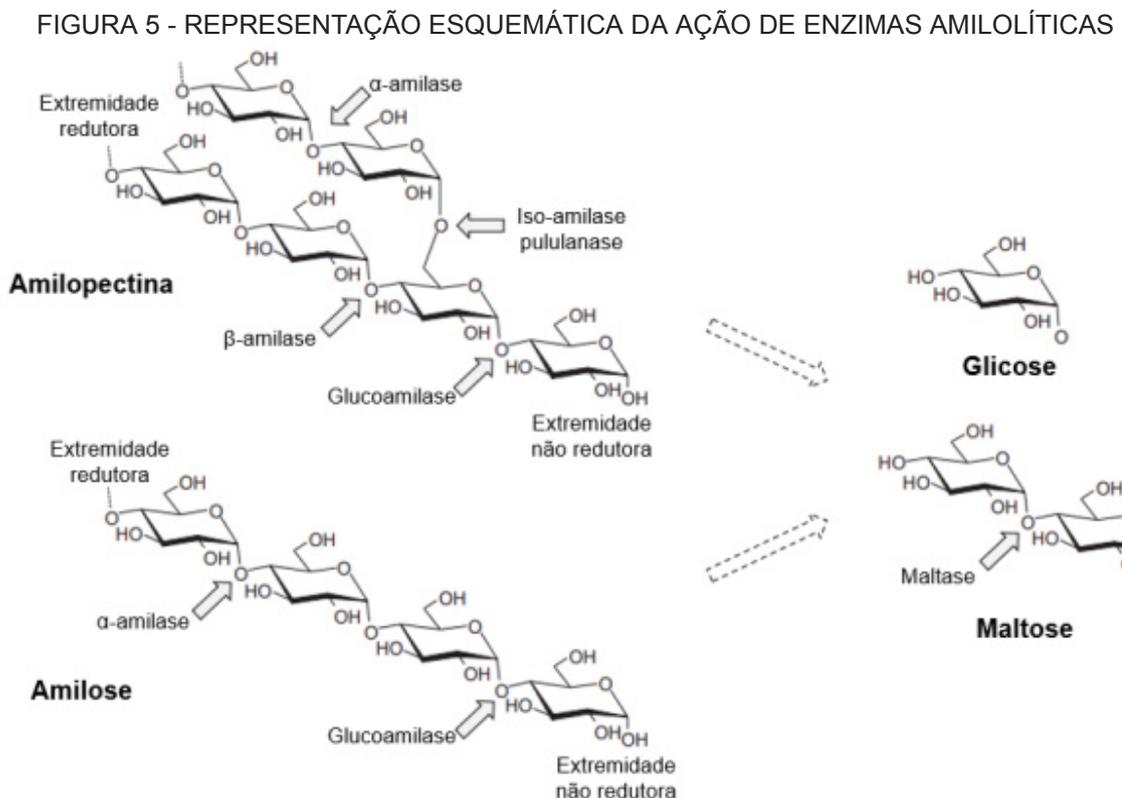
2.4.1 Amilases

As enzimas amilolíticas são amplamente distribuídas na natureza, encontrando-se em diversos organismos incluindo animais e plantas. Além disso, elas

são produzidas naturalmente por microrganismos como fungos, leveduras, bactérias e actinobactérias (Harger; Sprada; Hiratsuka, 1982; Oliveira, 2019; Reed, 1975).

Essas enzimas são classificadas como: α -amilases (EC 3.2.1.1) denominadas cientificamente 1,4- α -D-glucano glucanohidrolases, β -amilases (EC 3.2.1.2) ou 1,4- α -D glucano maltohidrolases e glicoamilases (EC 3.2.1.3) chamadas 1,4- α -D glucano glucohidrolases, e atuam sinergicamente na degradação do amido em função dos seus diferentes mecanismos de ação (Reed, 1975).

As α -amilases ou endoamilases, atuam fragmentando rapidamente o amido em cadeias menores através da degradação de ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α -1,4. As β -amilases ou exoamilases, hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir de extremidades não-redutoras sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose. Por último, as glicoamilases ou amiloglicosidases rompem as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não-redutora até a glicose (Reed, 1975). O mecanismo de hidrólise está esquematizado na Figura 5:



FONTE: Bezerra *et al.* (2022), adaptado de Cripwell, Van-Zyl e Viljoen-bloom (2021).

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo nas pesquisas sobre a produção de α -amilases extracelulares por diversos microrganismos, especialmente em função da eficiência econômica na produção em larga escala, além de serem facilmente manipuláveis para obter enzimas com características específicas (Lemos, 2021; Lima, 2019; Oliveira, 2019).

Amilases obtidas a partir de fungos e bactérias têm se destacado nas aplicações industriais pois apresentam uma vasta diversidade genética e funcional, desenvolvidas no decorrer de anos de evolução e adaptação a pressões seletivas, (Harger; Sprada; Hiratsuka, 1982; Oliveira, 2019; Reed, 1975).

Essas enzimas destacam-se no cenário econômico pois possuem diversas aplicações em diferentes setores incluindo alimentos, bebidas, nutrição animal, detergentes e produtos de higiene pessoal, indústrias de celulose e papel, couro, têxtil e outras, representando 25 a 30% do mercado global de enzimas (Cripwell; Van-Zyl; Viljon-Bloom; 2021; Dias, 2025).

Nesse contexto, a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose representa a maior aplicação das amilases no mercado de bebidas e refrigerantes. Enquanto a produção de etanol de primeira geração a partir da hidrólise do amido representa a segunda maior aplicação industrial destas enzimas (Cripwell; Van-Zyl; Viljon-Bloom, 2021; Dias, 2025).

As amilases desempenham papel fundamental em processos industriais limpos, contribuindo positivamente para a economia, sociedade e meio ambiente (Dias, 2025).

2.4.2 Celulases

As enzimas celulolíticas desempenham um papel primordial no ciclo natural do carbono através da hidrólise das estruturas lignocelulósicas (Lima, 2021).

As celulases são categorizadas em três grupos de acordo com o local de ação no substrato, sendo elas: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases, incluindo as celobiohidrolases β -1,4 (EC 3.2.1.91) e as glucanohidrolases (EC 3.2.1.74), e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Dias, 2024; Lima, 2021).

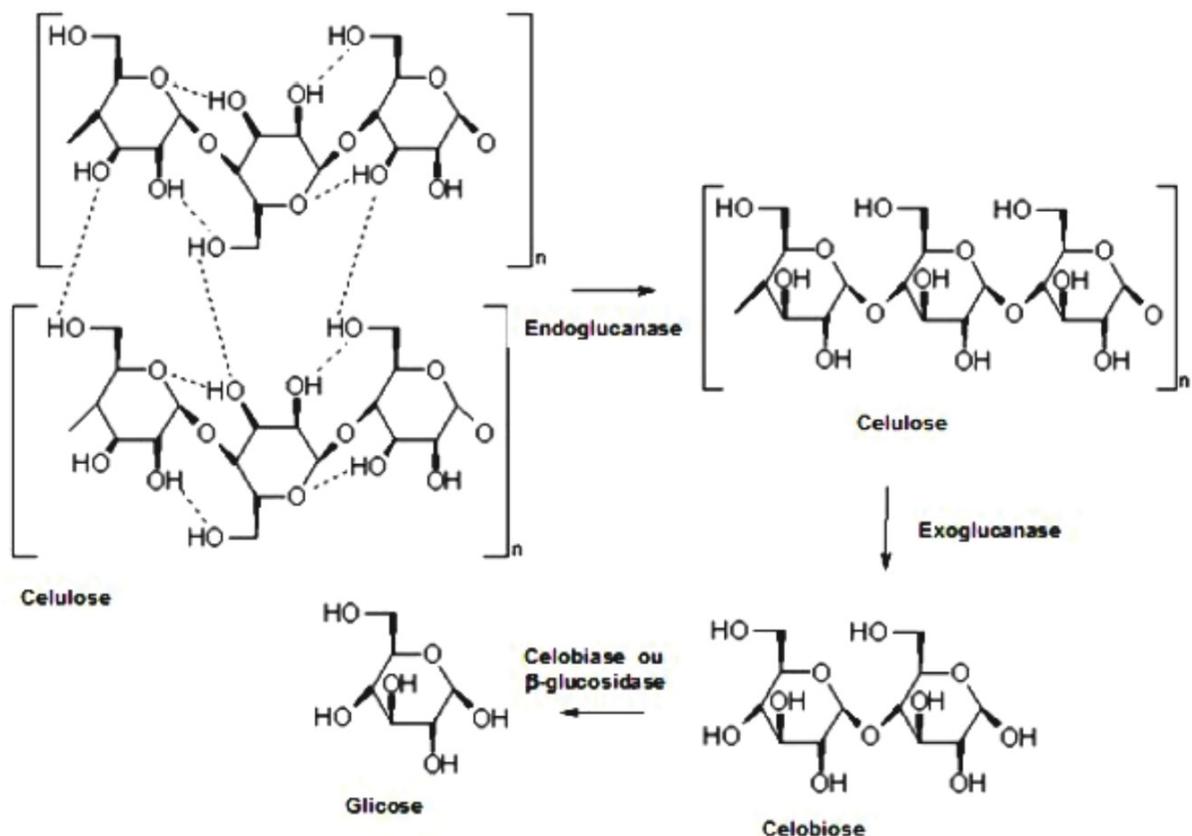
As endoglucanases, denominadas 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases, são responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose. Elas promovem a rápida solubilização do polímero ao liberar oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. Sua

ação ocorre de forma aleatória nas regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 no centro da molécula, liberando açúcares e oligossacarídeos, além de criar novos terminais redutores e não redutores (Andrade *et al.*, 2022; Castro; Pereira-Junior, 2010; Lynd; Zhang, 2002).

O grupo das exoglucanases atua nas extremidades da celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose e glicose diretamente do polímero (Andrade *et al.*, 2022; Castro; Pereira-Junior, 2010; Lynd; Zhang, 2002).

Enquanto as β -1,4-glicosidases, ou celobiasas, catalisam a hidrólise da celobiose e de celodextrinas solúveis, convertendo-as em glicose. Essas enzimas reduzem a inibição das endoglucanases e exoglucanases, aumentando o rendimento total de açúcares fermentescíveis (Andrade *et al.*, 2022; Castro; Pereira Junior, 2010; Lynd; Zhang, 2002). A ação dessas enzimas é demonstrada na Figura 6.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS



FONTE: Farinas (2011).

A eficiência e especificidade das enzimas celulolíticas as tornam ferramentas valiosas em processos industriais relacionados à degradação da celulose, sendo

empregadas em diversas aplicações biotecnológicas. Dentre elas: indústrias de alimentos e bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos, indústrias têxteis, em processos de biopolimento e bioestonagem, e ainda, na nutrição animal, sendo comumente incorporadas à ração, a fim de aumentar a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, melhorando a conversão do pasto ingerido em carne e leite. Além disso, podem ser incorporadas a outros processos nas indústrias farmacêutica, de papel e celulose e detergentes (Dias, 2024; Lima; 2021).

Para além, o interesse por essas enzimas têm aumentado significativamente devido a boa conversão de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz, bagaço de malte e demais grãos, além de restos de madeiras, em biocombustíveis, como o etanol (Bhat; Bhat, 1997; Dias, 2024).

2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR FUNGOS FILAMENTOSOS PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS

A fermentação em estado sólido do bagaço de malte por fungos filamentosos tem se destacado como uma estratégia promissora para a produção de enzimas de interesse industrial, como amilases, celulasas e pectinases. Esses microrganismos são conhecidos por sua capacidade de hidrolisar biomassa vegetal, sendo eficazes na produção de enzimas extracelulares. Essa abordagem não apenas valoriza os resíduos agroindustriais, mas também contribui para a sustentabilidade e economia circular (Oliveira, 2023; Santos, 2023).

Rodrigues, D'Amico e Gerage (2023a) demonstraram resultados satisfatórios utilizando bagaço de malte associado à farinha de casca de mandioca para obtenção de amilases fúngicas empregando microrganismo *Trichoderma reesei* em processos de fermentação em estado sólido.

Santana (2021) avaliando a fermentação em estado sólido da fração retida em 16 mesh de resíduo úmido cervejeiro, ajustado para pH 5 e 70% de umidade, inoculado com *A. niger* e incubado a 32 °C, verificou atividade enzimática de amilases de $215,26 \pm 0,67 \text{ U.g}^{-1}$.

Além disso, pesquisas recentes têm investigado a obtenção de enzimas celulolíticas através da fermentação de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por diferentes gêneros de fungos filamentosos, confirmando segurança e eficácia na

síntese, bem como estabilidade e aplicabilidade dessas enzimas (Coelho *et al*, 2018; Lima, 2021; Rodrigues; D'Amico; Gerage 2023b; Santos, 2018; Tartarine, 2018).

Pelenz (2018) avaliou a produção de enzimas celulasas fúngicas a partir de capim elefante por fermentação em estado sólido, empregando *Trichoderma viride* e *T. asperellum*, sob diferentes teores de umidade e pH. No trabalho, a maior produção de CMCases foi observada para *T. viride*, obtendo 39 U.g⁻¹, enquanto *T. asperellum* demonstrou maiores valores sendo 29,13 U.g⁻¹ para ensaios com umidade inicial na fermentação em estado sólido de 80%. Além disso, foram verificadas produções ótimas de FPases de 35,0 U.g⁻¹ para *T. viride* e 20,8 U.g⁻¹ para *T. asperellum*.

Martins (2020), empregando um consórcio entre *Pleurotus ostreatus* PLO6 e *A. niger* SCBM1 na fermentação em estado sólido de bagaço de cana e farelo de trigo, também obteve excelentes resultados para produção da CMCases, em torno de 20,19 U.g⁻¹.

Nesse sentido, estudos demonstram que fungos filamentosos, como *A. niger* e *T. asperellum*, são capazes de produzir enzimas de forma eficiente quando cultivados em resíduos agroindustriais lignocelulósicos, como o bagaço de malte. Essa abordagem não apenas valoriza os subprodutos da indústria cervejeira, mas também contribui para a economia circular e a redução de impactos ambientais. Além disso, o processo apresenta vantagens como menor consumo de água e energia, e maior concentração de produtos, tornando-se uma alternativa promissora para a produção enzimática em larga escala. Portanto, a aplicação da fermentação em estado sólido com bagaço de malte e fungos filamentosos representa uma solução sustentável para atender à crescente demanda por enzimas industriais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia, laboratório de Cinética e Biorreatores e Química Analítica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina.

3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO BAGAÇO DE MALTE

O bagaço de malte utilizado no desenvolvimento da pesquisa é um subproduto proveniente da produção cervejeira, fornecido por uma indústria localizada no oeste do Paraná. Para conservação de suas características o bagaço foi seco em estufa e, posteriormente, armazenado em temperatura ambiente.

3.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *A. niger* E *T. asperellum*

Os fungos utilizados para produção de amilases e celulasas foram uma cepa de *A. niger* e outra cepa de *T. asperellum* fornecidos pela Micoteca do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) - da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os microrganismos foram previamente identificados através de suas características morfológicas macro e microscópicas pelos colaboradores do NEMA. Durante a pesquisa as culturas foram preservadas em placas de Petri contendo meio ágar, batata, dextrose (BDA) e mantidas sob refrigeração.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE

O bagaço de malte foi caracterizado quimicamente quanto à umidade, teor de cinzas, matéria orgânica, teor de carbono, nitrogênio, proteínas, lipídios, carboidratos e pH seguindo as metodologias, conforme disposto na Tabela 2.

TABELA 2 - METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE

Análises	Metodologia	Referência
Matéria Orgânica	Gravimetria	Goldin (1987)
Carbono	Gravimetria	Zucconi e De Bertoldi (1987)
Nitrogênio	Titulometria	Bremner e Mulvaney (1982)
Proteína	Titulometria	Bremner e Mulvaney (1982)
Lipídios	Gravimetria	Bligh e Dyer (1959)
Carboidratos	Diferença	Adolfo Lutz (1985)
Umidade	Gravimetria	Adolfo Lutz (1985)
Cinzas	Gravimetria	Adolfo Lutz (1985)
pH	Potenciometria	Adolfo Lutz (1985)

Fonte: A autora (2025).

As metodologias empregadas nos ensaios estão descritas no Apêndice 1.

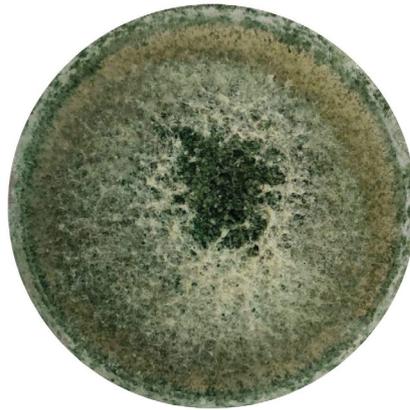
3.5 PREPARO DO INÓCULO

Os inóculos foram preparados, separadamente, conforme descrito por Rocha (2019), através da suspensão dos esporos produzidos pelas cepas de *A. niger* (Figura 7) e *T. asperellum* (Figura 8), em água destilada esterilizada, em placas de Petri contendo meio BDA.

FIGURA 7 - CULTIVO EM PLACA DE PETRI DO FUNGO *A. niger* EM MEIO BDA



FONTE: A autora (2025).

FIGURA 8 - CULTIVO EM PLACA DE PETRI DO FUNGO *T. asperellum* EM MEIO BDA

FONTE: A autora (2025).

Primeiramente, adicionou-se água destilada aos poucos sobre os esporos presentes nas placas e, em seguida, foi realizada a raspagem com alça de platina para facilitar a dissolução dos esporos na água. Ao final do processo obtiveram-se soluções concentradas de cada um dos inóculos.

Para determinação dos respectivos volumes de inóculo a serem adicionados aos meios de cultivo, foram estimadas as concentrações de esporos presentes em cada uma das soluções concentradas de inóculo. Para isto, foram preparadas soluções diluídas dos inóculos iniciais, através da adição de 1,0 mL de cada solução a tubos tipo Falcon, e posterior adição de 9,0 mL de água destilada aos tubos. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e então sucedeu-se a contagem dos esporos utilizando câmara de Neubauer, considerando um total de 5 quadrantes (4 extremidades e o central). Para estimar a concentração de esporos nas soluções concentradas de inóculo foi empregada a Equação 1:

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \sum_{i=1}^{N=5} x_i * 5 * 10^4 * FD \quad (1)$$

Em que:

X_i = Quantidade de esporos num dado quadrante;

5 = Fator de expansão dos quadrantes contados para o total de quadrantes;

10^4 = Fator de conversão de mm^3 para cm^3 ;

FD = Fator de diluição.

Posteriormente, o volume de cada um dos inóculos adicionados aos meios de cultivo foi determinado através da Equação 2:

$$\text{Volume de inóculo (mL)} = \frac{C_d * m_s}{C_i} \quad (2)$$

Sendo:

C_D = Concentração desejada de esporos (esporos/g);

C_i = Concentração da suspensão de inóculo (esporos/mL);

m_s = Massa de substrato usado como meio de cultivo (g).

3.6 PREPARO DO SUBSTRATO

Após coleta, o bagaço foi seco em estufa com recirculação de ar a 60 °C e armazenado em embalagens plásticas, ao abrigo de luz e calor, a fim de conservar suas características para os processos fermentativos, conforme descrito por Rodrigues (2021).

Para a condução das fermentações o bagaço de malte, previamente seco, foi peneirado em agitador de peneiras para análise granulométrica, sendo separadas as frações retidas nas peneiras de 10, 12 e 14 mesh, para avaliação da influência deste fator nos cultivos sólidos (Moura *et al.*, 2020; Santana 2021). Cada fração separada está representada na Figura 9:

FIGURA 9 - FRAÇÕES GRANULOMÉTRICAS DO BAGAÇO DE MALTE



FONTE: A autora (2025).

3.7 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para a síntese enzimática, *A. niger* e *T. asperellum* foram cultivados em meios sólidos empregando bagaço de malte como substrato. A umidade dos meios foi ajustada através da adição de uma solução de sais conforme descrito por Araújo (2018) e Rocha (2019), como condição ótima para produção de enzimas.

De conhecimento da umidade do bagaço de malte utilizado como substrato, a solução de umidificação, composta por sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L, foi preparada e a quantidade necessária para manutenção da umidade desejada foi calculada através da Equação 3:

$$m_{SU} = \frac{m_s * (U_D - U_s)}{(1 - U_D)} \quad (3)$$

Em que:

m_{SU} = Massa da solução de umidificação (g);

m_s = Massa de substrato usado como meio de cultivo (g);

U_D = Umidade desejada para o meio;

U_s = Umidade inicial do substrato.

Foram adicionados 10 gramas do bagaço de malte e a solução de umidificação em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em triplicatas. Os frascos foram fechados com tampões feitos de algodão, gaze e papel kraft e os meios de cultivo foram esterilizados por calor úmido sob pressão em autoclave durante 20 minutos, à temperatura de 121 °C. Após resfriamento natural, à temperatura ambiente, os meios foram inoculados utilizando pipeta automática com os volumes de inóculo correspondentes à concentração de 10^5 esporos por grama de meio de cultivo, sendo estes volumes calculados através da Equação 2. Os meios inoculados foram homogeneizados e incubados em estufa por tempo e temperatura de acordo com o delineamento experimental.

3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental para a fermentação em estado sólido baseou-se no modelo fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central, avaliando a influência da variação dos parâmetros granulometria, umidade e temperatura, em dois níveis +1 e -1, nas variáveis resposta atividade de amilases, atividade de CMCase e atividade de FPase, em $U.mL^{-1}$, conforme descrito na Tabela 3:

TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

Parâmetros	+1	-1
Umidade (%)	80	60
Granulometria (Mesh)	14	10
Temperatura (°C)	32	28

FONTE: A autora (2025).

Com base na variação destes 3 fatores, foram realizados 12 tratamentos, sendo 8 experimentos através da variação dos valores extremos dos parâmetros de fermentação em estado sólido e 4 experimentos com os valores dos pontos centrais. A matriz obtida para o planejamento experimental fatorial está representada na Tabela 4.

TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2^3 COM QUADRUPPLICATA DO PONTO CENTRAL PARA OS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Tratamento	Umidade (%)	Granulometria (Mesh)	Temperatura (°C)
1	60 (-1)	10 (-1)	28 (-1)
2	80 (+1)	14 (+1)	32 (+1)
3	60 (-1)	10 (-1)	32 (+1)
4	60 (-1)	14 (+1)	28 (-1)
5	60 (-1)	14 (+1)	32 (+1)
6	80 (+1)	10 (-1)	28 (-1)
7	80 (+1)	14 (+1)	28 (-1)
8	80 (+1)	10 (-1)	32 (+1)
9	70 (0)	12 (0)	30 (0)
10	70 (0)	12 (0)	30 (0)
11	70 (0)	12 (0)	30 (0)
12	70 (0)	12 (0)	30 (0)

FONTE: A autora (2025).

3.9 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Considerando os maiores teores de atividade enzimática para *A. niger* e *T. asperellum* sucedeu-se a fermentação em estado sólido para avaliação da cinética enzimática no decorrer de 168 horas.

A cinética enzimática foi determinada através da retirada de amostras em triplicatas a cada 24 horas até completar o período. Os parâmetros empregados na fermentação em estado sólido para cada microrganismo está disposto na Tabela 5:

TABELA 5 - PARÂMETROS PARA ENSAIOS DE CINÉTICA

Microrganismo	Umidade (%)	Granulometria (Mesh)	Temperatura (°C)
<i>A. niger</i>	80	10	28
<i>T. asperellum</i>	80	14	28

FONTE: A autora (2025).

3.10 EXTRAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO

A extração do caldo enzimático foi realizada conforme descrito por Rodrigues (2021). Após o tempo de fermentação, foram adicionados 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) às amostras. A extração sucedeu durante 20 minutos sob agitação em incubadora de agitação orbital (“shaker”) a 150 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com papel filtro qualitativo, obtendo-se o caldo enzimático. A fração sólida foi descartada e o caldo foi congelado para posterior determinação das atividades enzimáticas.

3.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas de amilases e das celulasas foram determinadas por meio da quantificação dos açúcares redutores liberados através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959).

3.11.1 Determinação da atividade da amilases

Para determinação da atividade de amilases foram adicionados a tubos de ensaio 0,2 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de amido solúvel 1% e incubados em banho termostático por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico, seguido de fervura a 100 °C por 10 min e desenvolvimento de cor marrom. Em seguida as amostras foram submetidas a banho de gelo e o volume final foi ajustado para 5 mL com água destilada. O branco do espectrofotômetro foi preparado substituindo o extrato enzimático por água destilada. Finalmente foi medida a absorbância a 540 nm com espectrofotômetro (Aiyer, 2004).

Para determinação das concentrações de açúcares redutores das amostras foi estabelecida uma curva de calibração de glicose. Na determinação da atividade enzimática, uma unidade (U) de amilase foi definida como a quantidade de enzima que libera um mol de açúcares redutores, medido como maltose por minuto nas condições do ensaio, conforme descrito por Miller (1959). A determinação da atividade de amilases sucedeu através da determinação de açúcares redutores pela Equação 4:

$$GRT = abs * f * d \quad (4)$$

Em que:

GRT = Grupos redutores totais;

abs = Média das absorbâncias lidas;

f = Fator de concentração obtido através do coeficiente angular da curva padrão;

d = Inverso da diluição da amostra.

E em seguida foi determinada a atividade amilásica em U.mL⁻¹ de acordo com a Equação 5:

$$Amilases \left(\frac{U}{mL} \right) = GRT \frac{V}{0,18 * t * V_e} \quad (5)$$

Considerando:

GRT = Grupos redutores totais;

V = Volume total do meio reacional (mL);

0,18 = Fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t = Tempo de reação (min);

Ve = Volume da enzima no meio de reação (mL).

3.11.2 Determinação da atividade de celulasas

A atividade de celulasas foi estimada em função da atividade de endoglucanases (Endo-1,4-β-Dglucanase) pelo método de carboximetilcelulasas (CMCases) e atividade de celulasas totais por meio do método do papel filtro

(FPases) segundo metodologia adaptada de Ghose (1987).

3.11.2.1 CMCases

Para determinação de endoglucanases a partir de CMCases foram adicionados 0,5 mL de carboximetilcelulose sódica a 2 % a tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato enzimático, e incubados a 50 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de reagente DNS e os tubos foram levados a um banho termostático a 100 °C por 5 minutos. Por fim, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, promovida a homogeneização e realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para o branco da reação foram adicionados 1,0 mL do reagente DNS a uma mistura de 0,5 mL de carboximetilcelulose sódica a 2 % com 0,5 mL do extrato enzimático obtido em 0 h do processo.

Para determinação da concentração de açúcares redutores, os valores obtidos nas leituras de absorbância foram comparados com uma curva padrão de glicose anteriormente estabelecida e calculados através da Equação 4, descrita anteriormente. Os resultados de atividade de endoglucanases (CMCases) foram expressos por U.mL⁻¹, e calculados de acordo com a Equação 6, considerando que uma unidade de atividade de endoglucanase equivale a 1 µmol de glicose liberado por minuto, nas condições do processo (Miller, 1959).

$$CMCases \left(\frac{U}{mL} \right) = GRT \frac{V}{0,18 * t * V_e} \quad (6)$$

Sendo:

GRT = Grupos redutores totais;

V = Volume total do meio reacional (mL);

0,18 = Fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t = Tempo de reação (min);

Ve = Volume da enzima no meio de reação (mL).

3.11.2.2 FPases

A quantificação da atividade de celulases totais foi realizada de acordo com

adaptação da metodologia de FPases proposta por Ghose (1987). Para isso, foi empregado papel de filtro qualitativo de celulose cortado em tiras medindo 1x6 cm. As tiras foram colocadas em tubos de ensaio, adicionados 0,5 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 5,0) e 0,5 mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50 °C durante 60 minutos, para promover a reação enzimática. Posteriormente, foram retirados 0,5 mL da mistura reacional e adicionados a tubos de ensaio contendo 0,5 mL do reagente DNS. Estes seguiram para banho termostático a 100 °C durante 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo para interromper a reação, foram acrescentados 4 mL de água destilada aos tubos e as amostras foram homogeneizadas. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm para determinação dos açúcares redutores.

O branco da reação foi preparado utilizando 0,5 mL do tampão citrato 0,05 M (pH 5,0) e 0,5 mL do extrato enzimático obtidos em 0 h de processo. Foi estabelecida curva padrão de glicose seguindo a mesma metodologia a fim de comparar os valores obtidos nas leituras de absorbância para determinação das concentrações de açúcares redutores. No ensaio uma unidade de atividade de celulase (FPases) é definida pela produção de 1 µmol de glicose por minuto (0,18 mg de glicose por minuto), nas condições de processo, sendo expressa por U.mL⁻¹ (Miller, 1959) conforme a Equação 7:

$$FPases \left(\frac{U}{mL} \right) = GRT \frac{V}{0,18 * t * V_e} \quad (7)$$

Em que:

GRT = Grupos redutores totais;

V = Volume total do meio reacional (mL);

0,18 = Fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t = Tempo de reação (min);

V_e = Volume da enzima no meio de reação (mL).

3.12 AVALIAÇÃO DOS DADOS ESTATÍSTICOS

O *software* STATISTICA (versão 10) foi empregado para determinar o efeito

das variáveis independentes, e o efeito de suas interações através do cálculo dos coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA), bem como, para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e Pareto.

4 DISCUSSÕES E RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE

Após a coleta foram realizadas análises para caracterização do bagaço de malte utilizado no estudo, os resultados estão apresentados na Tabela 6. Em seguida, o material foi seco em estufa e armazenado em local seco ao abrigo de luz e calor, a fim de conservar suas características.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE

Análises	Resultados	Qin, Johansen e Mussato (2018)	Polastri <i>et al.</i> (2023)	Caetano <i>et al.</i> (2018)	Ferreira <i>et al.</i> (2020)	Rêgo e Brito (2021)
Matéria Orgânica (%)	96,58 ± 0,30	-	-	91,84	-	-
Carbono (%)	48,29 ± 0,15	-	45,71 ± 1,07	-	-	-
Nitrogênio (%)	1,70 ± 0,01	-	3,65 ± 0,21	0,36	-	-
Proteína (%)	10,62 ± 0,08	22,44 ± 2,70	-	-	14,13 ± 0,08	-
Lipídios (%)	8,42 ± 0,11	5,30 ± 0,18	-	-	-	-
Carboidratos (%)	56,00	46,52	-	-	-	-
Umidade (%)	25,40 ± 0,41	-	-	-	83,00 ± 0,72	-
Cinzas (%)	2,56 ± 0,06	3,54 ± 0,02	-	-	3,17 ± 0,02	-
pH	4,73 ± 0,05	-	-	-	-	5,11

FONTE: A autora (2025).

O bagaço de malte caracteriza-se como um resíduo ou subproduto sólido proveniente do processamento da cerveja, com elevado teor de umidade e rico em matéria orgânica. O resíduo empregado no estudo demonstrou teor de umidade de $25,40 \pm 0,41$ %, e $96,58 \pm 0,30$ % de matéria orgânica. Comparativamente, Caetano *et al.* (2018) observaram teor de matéria orgânica de 91,84 %. Por outro lado, Ferreira *et al.* (2020) demonstraram teor de umidade de $83,00 \pm 0,72$ %, valor superior ao encontrado neste estudo, possivelmente em função do acondicionamento do mesmo na fábrica na qual o resíduo foi coletado.

Com relação ao teor de cinza, os valores encontrados se assemelham ao disposto na literatura. Ferreira *et al.* (2020) observaram $3,17 \pm 0,02$ % enquanto no estudo foi de $2,56 \pm 0,06$ %.

Conforme observado por Chimini *et al.* (2020), em sistemas como a fermentação em estado sólido empregando bagaço de malte como substrato para cultivos fúngicos, carbono e nitrogênio, principais componentes da matéria orgânica, são essenciais para o crescimento e a produtividade dos microrganismos. O carbono é fundamental para o fornecimento de energia e estruturação dos compostos

orgânicos, enquanto o nitrogênio é crucial para a formação de proteínas e ácidos nucleicos. Com relação aos teores de carbono e nitrogênio foram observados valores de $48,29 \pm 0,15$ % e $1,70 \pm 0,01$ % respectivamente, que são próximos aos valores observados por Polastri *et al.* (2023), $45,71 \pm 1,07$ % de carbono e $3,65 \pm 0,21$ % de nitrogênio, e são superiores, quando comparados aos valores encontrados por Chimini *et al.* (2020) com teor de 10 % de carbono e 0,77 % de nitrogênio.

O teor de proteína de $10,62 \pm 0,08$ %, apresentou-se inferior ao observado por Pinheiro *et al.* (2019) e Massardi, Massini e De-Jesus-Silva (2020), que obtiveram resultados de $14,3 \pm 0,9$ %, e 21,16 %, respectivamente. Enquanto o teor de lipídios de $8,42 \pm 0,11$ %, demonstrou-se moderadamente superior ao observado por Qin, Johansen e Mussato (2018) que verificaram teor de $5,30 \pm 0,18$ %. Os carboidratos, obtidos por diferença, ficaram em 56,00%, semelhante ao observado por Qin, Johansen e Mussato (2018) de 46,52 %.

No estudo realizado por Rêgo; Brito (2021) durante caracterização da farinha de malte obtida pela secagem e moagem do bagaço de malte foi observado pH de 5,11, valor discretamente maior do que o encontrado nesta pesquisa, correspondente a $4,73 \pm 0,05$ %. O pH ótimo para o crescimento de *T. asperellum* e *A. niger* pode variar ligeiramente dependendo da cepa e das condições específicas do cultivo, mas, de acordo com Pereira e Silva (2018) o pH ótimo para o crescimento de *T. asperellum* é geralmente entre pH 4,5 a 7,5. Ele se adapta bem a condições levemente ácidas, sendo que pH em torno de 5,5 a 6,5 é considerado ideal para muitas cepas. Já o *A. niger* tende a se desenvolver em pH mais ácido, com um intervalo ótimo de pH 4,0 a 6,0, sendo pH em torno de 5,0 ideal para seu crescimento e produção de enzimas como amilases e celulases.

De acordo com Massardi, Massini e De-Jesus-Silva (2020) e Mussatto (2014), a composição do bagaço de malte pode variar consideravelmente em decorrência de diversos fatores, dentre eles, o clima de cultivo e tempo de colheita, que podem impactar na disponibilidade de carbono e nutrientes, e a variedade da cevada, que pode conferir características distintas à composição do bagaço. O processo de malteação, por sua vez, pode alterar a estrutura dos carboidratos presentes no grão, já o processo cervejeiro do mosto, em função da eficiência da extração de açúcares, impacta diretamente nos compostos remanescentes. Esses fatores explicam as pequenas variações observadas frente aos dados encontrados na literatura, que indicam que a composição do bagaço de malte não é homogênea e pode ser

influenciada por condições específicas tanto de cultivo quanto de processamento.

4.2 OBTENÇÃO DE AMILASES E CELULASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR *A. niger*

Através da fermentação em estado sólido do bagaço de malte, em diferentes condições de granulometria, temperatura e umidade, inoculado com *A. niger*, foi possível avaliar a produção de amilases e celulasas, conforme disposto na Tabela 7.

TABELA 7 - SÍNTESE DE AMILASES E CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADA COM *A. niger* EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³ COM QUADRUPPLICATAS DO PONTO CENTRAL

Tratamento	Amilases (U.mL ⁻¹)	Celulasas (U.mL ⁻¹)	
		CMCases	FPases
1 (60%, 10 mesh, 28 °C)	44,24 ± 6,88	14,33 ± 0,42	33,68 ± 1,39
2 (80%, 14 mesh, 32 °C)	29,17 ± 4,13	19,25 ± 1,53	15,68 ± 1,39
3 (60%, 10 mesh, 32 °C)	77,33 ± 4,82	11,63 ± 0,05	28,64 ± 2,21
4 (60%, 14 mesh, 28 °C)	40,65 ± 2,75	7,02 ± 0,46	17,66 ± 0,59
5 (60%, 14 mesh, 32 °C)	44,65 ± 0,69	18,23 ± 0,21	15,19 ± 1,30
6 (80%, 10 mesh, 28 °C)	87,01 ± 2,06	12,67 ± 0,75	30,44 ± 0,82
7 (80%, 14 mesh, 28 °C)	68,25 ± 2,06	22,74 ± 0,71	17,47 ± 0,55
8 (80%, 10 mesh, 32 °C)	36,69 ± 1,38	15,71 ± 0,56	27,08 ± 0,80
9 (70%, 12 mesh, 30 °C)	70,59 ± 1,38	26,72 ± 0,45	32,58 ± 2,08
10 (70%, 12 mesh, 30 °C)	69,21 ± 2,75	24,24 ± 0,43	29,41 ± 1,85
11 (70%, 12 mesh, 30 °C)	27,24 ± 0,69	23,10 ± 0,34	28,00 ± 2,08
12 (70%, 12 mesh, 30 °C)	42,38 ± 4,82	23,98 ± 0,92	28,56 ± 0,17

FONTE: A autora (2025).

As melhores condições de ensaio para amilases foram observadas no tratamento 6, empregando 80% de umidade, 10 mesh de granulometria e 28 °C de temperatura, com resultado de 87,01 ± 2,06 U.mL⁻¹, conforme descrito na Tabela 6. Adicionalmente, valores relevantes foram obtidos para os tratamentos 3 (77,33 ± 4,82 U.mL⁻¹), 7 (68,25 ± 2,06 U.mL⁻¹), 9 (70,59 ± 1,38 U.mL⁻¹), e 10 (69,21 ± 2,75 U.mL⁻¹). Nesse aspecto, evidencia-se que os diferentes níveis (+1 e -1) empregados para os fatores granulometria, temperatura e umidade, quando analisadas isoladamente, não apresentaram efeitos relevantes para a produção da enzima.

Além disso, comparando as repetições do ponto central, foi possível verificar variação entre ensaios empregando os mesmos fatores. Tal fato foi também observado visualmente nos cultivos, como nos tratamentos 11 e 12, em que o crescimento do fungo, além de mais lento, se mostrou menos expressivo.

Os menores valores obtidos na síntese de amilases foram observados para os ensaios 11 ($27,24 \pm 0,69 \text{ U.mL}^{-1}$) e 2 ($29,17 \pm 4,13 \text{ U.mL}^{-1}$). Os tratamentos 9, 10, 11 e 12 contemplam as repetições do ponto central, tendo as fermentações decorrido a 30°C , com granulometria de 12 mesh e teor de umidade em 70%. Os tratamentos 9 e 10, apresentaram semelhança entre as atividades de amilases, no entanto, diferem dos tratamentos 11 e 12, cujos valores foram substancialmente menores.

A produção de celulases fúngicas foi verificada através da atividade de endoglucanases (CMCases) e atividade de celulases totais (FPases). Os resultados mais expressivos referente a CMCases foram observados nos tratamentos 9, 10, 11 e 12, inerentes às repetições no ponto central, variando entre $23,10 \pm 0,34 \text{ U.mL}^{-1}$ e $26,72 \pm 0,45 \text{ U.mL}^{-1}$.

Os menores valores observados para CMCases foram dos tratamentos 1 ($14,33 \pm 0,42 \text{ U.mL}^{-1}$), 3 ($11,63 \pm 0,05 \text{ U.mL}^{-1}$), 4 ($7,02 \pm 0,46 \text{ U.mL}^{-1}$) e 6 ($12,67 \pm 0,75 \text{ U.mL}^{-1}$). Comparando os tratamentos observa-se uma tendência menor de síntese enzimática para os processos que utilizaram teor de umidade de 60% e temperatura de 28°C , como ocorre no tratamento 4, ou ainda empregando algum desses fatores associado a granulometria de 10 mesh como ocorre nos tratamentos 3 e 8.

Para FPases, além das repetições no ponto central, os tratamentos 1 ($33,68 \pm 1,39 \text{ U.mL}^{-1}$), 3 ($28,64 \pm 2,21 \text{ U.mL}^{-1}$) e 6 ($30,44 \pm 0,82 \text{ U.mL}^{-1}$) também demonstraram valores superiores a $28,00 \pm 2,08 \text{ U.mL}^{-1}$.

Considerando os tratamentos, evidencia-se forte influência da umidade em relação ao desenvolvimento das enzimas celulolíticas. A produção dessas enzimas demonstrou excelentes resultados tanto para CMCases quanto para FPases em 70% de umidade. No entanto, a produção de endoglucanases também é favorecida a 80%, enquanto a expressão de enzimas do complexo é propiciada em teor de 60% de umidade. Possivelmente, isso se deve em função da fisiologia do microrganismo em resposta às variações de umidade do meio.

O efeito da granulometria foi observado frente aos menores valores obtidos para FPases nos tratamentos 2 ($15,68 \pm 1,39 \text{ U.mL}^{-1}$), 4 ($17,66 \pm 0,59 \text{ U.mL}^{-1}$), 5 ($15,19 \pm 1,30 \text{ U.mL}^{-1}$), e 7 ($17,47 \pm 0,55 \text{ U.mL}^{-1}$). Nesses tratamentos a granulometria empregada foi de 14 mesh, fator que pode ter favorecido a compactação do meio, redução da aeração e conseqüente diminuição das reações bioquímicas essenciais ao desenvolvimento de microrganismos.

4.2.1 Avaliação estatística da produção enzimática utilizando *A. niger*

Os dados obtidos por meio do delineamento experimental fatorial 2^3 foram inicialmente submetidos à ANOVA e à análise de regressão, com o objetivo de identificar os fatores que influenciam significativamente as variáveis resposta, amilases, CMCases e FPases, bem como, de verificar a existência de interações estatisticamente relevantes entre eles. Adicionalmente, foram ajustados modelos matemáticos capazes de quantificar as relações entre os fatores investigados e as variáveis respostas.

Em etapa subsequente, com a inclusão das quadruplicatas do ponto central, foram conduzidas novas análises de variância visando à detecção de falta de ajuste e à avaliação da presença de curvatura nos modelos propostos.

4.2.1.1 Síntese de amilases por *A. niger*

Os resultados para a ANOVA, considerando amilases de *A. niger* como variável resposta, estão apresentados na Tabela 1, Apêndice 2. As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis podem ser observadas na Tabela 8, bem como, os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo R^2 com um nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 8 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>57,2483</i>	<i>0,743236</i>
<i>Umidade (1)</i>	<i>0,017489</i>	<i>-3,9383</i>	<i>1,486472</i>
<i>Granulometria (2)</i>	<i>0,000051</i>	<i>-8,1367</i>	<i>1,486472</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>0,000000</i>	<i>-20,5767</i>	<i>1,486472</i>
<i>1*2</i>	<i>0,003924</i>	<i>-5,0050</i>	<i>1,486472</i>
<i>1*3</i>	<i>0,000000</i>	<i>-24,1183</i>	<i>1,486472</i>
<i>2*3</i>	<i>0,000001</i>	<i>-11,9633</i>	<i>1,486472</i>
<i>1*2*3</i>	<i>0,000000</i>	<i>17,5817</i>	<i>1,486472</i>

$R^2 = 0,98$.

FONTE: A autora (2025).

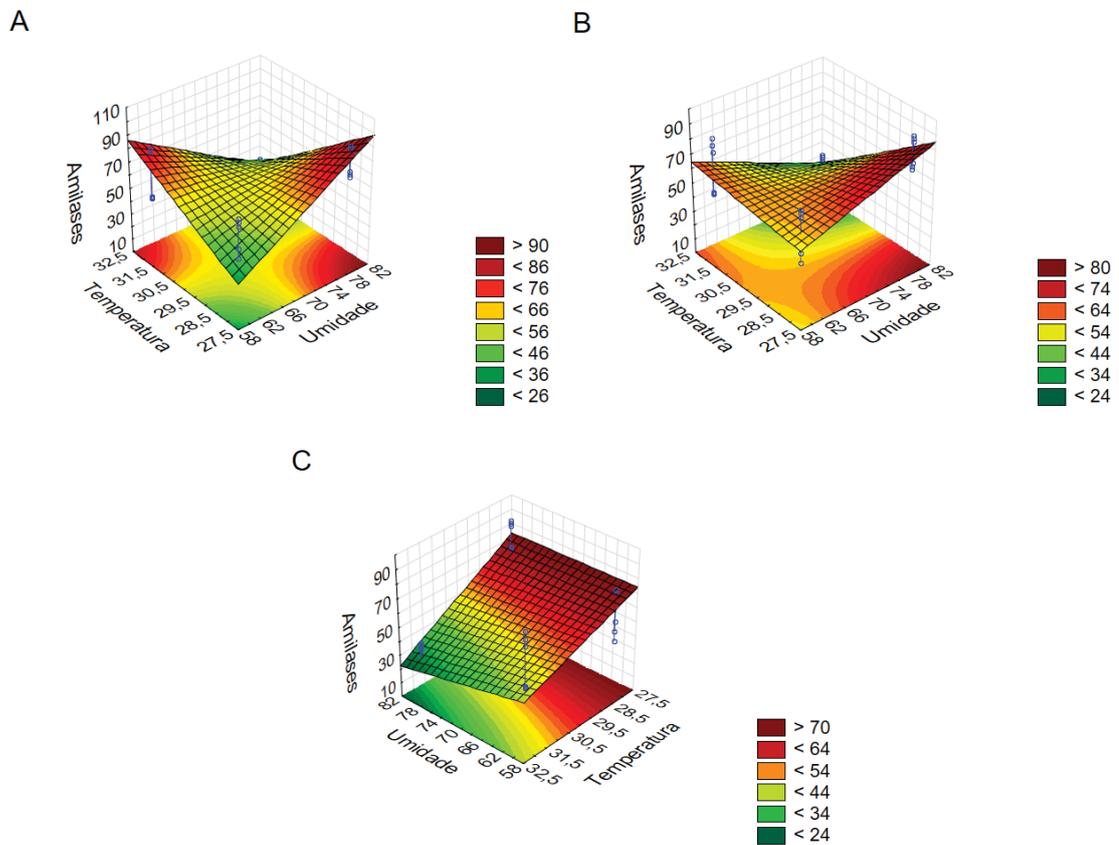
A análise estatística dos dados experimentais, obtidos a partir do delineamento fatorial 2^3 , revelou um modelo significativo e bem ajustado, com coeficiente de

determinação $R^2=0,98$. Isso indica que 98% da variabilidade observada na variável resposta é explicada pelos fatores e interações incluídos no modelo. O valor de R^2 próximo de 1 indica que o modelo é adequado para descrever o comportamento do sistema estudado e fornece uma base sólida para inferências e previsões.

Todos os efeitos principais (umidade, granulometria e temperatura) apresentaram significância estatística ($p<0,05$), evidenciando influência direta sobre a variável resposta. Dentre eles, a temperatura destacou-se como o fator de maior impacto negativo (coeficiente = $-20,58$ e $p<0,0001$), sugerindo que o aumento da temperatura dentro da faixa estudada compromete significativamente a atividade enzimática avaliada. A granulometria também apresentou efeito negativo expressivo (coeficiente = $-8,14$), indicando que a redução da granulometria, associada ao aumento da área superficial do substrato, afeta de maneira adversa a resposta. A umidade, embora com menor magnitude (coeficiente = $-3,94$), também demonstrou impacto significativo, apontando para um limite crítico na quantidade de água disponível no meio.

As interações de segunda ordem entre os fatores também foram estatisticamente significativas, demonstrando que os efeitos combinados entre os pares de variáveis não são aditivos, mas interdependentes. A interação entre umidade e temperatura, por exemplo, apresentou o maior coeficiente negativo (coeficiente = $-24,12$), sugerindo que a presença simultânea de altos níveis desses dois fatores resulta em uma redução ainda mais acentuada da resposta, além do que seria previsto pelos seus efeitos individuais, conforme pode ser observado na Figura 10, em A) 10 mesh, B) 12 mesh e C) 14 mesh.

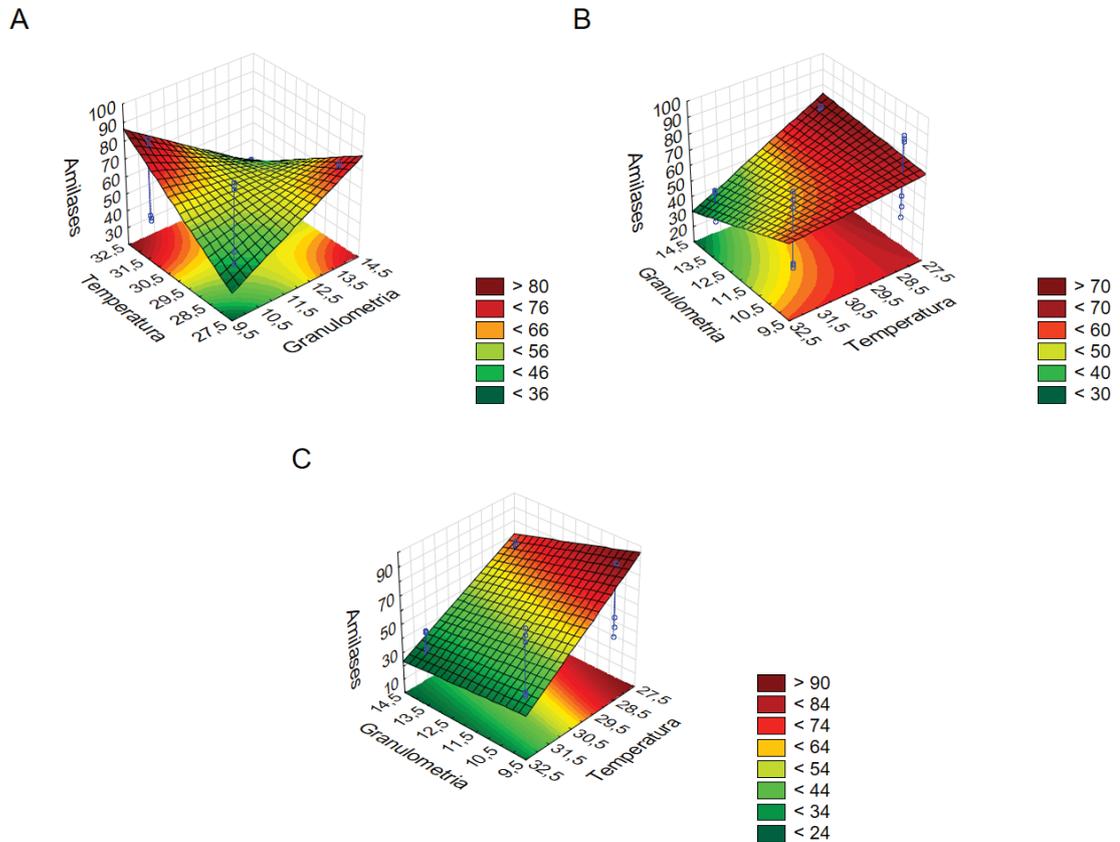
FIGURA 10 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*



FONTE: A autora (2025).

A interação entre granulometria e temperatura (coeficiente = $-11,96$) reforça a sensibilidade da variável resposta às alterações térmicas quando combinadas a mudanças na estrutura física do substrato de acordo com o disposto nas superfícies de resposta nas imagens A) 60%, B) 70% e C) 80% da Figura 11.

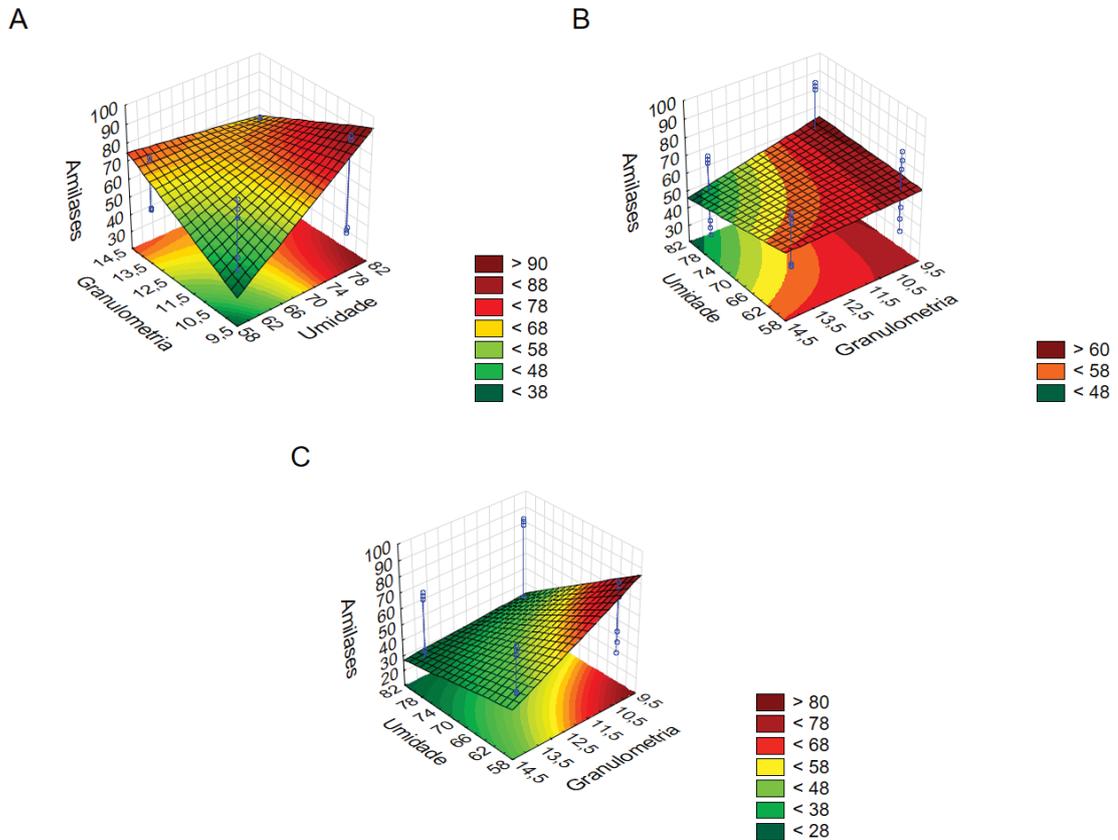
FIGURA 11 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*



FONTE: A autora (2025).

Já a interação entre umidade e granulometria, embora com menor intensidade (coeficiente = $-5,01$), também se mostrou relevante para o comportamento do sistema, segundo o disposto na Figura 12, imagens A) 28 °C, B) 30 °C e C) 32 °C.

FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*



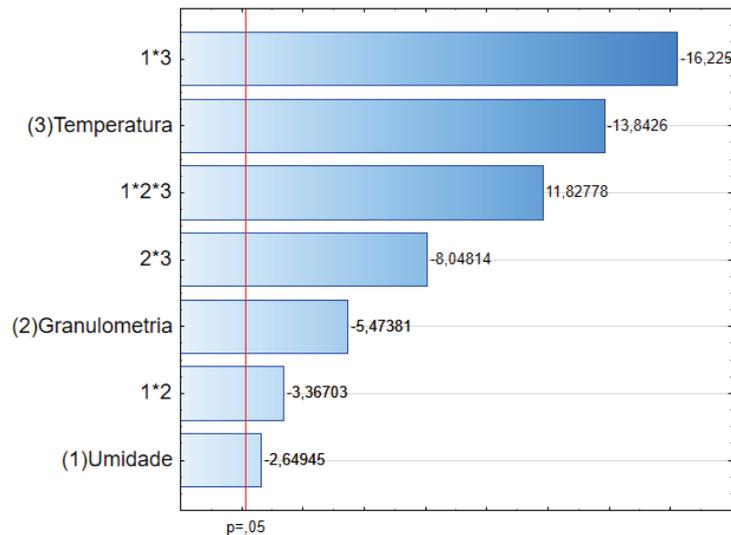
FONTE: A autora (2025).

Destaca-se, ainda, a presença de uma interação de terceira ordem estatisticamente significativa e com coeficiente positivo (coeficiente = 17,58 e $p < 0,0001$). Esse resultado indica que, embora os efeitos principais e as interações duplas sejam predominantemente negativos, a combinação simultânea dos três fatores pode atenuar tais efeitos, revelando uma possível sinergia em determinados níveis experimentais. Tal comportamento sugere a existência de uma região de operação em que os efeitos adversos dos fatores são minimizados, o que é de grande relevância para fins de otimização.

Além disso, o baixo erro padrão associado aos coeficientes (Erro=1,49) e os baixos valores de p-valor corroboram a confiabilidade estatística dos parâmetros estimados. Esses resultados indicam que o modelo obtido não apenas descreve com precisão a variabilidade dos dados experimentais, mas também fornece uma base robusta para a proposição de estratégias de melhoria e controle do processo avaliado.

O nível de significância relativo a esses dados também foi observado através do gráfico de Pareto representado na Figura 13. Nele, os valores que se encontram à direita da linha vermelha, demonstram significância.

FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE AMILASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

Os coeficientes negativos observados no Diagrama de Pareto dos fatores individuais e interações duplas demonstram que quanto menor a granulometria, temperatura e umidade maior a síntese de amilase. No entanto, de acordo com a literatura valores inferiores aos investigados nessa pesquisa afetam o desenvolvimento microbiano, especialmente considerando que baixos índices de umidade comprometem a dissolução e transferência de nutrientes e oxigênio, temperaturas mais baixas inibem o crescimento, e meios muito empacotados dificultam o fornecimento de nutrientes, trocas térmicas e oxigenação do meio, além de apresentar significativa redução na superfície de contato, acarretando também em um baixo crescimento do microrganismo (Mitchell; Berovic; Krieger, 2006; Lonsane *et al.*, 1985; Schmidell *et al.*, 2021),

A análise dos coeficientes da regressão, associada ao gráfico de Pareto, confirma a influência dos parâmetros observados experimentalmente. A partir dos dados, foi possível determinar a equação do modelo, considerando as variáveis reais, conforme disposto na Equação 8:

$$\text{Amilases} = -7198,12 + 98,51U + 513,11G + 239,62T - 6,72U * G - 3,24U * T - 16,88G * T + 0,22U * G * T \quad (8)$$

Sendo:

U = Umidade

G = Granulometria

T = Temperatura

Adicionalmente, optou-se por realizar uma análise de regressão linear múltipla com o intuito de aprofundar a compreensão sobre os fatores que influenciam a atividade de amilases. A Tabela 9 apresenta os resultados da ANOVA associada ao modelo ajustado:

TABELA 9 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
Regressão	3030,69	3	1010,23	3,08	0,051
Resíduo	6566,00	20	328,30		
Total	9596,69				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R²=0,3158

FONTE: A autora (2025).

Considerando o exposto, pode-se observar que o modelo de regressão explica apenas 31,58% da variabilidade total da atividade de amilases. Além disso, a estatística F de 3,08, associada a um valor-p de 0,051, sugere que o modelo está marginalmente fora do nível tradicional de significância estatística de 5%. No entanto, a proximidade desse valor ao limiar crítico pode indicar uma tendência estatística relevante. Demonstrando que as variáveis temperatura, umidade e granulometria, podem exercer influência sobre a variável dependente, embora essa relação não seja estatisticamente significativa ao nível de 5%.

Desse modo, para aprimorar a avaliação do erro e da falta de ajuste do modelo, ou ainda, identificar a presença de curvatura na superfície de resposta, procedeu-se com a ANOVA considerando o planejamento experimental 2³ com quadruplicatas no ponto central, conforme disposto na Tabela 1 do Apêndice 3.

A análise de falta de ajuste não revelou problemas significativos no modelo (p > 0,05), sugerindo que o modelo linear ajustado é adequado para descrever os dados

observados. Além disso, as interações indicam que o efeito de uma variável sobre a atividade de amilases depende dos níveis das outras variáveis, bem como, de outras variáveis que não estão sendo consideradas pelo modelo, destacando a complexidade do processo e a necessidade de considerar combinações específicas de condições para otimizar a produção enzimática por meio da fermentação em estado sólido.

4.2.1.2 Síntese de CMCases por *A. niger*

Os efeitos relacionados à síntese de celulases (CMCases) estão detalhados na Tabela 10, acompanhados dos respectivos valores de erro padrão, p-valor, coeficientes das variáveis do modelo e coeficiente de determinação (R^2), considerando um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Os valores destacados em itálico indicam efeitos estatisticamente significativos, com intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05). Para uma análise mais aprofundada, os resultados da ANOVA, considerando a atividade de CMCases de *A. niger* como variável resposta, estão disponíveis na Tabela 2 do Apêndice 2.

TABELA 10 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	p-valor	Coeficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>15,19750</i>	<i>0,147066</i>
<i>Umidade (1)</i>	<i>0,000000</i>	<i>4,79167</i>	<i>0,294131</i>
Granulometria (2)	0,000000	3,22500	0,294131
Temperatura (3)	0,000004	2,01500	0,294131
1*2	0,000000	3,57833	0,294131
1*3	0,000001	-2,24167	0,294131
2*3	0,000011	1,84833	0,294131
1*2*3	<i>0,000000</i>	<i>-5,11167</i>	<i>0,294131</i>

$R^2 = 0,98$.

FONTE: A autora (2025).

As estimativas dos efeitos observados para umidade, granulometria e temperatura na produção de celulases (CMCases) por fermentação em estado sólido revelou resultados estatisticamente significativos para todos os fatores e interações investigados, com valores-p inferiores ao nível de significância adotado ($\alpha = 0,05$).

A estimativa dos efeitos mostra que o intercepto é altamente significativo ($p < 0,0001$), com um valor estimado de 15,20.

O fator umidade apresentou coeficiente positivo de 4,79, indicando que, aumentos na umidade, mantendo os outros fatores constantes, resultam em aumentos na produção de celulases. Esse efeito positivo pode ser atribuído à maior disponibilidade de água para o microrganismo, o que propicia as atividades metabólicas e, conseqüentemente, a síntese e atividade enzimática. No entanto, é importante ressaltar que níveis excessivos de umidade podem levar à diminuição da porosidade do substrato, dificultando as trocas gasosas e a difusão de oxigênio, o que pode prejudicar o crescimento microbiano e conseqüentemente a produção enzimática (Lonsane *et al.*, 1985; Schmidell *et al.*, 2021).

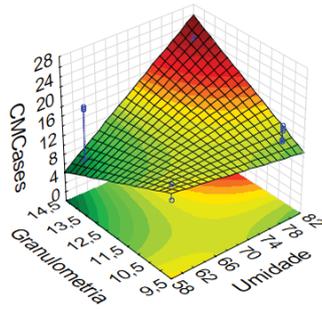
A granulometria apresentou coeficiente de 3,22, sugerindo que a redução do tamanho das partículas do substrato favorece a produção de celulases. Partículas menores aumentam a área superficial disponível para o microrganismo, facilitando a penetração de água e nutrientes, promovendo um ambiente mais propício para a atividade enzimática. Além disso, a diminuição do tamanho das partículas pode melhorar a homogeneidade do substrato, contribuindo para um crescimento microbiano mais uniforme e eficiente (Schmidell *et al.*, 2021).

O fator temperatura apresentou coeficiente de 2,01, indicando que o aumento da temperatura dentro dos níveis estudados favorece a produção de celulases. Temperaturas mais elevadas podem acelerar as reações metabólicas do microrganismo, aumentando sua taxa de crescimento e produção enzimática. No entanto, temperaturas excessivas podem inibir a atividade enzimática ou até mesmo levar à morte celular, devendo ser criteriosamente controlados (Schmidell *et al.*, 2021).

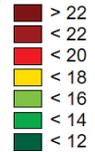
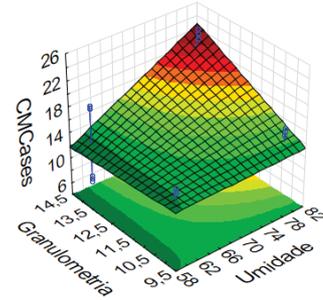
As interações entre os fatores também apresentaram efeitos significativos. A interação entre granulometria e umidade, com coeficiente de 3,58, sugere que combinações específicas de níveis desses fatores resultam em um efeito sinérgico, potencializando a produção de celulases conforme pode ser observado nas superfícies de respostas dispostas na Figura 14, imagens A) 28 °C, B) 30 °C e C) 32 °C.

FIGURA 14 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*

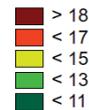
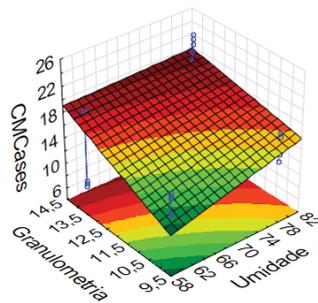
A



B



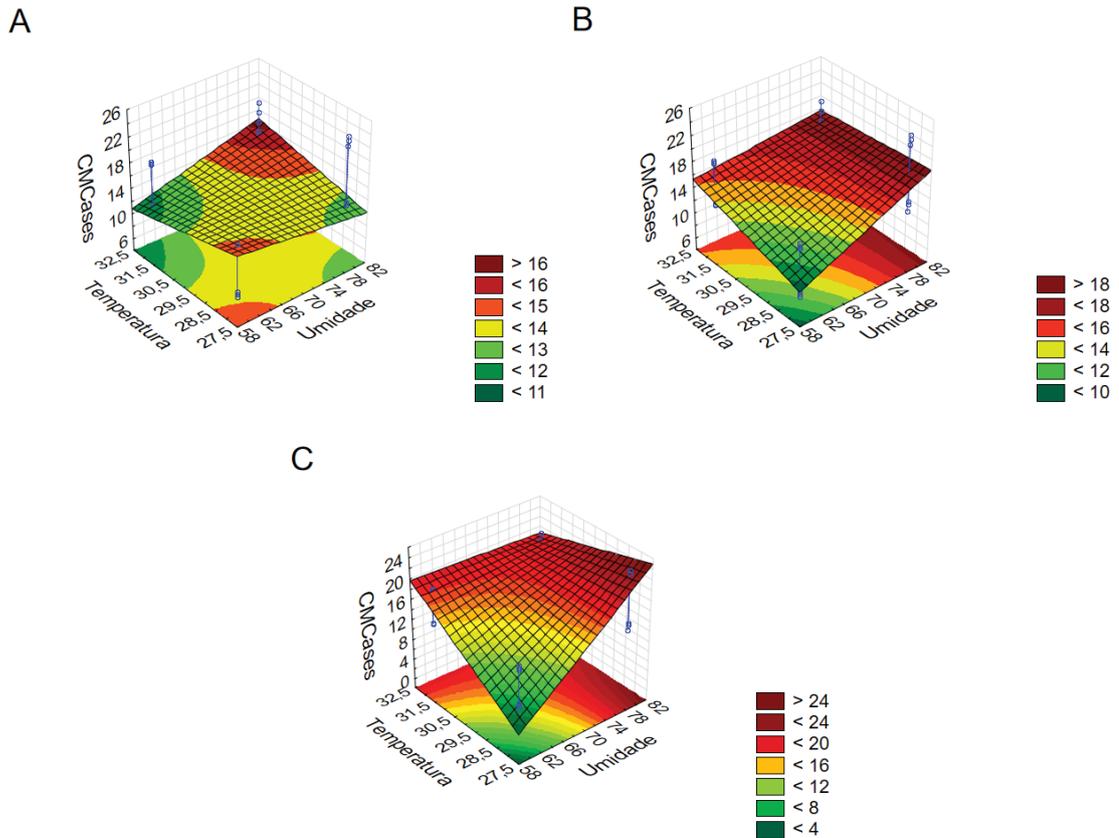
C



FONTE: A autora (2025).

A interação significativa entre umidade e temperatura apresentou coeficiente negativo (-2,24), indicando dependência entre os efeitos envolvidos na produção de celulases, conforme verificado nas superfícies de resposta dispostas nas imagens A) 10 mesh, B) 12 mesh e C) 14 mesh, Figura 15.

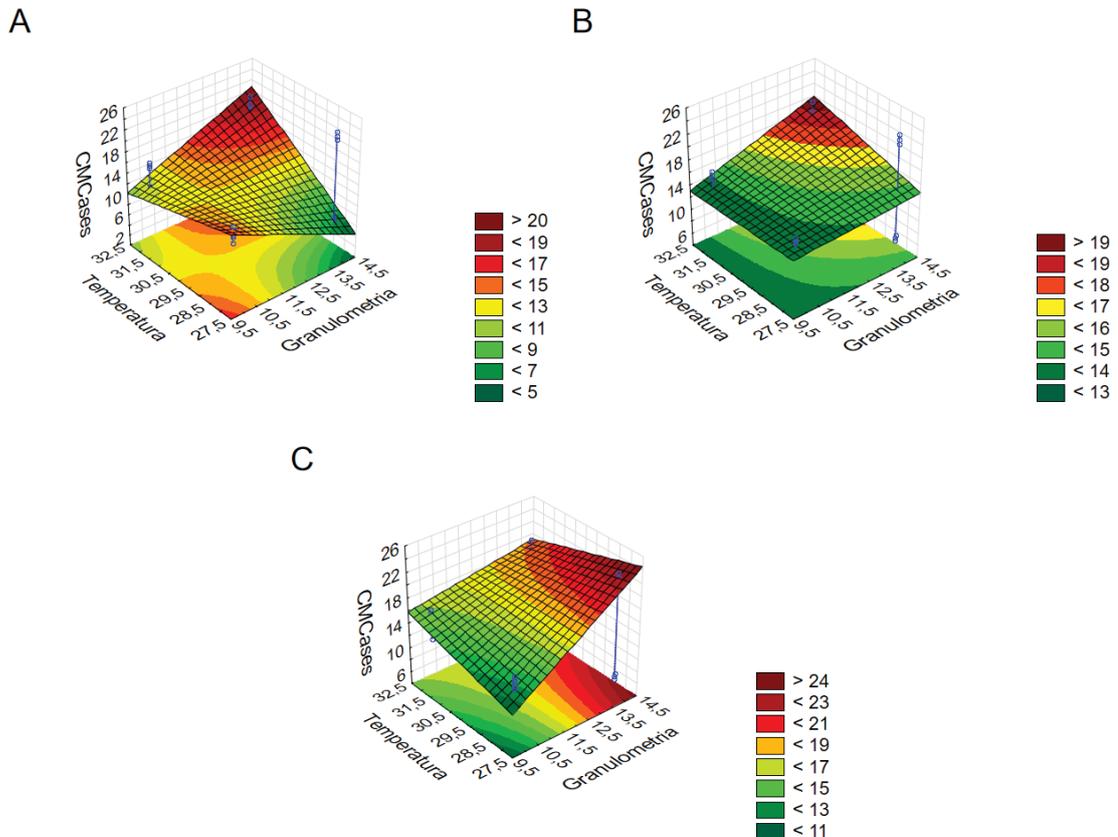
FIGURA 15 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*



FONTE: A autora (2025).

A interação de granulometria e temperatura, com coeficiente de aproximadamente 1,85, sugere que a combinação influencia positivamente a produção de celulasas, sendo mais eficaz nos mais altos níveis de ambos os fatores, em concordância com o disposto na Figura 16, imagens A) 60%, B) 70% e C) 80%.

FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE CMCases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*

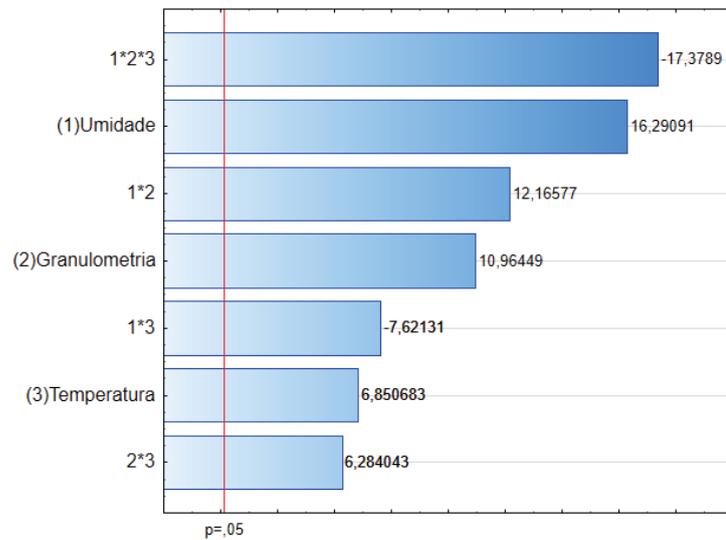


FONTE: A autora (2025).

Para além, a interação tripla dos fatores apresentou coeficiente de -5,11, sugerindo que combinações específicas de granulometria, umidade e temperatura podem prejudicar a produção de celulases. Tal fato, enfatiza a complexidade do processo, demonstrando a necessidade de avaliar e identificar os melhores parâmetros a fim de otimizar a síntese enzimática.

O nível de significância dos fatores e interações podem também ser observados através do gráfico de Pareto (Figura 17), o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 17 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE CMCases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

A partir da estimativa dos efeitos da variância obteve-se a equação do modelo proposto, conforme demonstrado pela Equação 9, considerando as variáveis reais:

$$CMCases = 1624,44 - 22,15U - 146,57G - 52,018T + 2U * G + 0,71U * T + 4,70G * T - 0,06U * G * T \quad (9)$$

Em que:

U = Umidade

G = Granulometria

T = Temperatura

Posteriormente, foi realizada análise de regressão linear para a atividade de CMCases considerando os dados referentes ao planejamento experimental 2^3 , conforme apresentado na Tabela 11.

TABELA 11 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>224,5255</i>	<i>3</i>	<i>74,84184</i>	<i>5,116423</i>	<i>0,008658</i>
Resíduo	292,5553	20	14,62777		
Total	517,0808				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R²=0,43

FONTE: A autora (2025).

O modelo de regressão demonstrou-se estatisticamente significativo no nível de 95% de confiança (p < 0,05). No entanto, o valor do R² foi de 0,43 indicando que o modelo explica apenas 43% da variação nos dados. Diante disso, sucedeu-se com a análise ANOVA levando em consideração o planejamento experimental 2³ com quadruplicatas no ponto central, a fim de verificar a presença de curvatura, ou falta de ajuste dos dados. Os valores estão representados na Tabela 2 do Apêndice 3.

A adoção de um modelo considerando curvatura mostrou-se mais adequada para representar a atividade de CMCases no processo de fermentação em estado sólido, demonstrando R² de 0,97. A significância estatística do termo de curvatura (p < 0,05) observada na Tabela 2 do Apêndice 3 indica que a relação entre os fatores umidade, granulometria e temperatura frente a atividade de CMCases é não linear, revelando a presença de um ponto ótimo dentro da faixa experimental avaliada. Além disso, as interações de segunda e terceira ordem também se mostraram significativas, demonstrando que o efeito de um fator depende dos níveis dos demais.

Como modelos lineares não consideram curvaturas nem interações complexas, sua aplicação resulta em baixo poder preditivo e menor explicação da variabilidade dos dados. Nesse contexto, o modelo quadrático ajustado permite uma descrição mais precisa do comportamento do sistema.

4.2.1.3 Síntese de FPases por *A. niger*

Os resultados da ANOVA, referente aos resultados observados para FPases de *A. niger*, estão apresentados na Tabela 3, no Apêndice 2.

As estimativas dos efeitos principais e das interações entre as variáveis podem ser verificadas na Tabela 12, juntamente com os valores do erro padrão, p-valor, coeficientes das variáveis no modelo e o coeficiente de determinação (R²), com um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Os efeitos significativos, com p-valor inferior a 0,05,

estão destacados em itálico, indicando que esses efeitos são relevantes dentro do intervalo de confiança de 95%.

TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES DETERMINADOS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³

Fator	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>23,2313</i>	<i>0,254115</i>
<i>Umidade (1)</i>	<i>0,041600</i>	<i>-1,1258</i>	<i>0,508229</i>
<i>Granulometria (2)</i>	<i>0,000000</i>	<i>-13,4608</i>	<i>0,508229</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>0,000012</i>	<i>-3,1642</i>	<i>0,508229</i>
<i>1*2</i>	<i>0,023340</i>	<i>1,2742</i>	<i>0,508229</i>
<i>1*3</i>	<i>0,262066</i>	<i>0,5908</i>	<i>0,508229</i>
<i>2*3</i>	<i>0,057701</i>	<i>1,0392</i>	<i>0,508229</i>
<i>1*2*3</i>	<i>0,630602</i>	<i>-0,2492</i>	<i>0,508229</i>

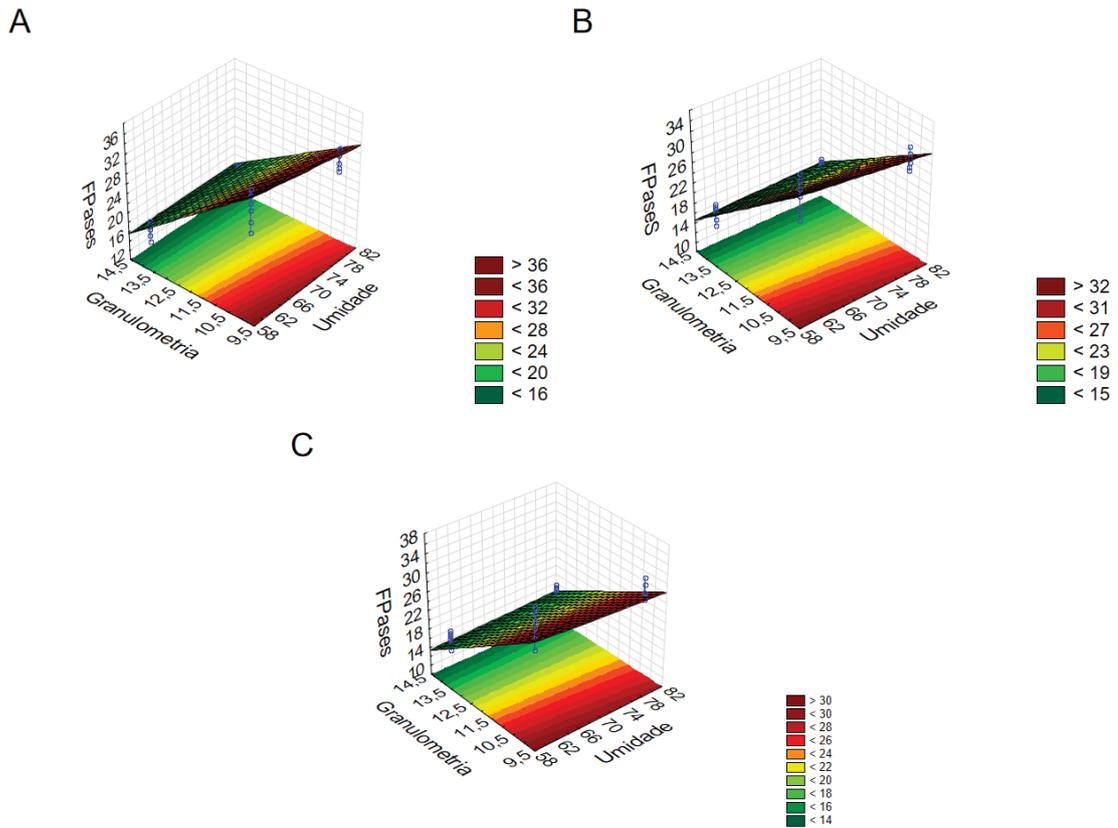
R² = 0,98.

FONTE: A autora (2025).

A ANOVA revelou efeitos estatisticamente significativos para todos os fatores de forma individual, e para a interação entre umidade e granulometria. O fator granulometria se destacou com um coeficiente de -13,4608 e um p-valor extremamente baixo (<0,000001), indicando que variações na granulometria reduzem fortemente a atividade de FPases. A umidade e a temperatura também apresentaram efeitos negativos e significativos, com p-valores de 0,0416 e 0,000012, respectivamente, sugerindo que aumentos nesses fatores tendem a diminuir a atividade enzimática.

Em relação às interações, apenas a interação entre umidade e granulometria (1×2) foi estatisticamente significativa, com p-valor de 0,0233, indicando que o efeito da umidade depende do nível de granulometria e vice-versa conforme demonstrado nas superfícies de resposta apresentadas nas imagens A) 60%, B) 70% e C) 80% Figura 18.

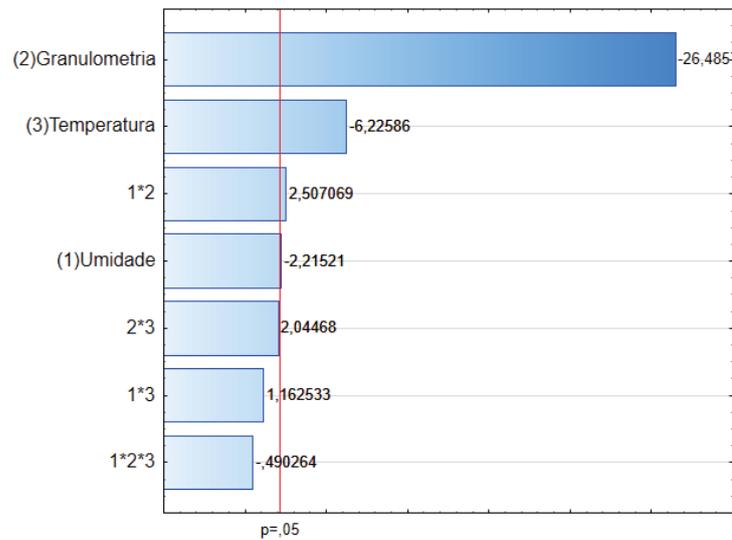
FIGURA 18 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE FPases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E UMIDADE, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger*



FONTE: A autora (2025).

Esses resultados evidenciam que a granulometria tem o maior impacto na produção de FPases, seguido pela temperatura e umidade, e que a otimização do processo deve levar em consideração principalmente o efeito combinado da umidade e granulometria. Os efeitos dos fatores e interações são facilmente observados através do Gráfico de Pareto (Figura 19).

FIGURA 19 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE FPases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

A Equação 10 que representa o modelo, obtida a partir da estimativa dos efeitos em função das variáveis reais está demonstrada a seguir:

$$FPases = 274,31 - 2U - 16,03G - 6T + 0,12U * G + 0,05U * T + 0,35G * T - 0,003U * G * T \quad (10)$$

Sendo:

U = Umidade

G = Granulometria

T = Temperatura

A análise de regressão linear para a atividade de FPases, considerando o planejamento experimental 2^3 , está apresentada na Tabela 13.

TABELA 13 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>1154,841</i>	<i>3</i>	<i>384,9470</i>	<i>177,0533</i>	<i>0,000000</i>
Resíduo	43,484	20	2,1742		
Total	1198,325				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

$R^2=0,98$

FONTE: A autora (2025).

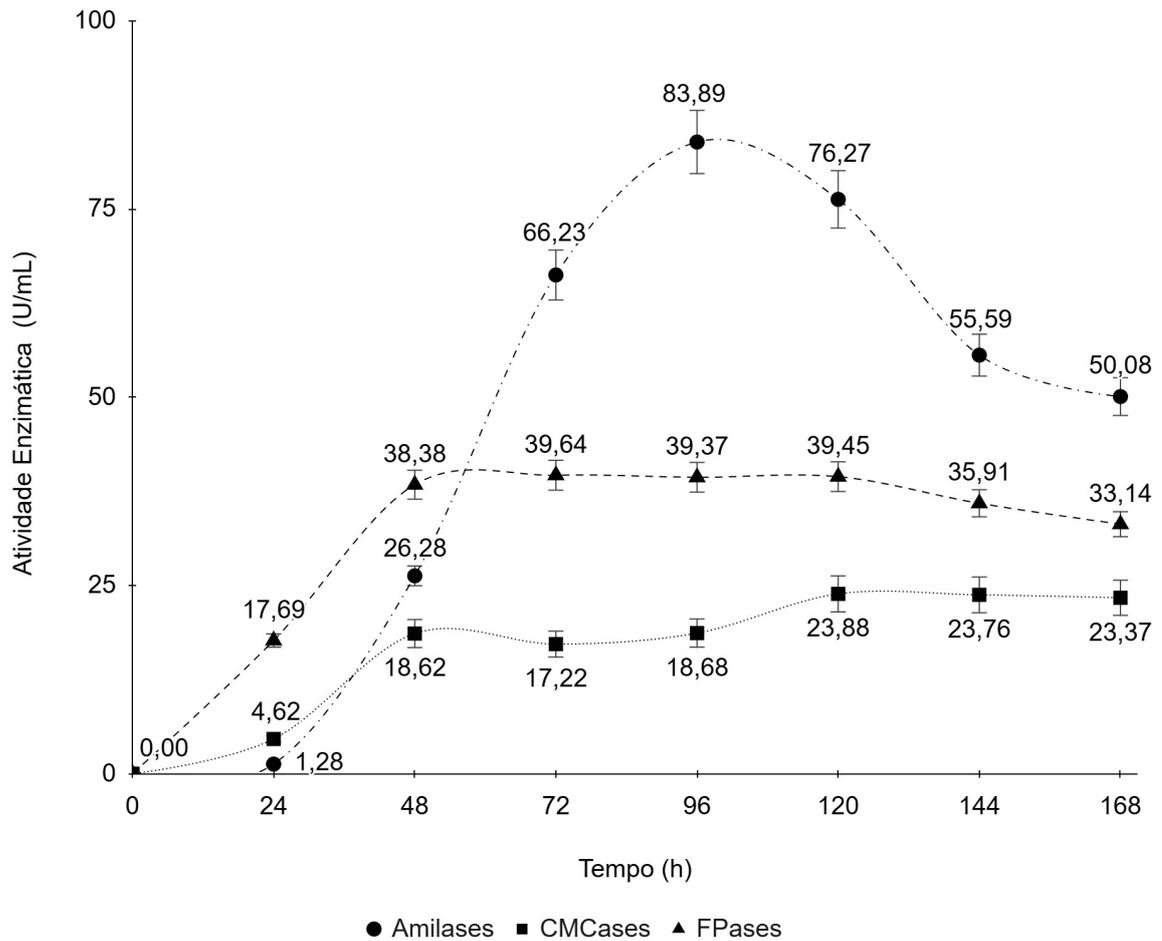
Conforme pode ser observado, o modelo de regressão linear ajustado é altamente significativo, com um valor de F igual a 177,05 e um p-valor inferior a 0,000001. Tal fato, indica que, de forma conjunta, as variáveis independentes incluídas no modelo explicam de maneira estatisticamente relevante a variação observada na variável resposta. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) calculado foi de aproximadamente 0,98, o que significa que 98% da variabilidade da resposta é explicada pelo modelo, refletindo um excelente ajuste.

Adicionalmente, foi realizada análise de anova considerando o planejamento experimental 2^3 com quadruplicatas do ponto central, a fim de verificar a presença de curvatura ou falta de ajuste do modelo. Os dados estão demonstrados na Tabela 3 do Apêndice 3. O modelo com curvatura ajustado apresentou R^2 de 0,94, apresentando termo de curvatura altamente significativo ($p < 0,000001$). O fato evidencia a necessidade de novas avaliações que levem em consideração planejamentos experimentais e análises de modelos não lineares a fim de descrever corretamente o comportamento do sistema.

4.2.2 Cinética da produção em estado sólido das enzimas amilases e celulasas por *A. niger*

A produção dessas enzimas em função do tempo foi avaliada para o principal resultado observado nos ensaios de produção de amilases, em função das altas concentrações produzidas por *A. niger* nas condições de cultivo propostas na metodologia. Desse modo, o ensaio foi realizado a 28 °C, empregando granulometria de 10 mesh e 80% de umidade. O pico máximo de síntese para cada enzima pode ser observado na Figura 20.

FIGURA 20 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE INOCULADA COM *A. niger*



FONTE: A autora (2025).

Na figura, é possível observar a máxima produção de amilases de 83,89 U.mL⁻¹ com 96 horas de fermentação, seguida de uma diminuição constante na produção até atingir as 168 horas do processo. Esse fenômeno pode ser atribuído a diversos fatores, incluindo a redução na disponibilidade de nutrientes do meio de cultivo, essenciais ao crescimento e metabolismo de microrganismos, bem como, para síntese enzimática. Além disso, a produção de enzimas pode ser inibida em função da formação de produtos, como proteases, ácidos orgânicos e alcoóis, durante o processo (Kuddus, 2018).

Lima (2019), em curva de produção de amilases durante 240 horas, empregando bagaço de malte como substrato, inoculado com *A. niger* e incubado a 30 °C constatou maior produção de amilases após 120 horas de cultivo. Demonstrando produção máxima de 17,43 U.g⁻¹, e posterior redução da atividade de amilases até completar 240 horas de cultivo.

A divergência no período de produção e atividade máxima quando comparado a literatura pode estar relacionada às condições de cultivo, dentre elas a temperatura e as características do bagaço empregado por Lima (2019). Além disso, apesar de pertencerem para uma mesma espécie, diferentes cepas microbianas podem ter diferentes características de crescimento, incluindo a velocidade de crescimento e conversão do substrato (Willey, Sherwood, Woolverton, 2008).

Com relação a produção de celulases, pode-se observar na Figura 14 um pico de CMCases às 120 horas, que se mantém com atividades superiores a $23,00 \text{ U.mL}^{-1}$ até completar as 168 horas de cultivo, demonstrando estabilidade na conversão do substrato, apesar de queda com variação mínima entre 144 e 168 horas. Enquanto para FPases, observa-se um aumento significativo na síntese enzimática até 48 horas de fermentação, sendo que às 72 horas ocorre a máxima conversão que segue estável até 120 horas de processo e decai gradativamente.

Cavalcante *et al.* (2018) avaliaram o potencial dos resíduos de folhas, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho na produção de celulases a partir do fungo *A. niger* por cultivo em estado sólido. O processo fermentativo foi realizado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o teor de umidade foi ajustado para 55%. Para as folhas, os autores observaram as maiores atividades em 48 e 72 horas, com $0,78 \text{ U.g}^{-1}$ para FPases e $1,53 \text{ U.g}^{-1}$ para CMCases, respectivamente. Comparativamente, os dados expostos para CMCases também expressaram uma variação mínima entre 72 e 120 horas, enquanto para FPases demonstrou aumento sutil as 120 horas. O bagaço de cana atingiu a maior atividade em 120 horas para FPases com $1,09 \text{ U.g}^{-1}$, e 72 horas para CMCases com $2,40 \text{ U.g}^{-1}$, mantendo-se estável até 120 horas de cultivo. O sabugo de milho exibiu maior atividade em 120 horas para a FPases ($1,06 \text{ U.g}^{-1}$) e em 96 horas para CMCases ($3,37 \text{ U.g}^{-1}$), seguida de redução expressiva na atividade em 120 horas.

De acordo com Cavalcante *et al.* (2018) a atividade de CMCases não é influenciada apenas pelo tipo de microrganismo, mas também por condições específicas impostas ao meio fermentado, corroborando com o observado quando comparando os dados obtidos nesse estudo com a literatura.

Além disso, mesmo compartilhando o substrato, a forma como os microrganismos agem no consumo de nutrientes e as condições de fermentação (tamanho da partícula, temperatura, umidade, aeração, entre outros) são fatores essenciais na condução do processo (Cavalcante *et al.*, 2018; Kuddus, 2018).

4.3 OBTENÇÃO DE AMILASES E CELULASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR *T. asperellum*

A produção das enzimas amilases e celulases obtidas pela fermentação em estado sólido do bagaço de malte, em diferentes condições de granulometria, temperatura e umidade, inoculado com *T. asperellum*, estão descritas na Tabela 14.

TABELA 14 - SÍNTESE DE AMILASES E CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADA COM *T. asperellum*

Tratamento	Amilases (U.mL ⁻¹)	Celulases (U.mL ⁻¹)	
		CMCases	FPases
1 (60%,10 mesh, 28 °C)	26,19 ± 3,85	6,92 ± 0,33	8,63 ± 0,57
2 (80%,14 mesh,32 °C)	27,59 ± 2,55	23,24 ± 1,42	6,50 ± 0,78
3 (60%,10 mesh, 32 °C)	25,39 ± 0,76	8,86 ± 0,90	0,53 ± 0,51
4 (60%, 14 mesh, 28 °C)	15,58 ± 2,41	7,27 ± 0,50	8,99 ± 1,64
5 (60%,14 mesh, 32 °C)	14,31 ± 1,24	8,08 ± 0,57	0,96 ± 0,34
6 (80%, 10 mesh, 28 °C)	18,58 ± 2,41	6,09 ± 0,37	10,59 ± 1,68
7 (80%, 14 mesh, 28 °C)	29,60 ± 2,42	10,26 ± 0,51	9,09 ± 0,42
8 (80%, 10 mesh, 32 °C)	9,49 ± 3,10	1,42 ± 0,84	3,60 ± 0,40
9 (70%, 12 mesh, 30 °C)	22,43 ± 0,28	9,66 ± 0,47	24,92 ± 1,87
10 (70%, 12 mesh, 30 °C)	27,66 ± 2,89	16,54 ± 1,87	35,46 ± 1,77
11 (70%, 12 mesh, 30 °C)	13,07 ± 3,16	5,79 ± 0,87	30,93 ± 3,81
12 (70%, 12 mesh, 30 °C)	24,15 ± 0,89	15,25 ± 0,90	34,66 ± 1,05

FONTE: A autora (2025).

À semelhança do que foi observado para os dados de *A. niger*, para *T. asperellum* também houveram algumas variações nos tratamentos inerentes às repetições no ponto central, especialmente nos tratamentos 9 e 11, onde pode ser observada menor síntese enzimática, tanto para amilases quanto para CMCases e FPases. Possivelmente tais variações tenham decorrido da distribuição de calor dentro da estufa, que pode não ser uniforme, levando a variações de temperatura em diferentes áreas, ou ainda em função da viabilidade das células presentes no inóculo, especialmente considerando a contagem em câmara de Neubauer.

De acordo com Borzani *et al.* (2001) e Schmidell *et al.* (2021) a viabilidade e homogeneidade de distribuição das células é um fator crucial para fermentação em estado sólido, podendo impactar substancialmente na qualidade e a quantidade do produto final, mesmo quando os parâmetros de fermentação, como temperatura, umidade e tempo de incubação, são mantidos constantes. Tais fatores podem dificultar a iniciação da fermentação, uma vez que o crescimento celular será mais lento e conseqüentemente o processo de fermentação não será eficiente. Nos

ensaios realizados o crescimento microbiano além de evidentemente menor, foi mais lento, demonstrando diferentes fases de crescimento com o mesmo período de incubação.

A produção de amilases demonstrou maior resultado para o tratamento 7, empregando 80% de umidade, 14 mesh de granulometria e 28 °C de temperatura. Exibindo valor de $29,60 \pm 2,42 \text{ U.mL}^{-1}$. Enquanto valores semelhantes foram observados para os tratamentos 1 ($26,19 \pm 3,85 \text{ U.mL}^{-1}$), 2 ($27,59 \pm 2,55 \text{ U.mL}^{-1}$) e 3 ($25,39 \pm 0,76 \text{ U.mL}^{-1}$), expondo que a granulometria, temperatura e umidade, isoladamente, não demonstraram efeitos expressivos no desenvolvimento do microrganismo.

Para CMCases o maior resultado foi no tratamento 2 com produção de $23,24 \pm 1,42 \text{ U.mL}^{-1}$, enquanto o tratamento 8 apresentou valor de $1,42 \pm 0,84 \text{ U.mL}^{-1}$, os resultados demonstram relação expressiva com o tamanho das partículas empregadas nos meios de cultivo, sendo o menor valor observado para o tratamento empregando 10 mesh de granulometria. De acordo com Schmidell *et al.* (2021) granulometrias maiores limitam a superfície de contato entre o substrato e os microrganismos, bem como dificultam a difusão de nutrientes, o que pode resultar em um menor crescimento microbiano e uma fermentação menos eficiente.

Além disso, considerando os tratamentos 1 ($6,92 \pm 0,33 \text{ U.mL}^{-1}$), 3 ($8,86 \pm 0,90 \text{ U.mL}^{-1}$), 4 ($7,27 \pm 0,50 \text{ U.mL}^{-1}$) e 6 ($6,09 \pm 0,37 \text{ U.mL}^{-1}$) pode-se observar grande impacto nas análises de CMCases relacionados ao baixo teor de umidade (60%) empregado nos tratamentos, fator que influencia diretamente no crescimento microbiano (Schmidell *et al.*, 2021).

Para FPases as repetições no ponto central demonstraram destaque frente aos outros tratamentos, sendo observados valores que vão desde $24,32 \text{ U.mL}^{-1}$ até $35,46 \pm 1,77 \text{ U.mL}^{-1}$ entre os tratamentos 9, 10, 11 e 12. Tal fato possivelmente se deve a fisiologia dos microrganismos e as condições moderadas de temperatura, granulometria e umidade envolvidos no processo (Cavalcante, 2018).

Em condições de 80% de umidade a atividade verificada variou entre $3,60 \pm 0,40 \text{ U.mL}^{-1}$ e $10,69 \text{ U.mL}^{-1}$, observados respectivamente nos tratamentos 2, 6, 7 e 8, demonstrando efeito negativo em função do aumento da umidade na síntese enzimática, quando comparado a 70%.

Os menores valores observados para FPases foram nos tratamentos 3 e 5, sendo $0,53 \pm 0,51 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,96 \pm 0,34 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores

possivelmente são decorrentes do baixo teor de umidade (60%) disponível nos tratamentos, semelhante ao verificado na síntese de CMases.

4.3.1 Avaliação estatística da produção enzimática utilizando *T. asperellum*

Conforme descrito anteriormente os dados obtidos através do delineamento experimental foram submetidos à ANOVA e à regressão, a fim de identificar os fatores envolvidos nas na síntese de amilases, CMases e FPases, bem como suas interações nos processos de fermentação em estado sólido inoculados com *T. asperellum*

4.3.1.1 Síntese de amilases por *T. asperellum*

Bem como para *A. niger*, os resultados para a ANOVA relativos à produção de amilases por *T. asperellum* estão apresentados no Apêndice 2, na Tabela 4.

A Tabela 15 demonstra as estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis, assim como, os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo (R^2) com um nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em itálico representam os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 15 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES DETERMINADOS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³

Fator	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>20,82792</i>	<i>0,482357</i>
Umidade (1)	0,558929	-0,57583	0,964713
<i>Granulometria (2)</i>	<i>0,002936</i>	<i>3,38083</i>	<i>0,964713</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>0,003762</i>	<i>-3,26750</i>	<i>0,964713</i>
1*2	0,000000	12,72583	0,964713
1*3	0,458719	-0,73250	0,964713
2*3	0,896503	0,12750	0,964713
1*2*3	0,071907	1,85917	0,964713

$R^2 = 0,93$.

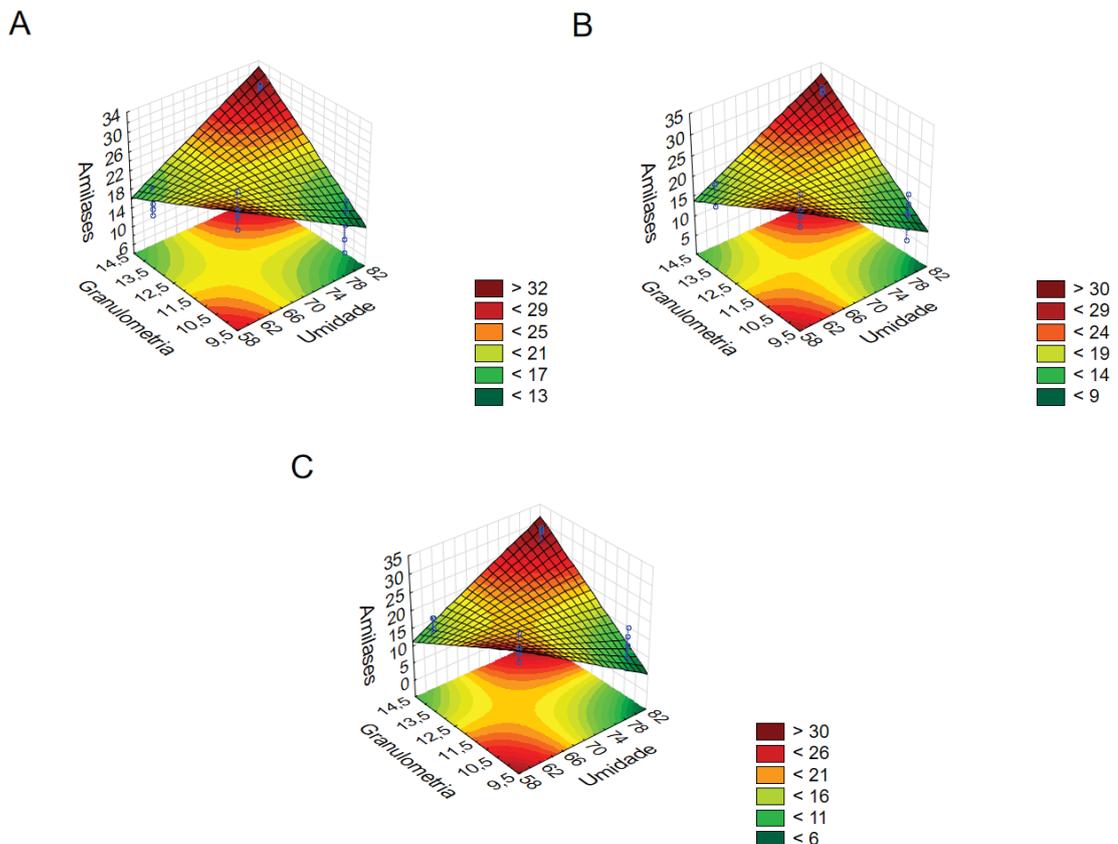
FONTE: A autora (2025).

Como pode ser observado, o intercepto foi altamente significativo ($p < 0,0000$), com um valor de aproximadamente 20,83. Quanto aos fatores, a análise evidenciou

que a granulometria e a temperatura influenciam significativamente a atividade de amilases, com p-valores de 0,0029 e 0,0038, respectivamente. A granulometria apresentou um coeficiente positivo (3,38), indicando que o aumento neste fator está associado ao aumento da variável resposta, enquanto a temperatura mostrou efeito negativo (-3,27), sugerindo que seu aumento reduz a atividade. O fator umidade, por outro lado, não apresentou significância estatística ($p = 0,5589$).

Dentre as interações, a única que demonstrou efeito significativo foi entre umidade e granulometria com p-valor $< 0,0001$ e coeficiente elevado (12,73). O resultado indica uma interação relevante entre esses dois fatores, de modo que o efeito da umidade sobre a variável a atividade amilolítica depende fortemente do nível de granulometria, e vice-versa. A relação pode ser observada através das superfícies de resposta apresentadas na Figura 21, nas temperaturas A) 28 °C, B) 30 °C e C) 32 °C °C.

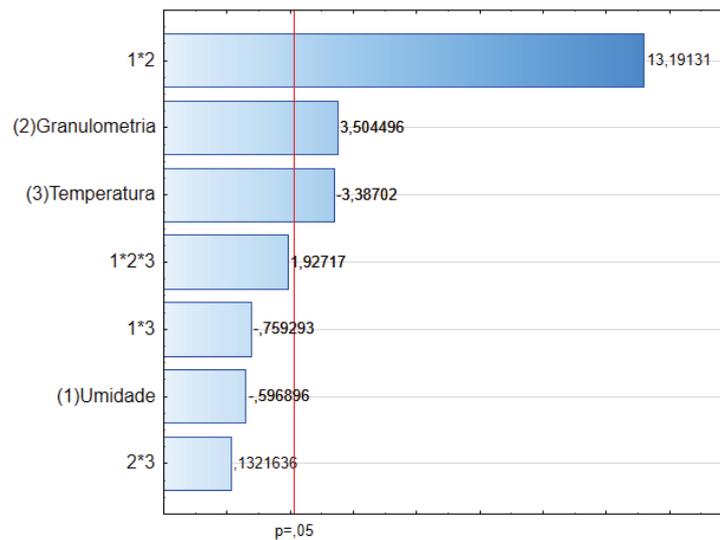
FIGURA 21 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM FUNÇÃO DA UMIDADE E GRANULOMETRIA, COM TEMPERATURA A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*



FONTE: A autora (2025).

O valor de $R^2 = 0,93$ sugere que o modelo é capaz de explicar aproximadamente 93% da variabilidade dos dados. Tal valor indica um ajuste razoável do modelo, considerando que a maior parte da variação observada na resposta pode ser atribuída aos fatores analisados, com destaque para a interação entre umidade e granulometria, como pode ser observado por meio do gráfico de Pareto (Figura 22).

FIGURA 22 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE A AMILASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

Ademais, a estimativa dos efeitos da variância permitiu a obtenção da Equação 11, apresentada abaixo, considerando as variáveis reais do modelo:

$$\text{Amilases} = - 313,9 + 5,07U + 26,9G + 19,79T - 0,38 U * G - 0,3U * T - 1,61 G * T + 0,023U * G * T \quad (11)$$

Em que:

U = Umidade

G = Granulometria

T = Temperatura

Com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre os fatores que influenciam a atividade de amilases, foi conduzida uma análise de regressão linear múltipla conforme representado na Tabela 16.

TABELA 16 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Regressão	134,629	3	44,87635	0,827152	0,494400
Resíduo	1085,081	20	54,25407		
Total	1219,710				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

$R^2=0,11$

FONTE: A autora (2025).

A ANOVA revelou F de aproximadamente 0,83 e p-valor de 0,49, indicando que, ao nível de 95% de confiança, não há evidências suficientes para afirmar que os fatores considerados contribuem de forma relevante para a explicação da variabilidade da atividade de amilases. Além disso, o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,11$) demonstra que apenas 11% da variância total pode ser atribuída às variáveis independentes incluídas no modelo, enquanto a maior parte da variação permanece não explicada. Além disso, o valor elevado do erro médio quadrático residual (QM = 54,25) reforça a inadequação do modelo, evidenciando seu baixo poder preditivo.

Nesse sentido, para investigação de possíveis efeitos não lineares procedeu-se com a ANOVA considerando o planejamento experimental 2^3 com quadruplicatas no ponto central, conforme disposto na Tabela 4 do Apêndice 3. A ANOVA permitiu avaliar os efeitos principais e as interações entre os fatores sobre a variável resposta, bem como falta de ajuste e coeficiente de determinação.

No modelo a falta de ajuste demonstrou p-valor de 0,5072, não significativo, indicando que o modelo proposto é estatisticamente adequado para representar os dados observados, sem evidências de estruturas incorretas ou omissão sistemática de efeitos importantes. No entanto o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,70$) indica que apenas 70% da variabilidade da resposta é explicada pelos fatores e interações incluídos no modelo, demonstrando a necessidade de avaliar fatores adicionais que não foram considerados no modelo proposto.

4.3.1.2 Síntese de CMCases por *T. asperellum*

A ANOVA realizada para avaliar os efeitos significativos na produção de CMCases por *T. asperellum*, está apresentada no Apêndice 2, na Tabela 5.

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis, assim como, bem como os respectivos valores de erro padrão, p-valor, coeficientes das

variáveis do modelo e coeficiente de determinação do modelo R^2 , com um nível de significância ($\alpha=0,05$), estão apresentados na Tabela 17. Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p -valor $< 0,05$).

TABELA 17 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	p-valor	Coeficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>9,017083</i>	<i>0,154762</i>
<i>Umidade (1)</i>	<i>0,000001</i>	<i>2,469167</i>	<i>0,309524</i>
<i>Granulometria (2)</i>	<i>0,000000</i>	<i>6,389167</i>	<i>0,309524</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>0,000000</i>	<i>2,764167</i>	<i>0,309524</i>
<i>1*2</i>	<i>0,000000</i>	<i>6,604167</i>	<i>0,309524</i>
<i>1*3</i>	<i>0,000373</i>	<i>1,389167</i>	<i>0,309524</i>
<i>2*3</i>	<i>0,000000</i>	<i>4,129167</i>	<i>0,309524</i>
<i>1*2*3</i>	<i>0,000000</i>	<i>4,694167</i>	<i>0,309524</i>

$R^2 = 0,99$.

FONTE: A autora (2025).

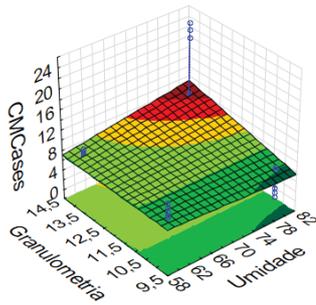
Os resultados da análise sugerem que umidade, granulometria e temperatura, bem como suas interações apresentam efeitos altamente significativos sobre a variável resposta. Tal fato indica que impacto substancial e consistente dos fatores no sistema estudado. Além disso, o intercepto do modelo também foi significativo ($p < 0,0001$)

A umidade (coeficiente = 2,469; $p = 0,000001$), a granulometria (coeficiente = 6,389; $p = 0,000000$) e a temperatura (coeficiente = 2,764; $p = 0,000000$) demonstraram efeitos positivos significativos, sugerindo que o aumento de cada um desses fatores individualmente resulta em um incremento na atividade de CMCases. Além disso, as interações entre esses fatores também apresentaram significância.

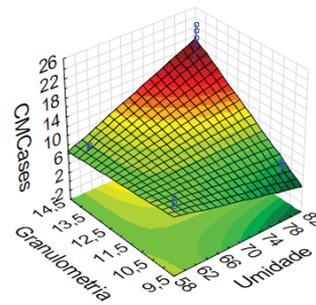
A interação entre umidade e granulometria apresentou coeficiente positivo de 6,604 e p -valor inferior a 0,0001, altamente significativo, sugerindo que os efeitos combinados desses fatores influenciam substancialmente a variável resposta conforme pode ser observado nas superfícies de resposta referentes às temperaturas A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C dispostas na Figura 23.

FIGURA 23 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA UMIDADE E GRANULOMETRIA, COM TEMPERATURA DE A) 28 °C, B) 30 °C E C) 32 °C NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*

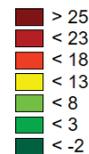
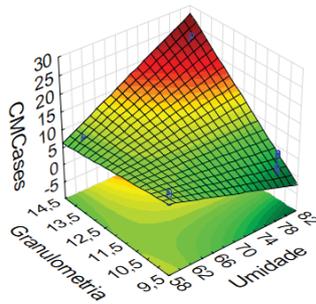
A



B



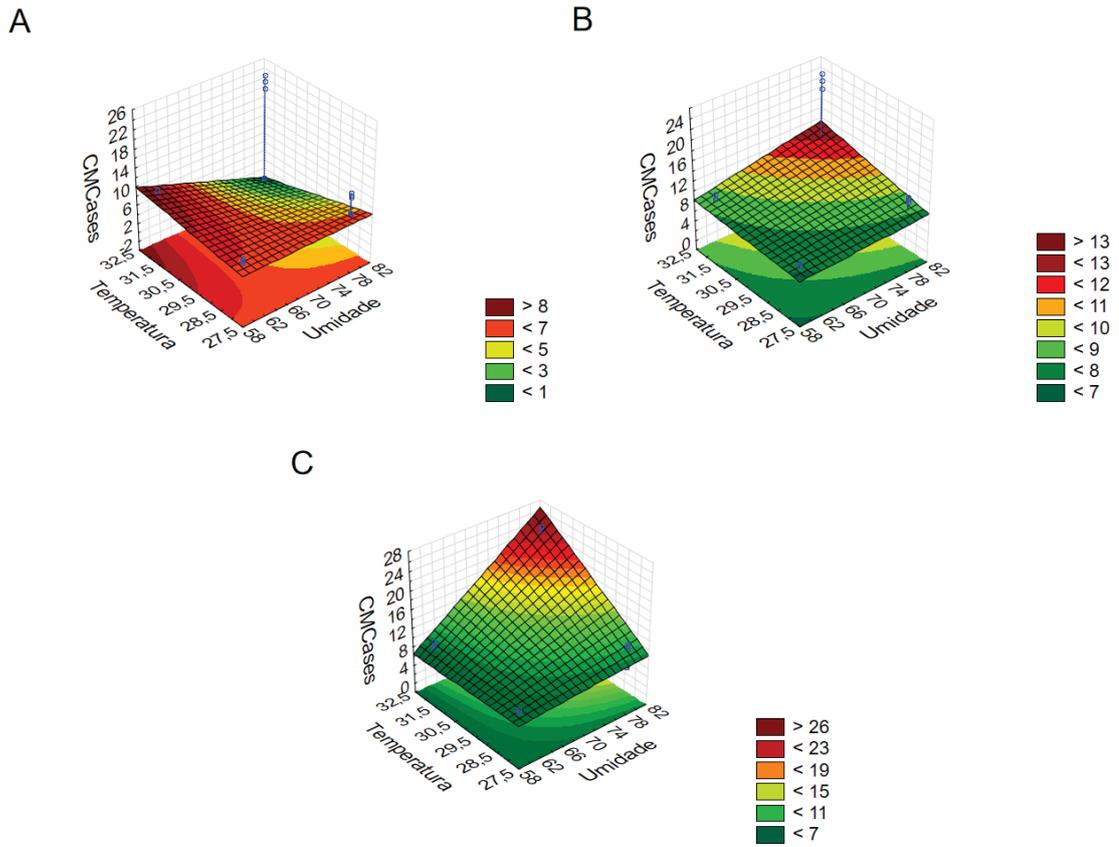
C



FONTE: A autora (2025).

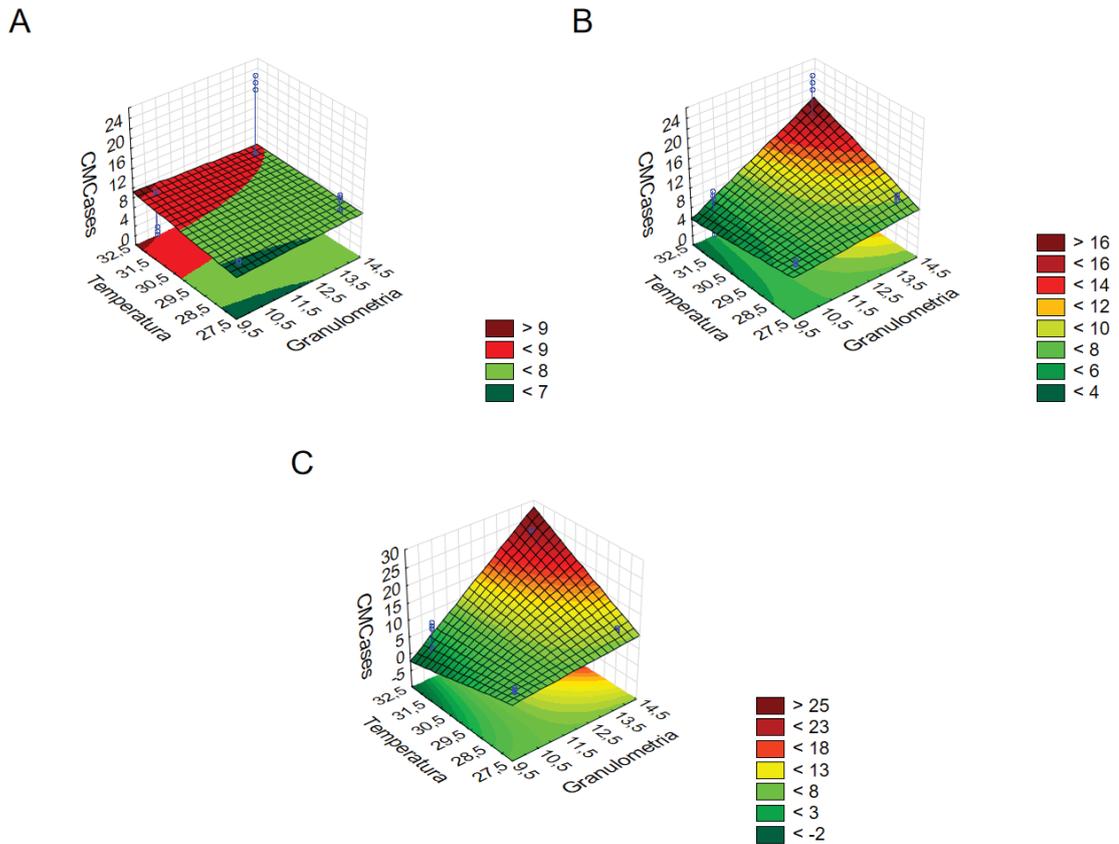
A interação entre umidade e temperatura (coeficiente = 1,389; $p = 0,000373$) e entre granulometria e temperatura (coeficiente = 4,129; $p < 0,0001$) também demonstraram impactos significativos conforme verificado nas superfícies de resposta dispostas nas Figura 24 imagens A) 10 mesh, B) 12 mesh E C) 14 mesh e Figura 25 imagens A) 60%, B) 70% e C) 80%, respectivamente.

FIGURA 24 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA UMIDADE E TEMPERATURA, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*



FONTE: A autora (2025).

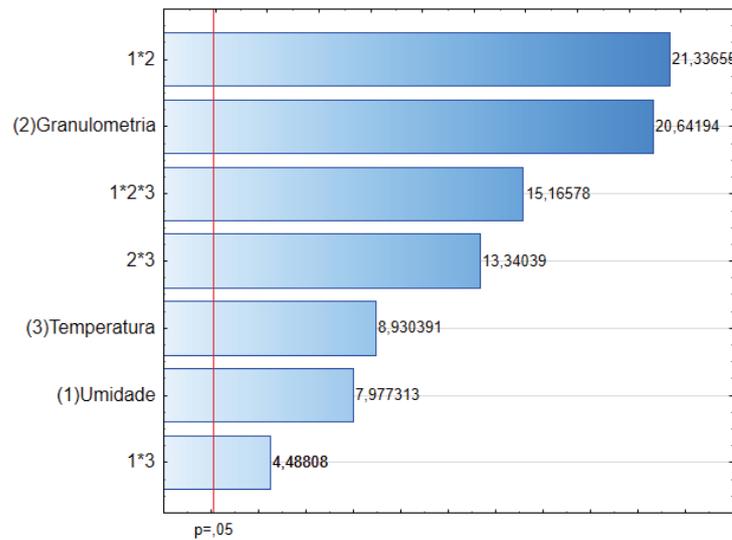
FIGURA 25 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE CMCases EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA E TEMPERATURA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*



FONTE: A autora (2025).

A interação entre os três fatores foi significativa ($p < 0,0001$), com coeficiente de 4,69, indicando que a combinação das três variáveis têm uma influência relevante sobre a resposta. Os efeitos dos fatores e interações são facilmente observados através do gráfico de Pareto (Figura 26).

FIGURA 26 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE A CMCases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) indica que o modelo é capaz de explicar aproximadamente 99% da variabilidade dos dados, sugerindo um excelente ajuste. Isso implica que a maior parte da variação observada na resposta pode ser atribuída aos fatores analisados, especialmente às interações entre eles. Com isso, foi possível determinar a Equação 12 que representa o modelo estatístico em função do nível de significância dos efeitos:

$$CMCases = - 1120,75 + 18,22U + 97,78G + 41,35T - 1,6U * G - 0,67U * T - 3,59G * T + 0,06U * G * T \quad (12)$$

Dados:

U = Umidade;

G = Granulometria;

T = Temperatura.

Além disso, foi realizada análise de regressão múltipla conforme apresentado na Tabela 18.

TABELA 18 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>327,3531</i>	<i>3</i>	<i>109,1177</i>	<i>4,221373</i>	<i>0,018219</i>
Resíduo	516,9774	20	25,8489		
Total	844,3305				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R²=0,39

FONTE: A autora (2025).

A análise sugere que o modelo ajustado é estatisticamente significativo (F = 4,22; p = 0,0182), evidenciando que, ao nível de 95% de confiança, há efeito significativo dos fatores incluídos no modelo sobre a variável resposta. A soma dos quadrados da regressão (SQ = 327,35) representa a parte da variabilidade total explicada pelos fatores, enquanto o resíduo (SQ = 516,98) corresponde à variação não explicada pelo modelo.

Além disso, o valor do p associado ao teste F (< 0,05) indica que pelo menos um dos coeficientes associados às variáveis explicativas é significativamente diferente de zero, confirmando a relevância estatística do modelo como um todo. No entanto, o coeficiente de determinação (R² = 0,39) infere que o modelo explica 39% da variabilidade da atividade de CMCases.

Nesse contexto, efeitos não lineares foram avaliados através da ANOVA considerando o planejamento experimental 2³ com quadruplicatas no ponto central. Os resultados encontram-se na Tabela 5 do Apêndice 3.

A análise demonstrou que o modelo ajustado apresenta forte capacidade explicativa, com um R² igual a 0,95. Além disso, dentre os efeitos analisados, a presença de curvatura foi altamente significativa (F = 521,59; p < 0,0001), evidenciando que a relação entre os fatores e a variável resposta não é puramente linear, o que justifica o uso de um modelo com termos de interação e, possivelmente, com componentes não lineares, que melhor representem o comportamento da variável resposta. O erro puro foi de 9,88, com 27 graus de liberdade, o que, em conjunto com o baixo valor de resíduo não explicado (SQ = 266,77), reforça a adequação do modelo.

4.3.1.3 Síntese de FPases por *T. asperellum*

A análise de ANOVA, realizada para avaliar os efeitos significativos na produção de FPases por *T. asperellum*, está apresentada na Tabela 6, Apêndice 2. As estimativas dos efeitos principais e das interações entre as variáveis, juntamente com os respectivos valores de erro padrão, p-valor, coeficientes das variáveis no modelo e o coeficiente de determinação (R^2), com nível de significância de $\alpha = 0,05$, podem ser observadas na Tabela 19. Os efeitos significativos, com p-valor inferior a 0,05, estão destacados em itálico, indicando que esses efeitos são relevantes dentro do intervalo de confiança de 95%.

TABELA 19 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	p-valor	Coeficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000000</i>	<i>6,11167</i>	<i>0,193158</i>
<i>Umidade (1)</i>	<i>0,000004</i>	<i>2,66500</i>	<i>0,386315</i>
Granulometria (2)	0,176214	0,54667	0,386315
<i>Temperatura (3)</i>	<i>0,000000</i>	<i>-6,42667</i>	<i>0,386315</i>
1*2	0,693561	0,15500	0,386315
1*3	<i>0,000623</i>	<i>1,63833</i>	<i>0,386315</i>
2*3	<i>0,010648</i>	<i>1,11667</i>	<i>0,386315</i>
1*2*3	<i>0,012842</i>	<i>1,08167</i>	<i>0,386315</i>

$R^2 = 0,96$.

FONTE: A autora (2025).

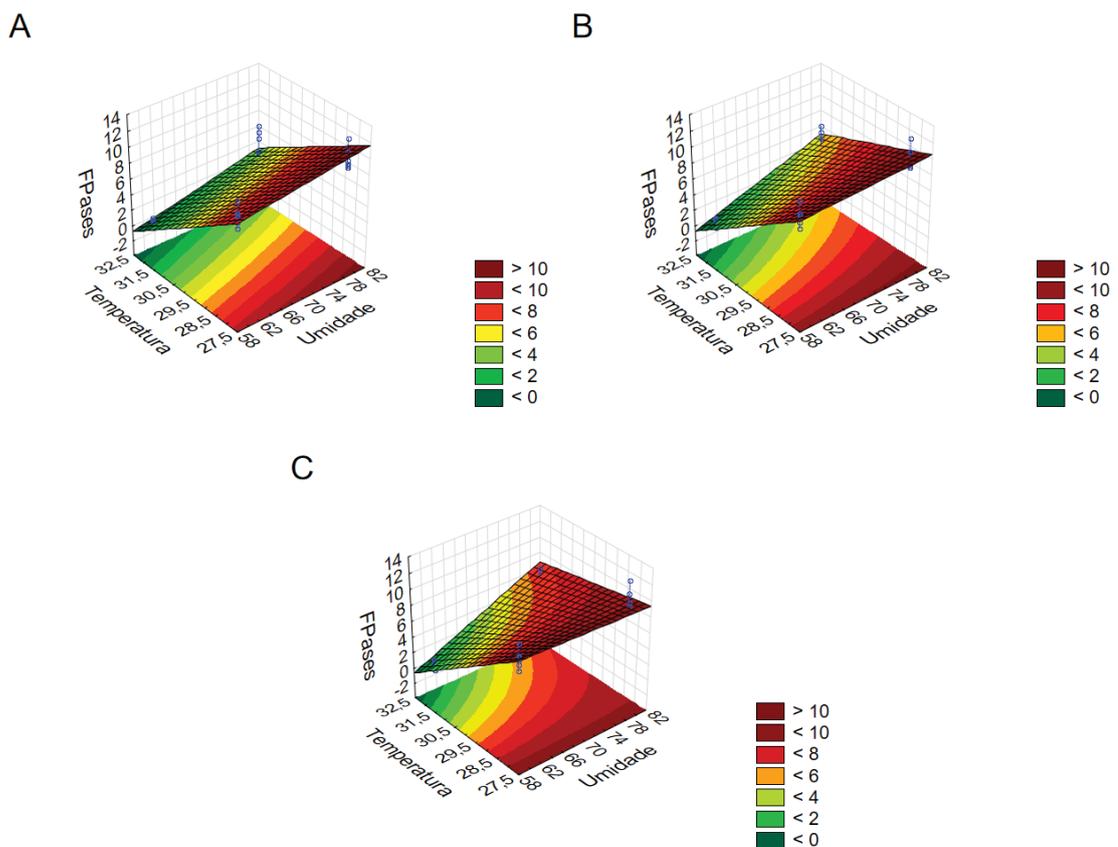
Através da análise dos coeficientes do modelo de regressão evidencia-se que vários fatores possuem influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta. O intercepto foi altamente significativo ($p < 0,0001$), com valor estimado em 6,11167, indicando a média da resposta quando todos os fatores estão em seus níveis de referência.

Entre os efeitos principais, a umidade apresentou um coeficiente positivo (2,66) e significativo com p-valor de 0,000004, indicando que o aumento da umidade está associado ao aumento da variável resposta. A temperatura, por sua vez, apresentou um coeficiente negativo de -6,42667 ($p < 0,0001$), revelando efeito significativo e inverso. Enquanto o fator granulometria, embora com coeficiente positivo (0,54667), não se demonstrou estatisticamente significativo ($p = 0,1762$), sugerindo que sua contribuição isolada ao modelo não é robusta ao nível de 95% de confiança.

Quanto às interações, entre os fatores umidade e granulometria não foi

observada significância estatística ($p = 0,6936$), sugerindo ausência de efeito combinado detectável entre essas variáveis. Por outro lado, a interação entre umidade e temperatura foi significativa ($p = 0,000623$), com um coeficiente positivo de 1,63833, indicando que os efeitos da umidade sobre a atividade de FPases são dependentes da temperatura, conforme pode ser observado através das superfícies de resposta dispostas na imagens A) 10 mesh, B) 12 mesh e C) 14 mesh, Figura 27.

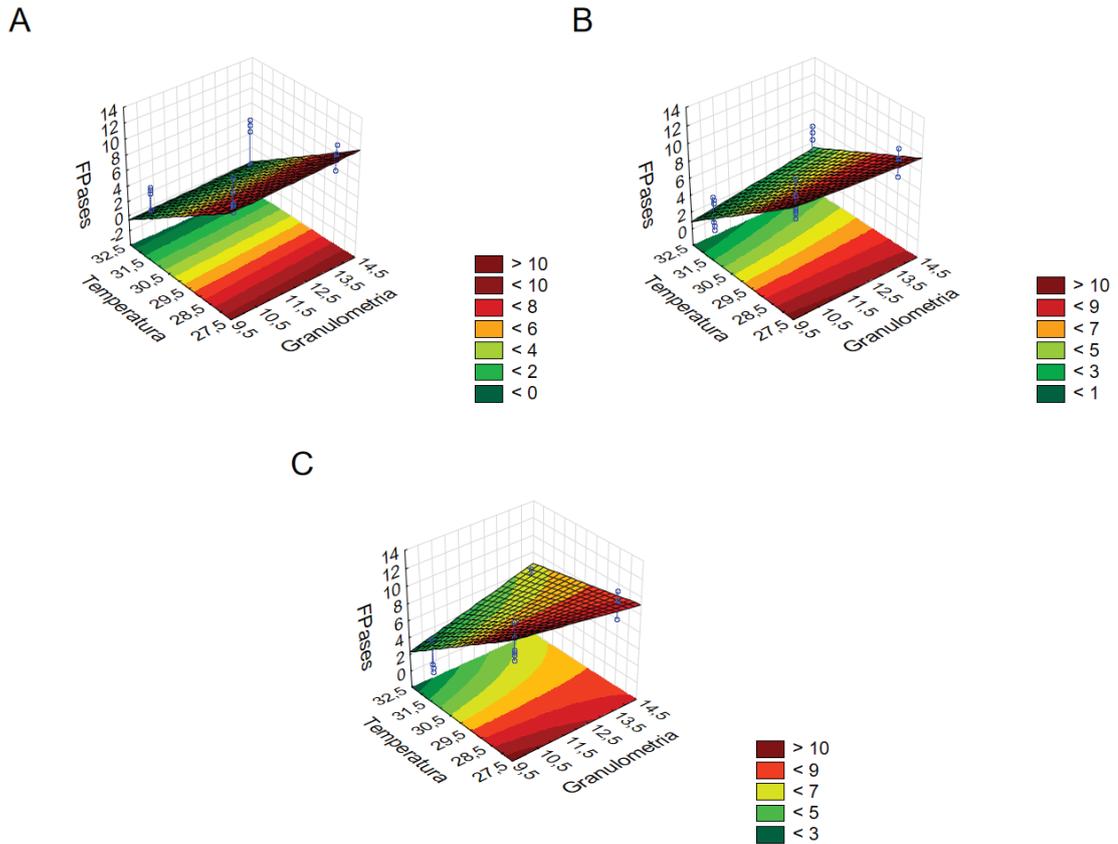
FIGURA 27 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE FPases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE, COM GRANULOMETRIA DE A) 10 MESH, B) 12 MESH E C) 14 MESH NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*



FONTE: A autora (2025).

A interação entre granulometria e temperatura também foi estatisticamente significativa ($p = 0,010648$), com coeficiente de 1,11667. O dado aponta para uma relação combinada importante entre esses dois fatores em conformidade ao observado nas imagens A) 60%, B) 70% e C) 80% da Figura 28.

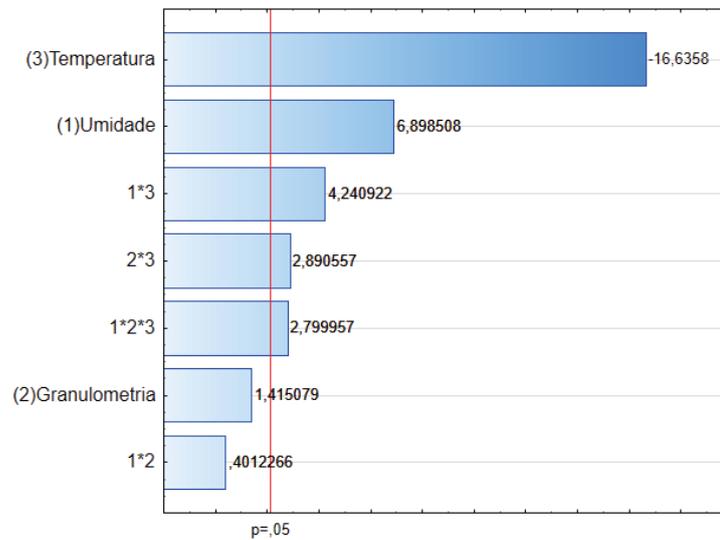
FIGURA 28- SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA ATIVIDADE FPases EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E GRANULOMETRIA, COM UMIDADE DE A) 60%, B) 70% E C) 80% NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum*



FONTE: A autora (2025).

Por fim, a interação tripla, com coeficiente de 1,08167 e $p = 0,012842$, também se mostrou significativa, o que indica que a resposta é influenciada de maneira relevante pela combinação simultânea dos três fatores. No gráfico de Pareto (Figura 29) evidenciam-se os efeitos dos fatores e interações considerando nível de significância de $\alpha = 0,05$.

FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE FPases OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi de 0,96, o que indica que 96% da variabilidade observada na variável resposta é explicada pelos fatores e interações considerados na análise. Esse resultado demonstra um excelente ajuste do modelo aos dados experimentais, sugerindo que as variáveis independentes incluídas são altamente representativas e relevantes para a compreensão do comportamento do sistema estudado.

Com isso, foi possível determinar a Equação 12 que representa o modelo estatístico em função do nível de significância dos efeitos:

$$FPases = -157,86 + 3,72U + 24,07G + 5,21T - 0,4U * G - 0,12U * T - 0,81G * T + 0,14U * G * T \quad (12)$$

Dados:

U = Umidade;

G = Granulometria;

T = Temperatura.

Para compreender melhor os fatores que influenciam a atividade de FPases, foi realizada uma regressão linear múltipla, conforme apresentado na Tabela 20.

TABELA 20 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>292,2187</i>	<i>3</i>	<i>97,40623</i>	<i>43,21708</i>	<i>0,000000</i>
Resíduo	45,0777	20	2,25388		
Total	337,2963				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

$R^2=0,87$

FONTE: A autora (2025).

A análise de regressão demonstrou que o modelo é estatisticamente significativo ($F = 43,22$; $p < 0,0001$), indicando que os fatores incluídos explicam de forma consistente a variação observada na variável resposta. O valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,87$) confirma que 87% da variabilidade da variável resposta é explicada pelo modelo, o que caracteriza um ajuste razoável dos dados experimentais.

Adicionalmente, procedeu-se com a ANOVA considerando o planejamento experimental 2^3 com quadruplicatas no ponto central, a fim de investigar a presença de curvatura no modelo, erro puro e falta de ajuste dos dados. Os resultados encontram-se na Tabela 6 do Apêndice 3.

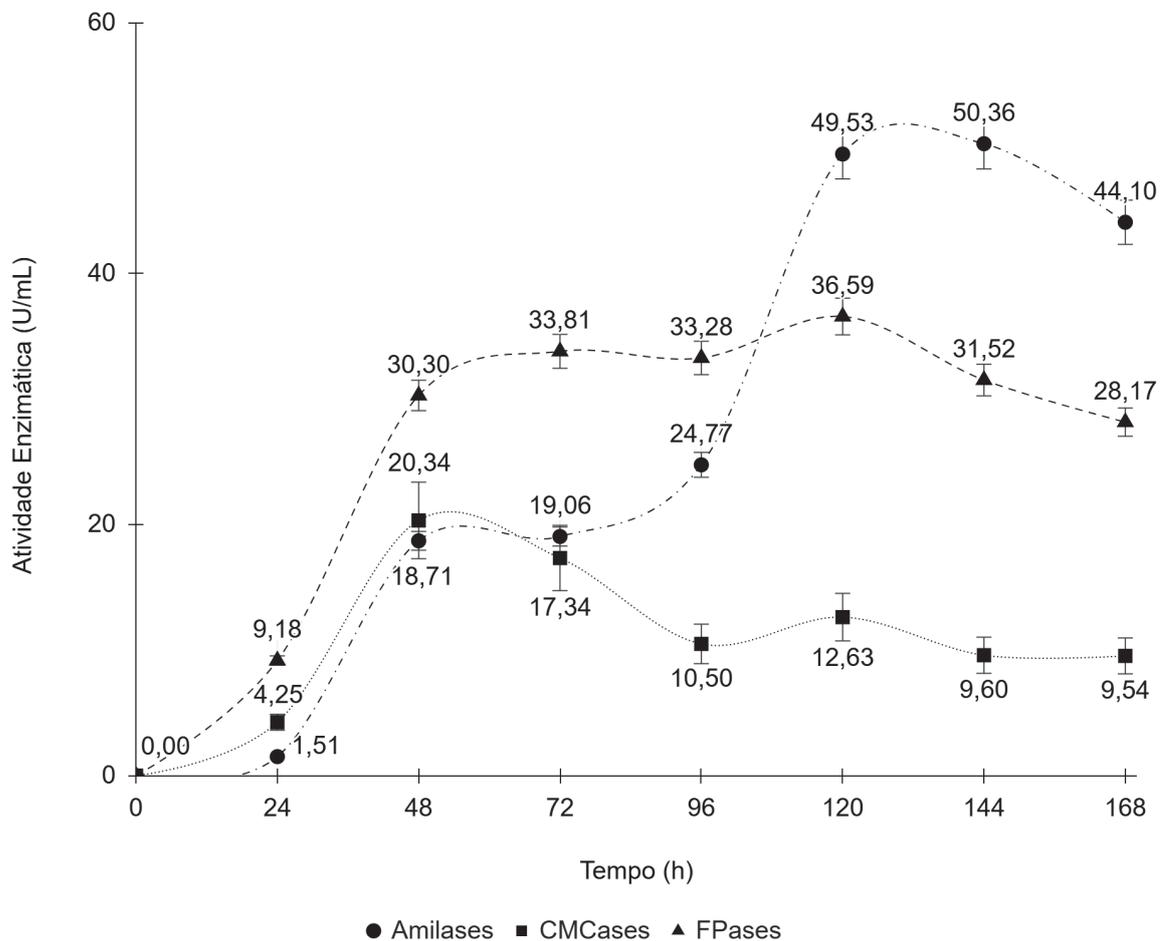
A análise revelou que o modelo apresenta um bom ajuste referente aos dados experimentais, com destaque para a significância da curvatura e de alguns fatores principais. O efeito de curvatura foi altamente significativo ($F = 521,59$; $p < 0,0001$), o que indica que a relação entre os fatores e a atividade de FPases não é puramente linear, reforçando a adequação do uso de modelos com termos de interação ou até mesmo não lineares.

Além disso, o valor relativamente baixo do erro puro ($QM = 9,88$) e a alta soma dos quadrados explicada pela regressão (em especial pela curvatura e pela granulometria) sustentam a qualidade do modelo ajustado. Esses resultados indicam que o comportamento da variável resposta é fortemente influenciado por efeitos quadráticos e pela granulometria, enquanto os demais efeitos, isoladamente ou em interação, apresentaram contribuição limitada.

4.3.2 Cinética da produção em estado sólido das enzimas amilases e celulases por *T. asperellum*

Para acompanhamento da cinética de produção das enzimas amilases e celulases por *T. asperellum*, foram utilizadas as condições do ensaio que levou a máxima produção das enzimas amilolíticas, especialmente em função dos valores expressivos observados. Sendo assim, o ensaio foi realizado a 28 °C, empregando granulometria de 14 mesh e 80% de umidade. A cinética de produção enzimática pode ser observada na Figura 30.

FIGURA 30 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE INOCULADA COM *T. asperellum*



FONTE: A Autora (2025).

No gráfico (Figura 30), é possível observar atividade máxima de amilases de 50,36 U.mL⁻¹ com 144 horas de fermentação, seguida de queda (44,10 U.mL⁻¹) após 168 horas de cultivo. Apesar do desenvolvimento mais lento, quando comparado a

máxima produção de *A. niger*, o perfil de síntese de amilases se apresentou semelhante. Além disso, os valores expressos foram superiores aos observados durante os ensaios realizados variando os fatores de granulometria, temperatura e umidade, provavelmente, relacionando-se a viabilidade do inóculo empregado. Cada um foi preparado imediatamente antes de inocular os meios, sendo empregados diferentes repiques no seu preparo.

De acordo com Pandey (1991) a propagação de microrganismos através do plaqueamento pode resultar na formação de esporos e células com diferentes idades ocasionando a germinação de maneira desigual e consequente variação no desenvolvimento de microrganismos posterior à inoculação.

A máxima produção de CMCases foi observada às 48 horas, em 20,34 U.mL⁻¹, seguida de redução significativa até completar as 168 horas de cultivo. Enquanto para FPases, conforme pode ser observado na Figura 30, ocorre um aumento expressivo na síntese enzimática a partir de 24 horas de fermentação, atingindo a máxima produção às 120 horas de cultivo (36,59 U.mL⁻¹) seguida de redução gradativa até o final do processo.

O acompanhamento cinético da produção de CMCases e FPases foi realizado por Lins (2017) pela fermentação sólida empregando *Trichoderma reesei*. A atividade máxima observada pela autora para CMCases (1,0 U.mL⁻¹) foi atingida em 72 horas de produção utilizando como substrato bagaço de sorgo sacarino com 60 % de umidade inicial e 50 % (m/m) de incremento de farelo de trigo. Em contrapartida, para FPases perfil semelhante foi verificado nas primeiras horas, onde a autora observou aumento expressivo na atividade após as 48 horas, e aumento gradativo entre 72 e 168 horas, seguido de uma leve redução. No entanto, a atividade máxima da enzima foi verificada após 216 horas de processo com 0,13 U.mL⁻¹, demonstrando a necessidade de avaliar período maior de fermentação.

4.4 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÓLÍCAS E CELULOLÓLÍCAS POR *A. niger* E *T. asperellum*

A fermentação em estado sólido empregando diferentes microrganismos para a obtenção de enzimas caracteriza-se como uma alternativa biotecnológica extremamente explorada na literatura, especialmente por se tratar de uma opção sustentável para utilização de resíduos agroindustriais, bem como exigir baixa

demanda tecnológica nos processos. No entanto, o seu rendimento é influenciado por diversos fatores incluindo o meio de cultivo e microrganismos envolvidos na fermentação. Na Tabela 21 estão comparados os resultados observados nesta pesquisa contra dados encontrados na literatura para produção de amilases.

TABELA 21 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

Referência	Meio de Cultivo	Inóculo	Condições	Amilases
Battisti (2021)	Meio Vogel suplementado com casca de maracujá a 2%	<i>Thermoascus aurantiacus</i> PI3S3	96 horas a 46 °C	20,86 ± 1,05 U.mL ⁻¹
Gonçalves (2019)	Farelo de trigo	<i>Rhizoctonia solani</i> TO_022	Umidade de 60%	12,98 U.mL ⁻¹
Gonçalves (2019)	Braquiária lavada	<i>Rhizoctonia solani</i> TO_022	Umidade de 60%,	4,95 U.mL ⁻¹
Gonçalves (2019)	Farelo de soja	<i>Rhizoctonia solani</i> MT_SO85	Umidade 60% incubado a 25° C	3,97 U.mL ⁻¹
Ribeiro <i>et al.</i> (2022)	Farelo de soja	<i>Penicillium</i> sp.	Substrato umedecido, 7 dias a 28 °C	1,47 U.mL ⁻¹
Ribeiro <i>et al.</i> (2022)	Casca de Arroz + 1% amido	<i>Penicillium</i> sp.	Substrato umedecido, 7 dias a 28 °C	2,48 U.mL ⁻¹
Ribeiro <i>et al.</i> (2019)	Casca de maracujá e casca extrusada de laranja (1:1)	<i>Rasamsonia composticola</i>	Misturas de fontes de carbono; Peptona 1% como fonte de nitrogênio	3,87 U.mL ⁻¹
Rodrigues, D'Amico, Gerage (2023a)	Casca de Mandioca + Bagaço de Malte (1:1)	<i>A. niger</i>	Umidade 50%, 72 horas a 30 °C	5,33 U.mL ⁻¹
Rodrigues, D'Amico, Gerage (2023a)	Casca de Mandioca + Bagaço de Malte (1:1)	<i>Trichoderma reesei</i>	Umidade 50%, 96 horas a 30 °C	10,68 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>T. asperellum</i>	Umidade 80%, Granulometria 14 mesh; 28 ° C, por 168 horas	29,60 ± 2,42 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>A. niger</i>	Umidade 80%, Granulometria 10 mesh; 28 ° C, por 168 horas	87,01 ± 2,06 U.mL ⁻¹

Fonte: A autora (2025).

Os resultados observados no presente estudo demonstraram-se superiores quando comparados aos encontrados na literatura, especialmente quando inoculados com *A. niger*. De acordo com Tortora, Funke e Case (2017), tal microrganismo é reconhecido como um dos principais produtores de enzimas para a indústria, com ênfase à amilase. Além disso, sua versatilidade na produção de diversas enzimas e compostos bioativos torna o *A. niger* um microrganismo de grande importância na

biotecnologia industrial.

Contrariamente, ao observado nesta pesquisa, no estudo de Rodrigues, D'Amico e Gerage (2023a) o maior resultado obtido pelos autores através da fermentação com *A. niger* foi de 5,33 U.mL⁻¹, valor inferior quando comparado com a atividade enzimática verificada por eles em ensaios empregando *Trichoderma reesei*, que demonstraram até 10,68 U.mL⁻¹.

De acordo com Archer e Wood (1995) a produção e secreção de enzimas por fungos filamentosos envolvem mecanismos bioquímicos complexos, influenciados pela composição do meio de cultivo, de modo que, a presença de certos compostos no substrato podem induzir a expressão de genes específicos, levando à produção de enzimas necessárias para a degradação dos mesmos. Tal fato pode estar relacionado aos valores inferiores de amilases (5,33 U.mL⁻¹) observados no trabalho de Rodrigues, D'Amico e Gerage (2023a), quando comparadas composições distintas do substrato empregando o mesmo microrganismo.

Do mesmo modo, Battisti (2021) apresentou resultados relevantes (20,86 U.mL⁻¹) para produção de amilases através *Thermoascus aurantiacus* PI3S3, por meio da fermentação sólida de meio Vogel suplementado com casca de maracujá a 2%, demonstrando a importância da composição do meio combinado ao microrganismo e processo de fermentação.

O mesmo pode ser observado para enzimas celulolíticas. A expressão dessas enzimas, além de ser influenciada por fatores como temperatura e granulometria, também varia de acordo com o substrato e os microrganismos empregados no processo. De acordo com Castro (2015), fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e condições de cultivo, desempenham um papel crucial na modulação da expressão de genes específicos.

Nesse sentido, a presença de substratos específicos pode induzir a expressão de determinadas enzimas, enquanto a ausência ou presença de outros compostos pode reprimir essa expressão, favorecendo ora a expressão de endoglucanases, ora outras enzimas do complexo celulolítico. Além disso, mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações nas histonas, podem alterar a acessibilidade do DNA para a maquinaria transcricional, influenciando quais genes são expressos em resposta a sinais externos (Castro, 2015).

Em concordância, a Tabela 22 demonstra os dados obtidos no presente estudo, frente aos dados observados por outros autores em relação à produção de

CMCases.

TABELA 22 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À PRODUÇÃO DE CMCases POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

Referência	Meio de Cultivo	Inóculo	Condições	CMCases
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>A. niger</i> URM5741	Fermentação Submersa	0,07 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>A. niger</i> URM5741	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	0,37 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Submersa	0,07 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	0,54 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar Suplementado com Glicose (40g.L ⁻¹)	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	2,57 U.mL ⁻¹
Coelho <i>et al.</i> (2018)	Bagaço de coco verde	<i>Aspergillus</i> sp.	Fermentação em estado sólido; temperatura de 50°C; pH 5,0;	0,34 U.mL ⁻¹
Guedes (2019)	Fibra de sisal (50%) Farelo de Trigo (50%)	<i>Trichoderma reesei</i>	Fermentação em estado sólido, com 60% de umidade, 240 horas a 28 °C	0,46 U.mL ⁻¹
Guedes (2019)	Fibra de sisal 5% m/v e 50% Farelo de Trigo	<i>Trichoderma reesei</i>	Fermentação submersa incubada 240 horas a 28 °C	0,28 U.mL ⁻¹
Lima (2021)	Farelo de aveia	<i>Trichoderma spp.</i>	Fermentação em estado sólido com 80% de umidade a 28±2 °C por 240 horas	3,79 ± 0,11 U.mL ⁻¹
Santos (2018)	Farelo de trigo (60%) e palha de cana (40%)	<i>Aspergillus</i> sp. FSDE 16	Fermentação em estado sólido, com umidade 70%, 120 horas, 38 °C.	1,63 ± 0,01 U.mL ⁻¹
Tartarine (2018)	Palha de cana pré-tratada + farelo de soja	<i>Botryosphaeria</i> sp. AM01	Fermentação submersa incubada 144 horas a 28 °C.	3,66 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>T. asperellum</i>	Fermentação em estado sólido por 168 horas, umidade 80%, 14 mesh de granulometria, 32 °C	23,24 ± 1,42 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>A. niger</i>	Fermentação em estado sólido por 168 horas, umidade 70%, 12 mesh de granulometria, 30 °C	24,24 ± 0,43 U.mL ⁻¹

FONTE: A autora (2025).

Considerando os estudos de Coelho *et al.*, (2018) e Santos (2018), em comparação com os resultados obtidos neste trabalho, empregando *A. niger* como inóculo, observa-se uma forte relação da produção e secreção de CMCases, em função do microrganismo, pois embora todos pertençam ao mesmo gênero tratam-se

de espécies diferentes. Além disso, a composição, associada aos teores de umidade e temperatura também sugerem forte interferência. Os menores valores apresentados pelos autores podem estar relacionados às altas temperaturas empregadas nos processos fermentativos, 50 °C e 38° C, respectivamente. De acordo com Tortora, Funke e Case (2017), a temperatura ideal para o crescimento destes microrganismos varia em torno 25 e 35°C.

O mesmo pode ser verificado quando avaliados os resultados apresentados por Lima (2021), que observou valor inferior na síntese de CMCases ($3,79 \pm 0,11$ U.mL⁻¹) por *Trichoderma* spp, em condições de cultivo empregando maiores temperaturas e tempo de fermentação. Tais parâmetros podem ter resultado na inibição e redução da atividade enzimática, especialmente considerando o ensaio cinético realizado para síntese de CMCases por *T. asperellum* no presente estudo, que demonstrou redução da atividade a partir das primeiras 72 horas de processo.

A fermentação submersa realizada por Tartarine (2018) ($3,66$ U.mL⁻¹) apresentou valor semelhante ao observado por Lima (2021) ($3,79$ U.mL⁻¹), embora os processos empregados tenham sido distintos.

Além disso, Alves *et al.* (2020) obtiveram valores de CMCases expressivamente menores em ensaios de fermentação submersa ($0,07$ U.mL⁻¹), e sequencial ($0,36$ U.mL⁻¹) do bagaço de cana inoculados com *A. niger* URM5741, quando comparados aos obtidos neste estudo.

Guedes (2019) observou valores semelhantes a fermentação submersa realizada por Alves *et al.* (2020), avaliando a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo filamentosso *Trichoderma reesei* através de fermentação sólida utilizando fibra de sisal como substrato, incubado a 28 °C por 240 horas. No estudo, o ensaio realizado com 60% de umidade e 50% de farelo de trigo na composição do substrato apresentou a maior atividade enzimática para FPases, de $0,07$ U mL⁻¹.

No presente estudo, a síntese de CMCases se mostrou superior aos resultados observados na literatura, e semelhante entre *A. niger* ($24,24 \pm 0,43$ U.mL⁻¹) e *T. asperellum* ($23,24 \pm 1,42$ U.mL⁻¹), sob diferentes condições de umidade, temperatura e granulometria, empregando bagaço de malte como substrato. Dessa forma, os dados demonstram a importância de se avaliar todos os fatores envolvidos na fermentação, levando em consideração as necessidade do microrganismos, sua capacidade de expressão enzimática e as características do meio de cultivo.

Na Tabela 23 a produção de FPases é comparada com a literatura.

TABELA 23 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À PRODUÇÃO DE FPases POR FUNGOS FILAMENTOSOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

Referência	Meio de Cultivo	Inóculo	Condições	FPases
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>A. niger</i> URM5741	Fermentação Submersa	0,00 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>A. niger</i> URM5741	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	0,08 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Submersa	0,00 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	0,19 U.mL ⁻¹
Alves <i>et al.</i> (2020)	Bagaço de cana de açúcar Suplementado com Glicose (40g.L ⁻¹)	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	Fermentação Sequencial (Fermentação em estado sólido seguido de Fermentação Submersa)	1,24 U.mL ⁻¹
Guedes (2019)	Fibra de sisal (50%) Farelo de Trigo (50%)	<i>Trichoderma reesei</i>	Fermentação em estado sólido, com 60% de umidade, 240 horas a 28 °C	0,07 U.mL ⁻¹
Rodrigues, D'Amico, Gerage (2023b)	Farelo de trigo	<i>Trichoderma reesei</i>	Fermentação em estado sólido, com umidade 70%, 96 horas a 35 °C	6,38 U.mL ⁻¹
Gerage (2023b)	Farelo de trigo	<i>A. niger</i>	Fermentação em estado sólido, com umidade 60%, 84 horas a 32,5 °C	4,24 U.mL ⁻¹
Santos (2018)	Farelo de trigo (60%) e palha de cana (40%)	<i>Aspergillus sp.</i> FSDE 16	Fermentação em estado sólido, com umidade 70%, 120 horas, 38 °C.	0,09 ± 0,02 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>T. asperellum</i>	Fermentação em estado sólido por 168 horas, umidade 70%, 12 mesh de granulometria, 30 °C	35,46 ± 1,77 U.mL ⁻¹
Este estudo	Bagaço de Malte	<i>A. niger</i>	Fermentação em estado sólido por 168 horas, umidade 60%, 10 mesh de granulometria, 28 °C	33,68 ± 1,39 U.mL ⁻¹

FONTE: A autora (2025).

Os valores observados no presente estudo para FPases obtidos da fermentação em estado sólido do bagaço de malte de inoculado com *T. asperellum* de 35,46 ± 1,77 U.mL⁻¹, e inoculado com *A. niger* de 33,68 ± 1,39 U.mL⁻¹, foram bastante expressivos, apesar das diferentes condições de cultivos e microrganismos empregados. Além disso, se apresentaram superiores aos valores encontrados na literatura para combinações distintas de meios de cultivos, inóculos e condições de fermentação.

Rodrigues, D'Amico, Gerage (2023b) verificaram resultados consideráveis empregando farelo de trigo (4,24 U.mL⁻¹), quando comparado ao observado por

Santos (2018), que associou bagaço de cana ao farelo de trigo ($0,09 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$), ambos empregando *A. niger* como inóculo. Tais dados sugerem relevância no meio de cultivo empregado para síntese dessas enzimas, especialmente em função da disponibilidade de nutrientes essenciais ao desenvolvimento de microrganismos.

As condições de fermentação também demonstram relevância no que tange à obtenção de FPases, frente a literatura. Alves *et al.*, (2020), observaram valores pouco expressivos na síntese de celulases totais através de processos de fermentação submersa ($0,00 \text{ U.mL}^{-1}$), enquanto, segundo os autores, o método de cultivo sequencial melhorou tanto a assimilação do bagaço de cana-de-açúcar, quanto a morfologia do crescimento fúngico, proporcionando aumento na produtividade dessas enzimas, especialmente quando inoculado com *A. japonicus* URM5620 ($0,19 \text{ U.mL}^{-1}$) e suplementado com glicose ($1,24 \text{ U.mL}^{-1}$).

Esses resultados destacam o bagaço de malte como um substrato eficaz para a produção de FPases, através de processos de fermentação em estado sólido, evidenciando a importância da escolha adequada do meio de cultivo e das condições de fermentação para maximizar a síntese enzimática.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a caracterização do subproduto proveniente da indústria cervejeira e avaliação do seu potencial biotecnológico para aplicação em processos fermentativos em estado sólido visando a obtenção de amilases e celulasas a partir de *A. niger* e *T. asperellum*.

A composição do bagaço de malte observada neste estudo revelou elevados teores de carboidratos ($48,29 \pm 0,15\%$), proteínas ($10,62 \pm 0,08\%$) e lipídios ($8,42 \pm 0,11\%$), os quais representam componentes fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento de microrganismos. Indicando o potencial nutricional do subproduto como substrato para processos biotecnológicos, especialmente em fermentações conduzidas por fungos filamentosos.

A atividade de amilases demonstrou valores expressivos, que atingiram $87,01 \pm 2,06 \text{ U.mL}^{-1}$, nas fermentações inoculadas com *A. niger*, sob condições específicas de umidade (80%), granulometria (10 mesh) e temperatura (28 °C), destacando o microrganismo como potencial produtor desta classe de enzimas.

Por outro lado, os resultados observados nas análises de CMCases e FPases demonstraram-se relativamente próximos para ambos microrganismos. Enquanto para as CMCases, os melhores rendimentos foram observados nos tratamentos com *A. niger*, especialmente nas condições centrais do planejamento experimental (70% de umidade, 12 mesh, 30 °C), com produção variando entre $23,10 \pm 0,34 \text{ U.mL}^{-1}$ e $26,72 \pm 0,45 \text{ U.mL}^{-1}$. Para FPases os maiores níveis foram alcançados nos ensaios inoculados com *T. asperellum*, também em condições centrais, com valores que variaram entre $24,92 \pm 1,87 \text{ U.mL}^{-1}$ e $35,46 \pm 1,77 \text{ U.mL}^{-1}$.

Com relação a temperatura, umidade e granulometria, através do planejamento experimental e avaliação estatística dos dados, pode-se concluir que, tanto individualmente quanto a interação dupla ou tripla dos fatores, podem influenciar significativamente a obtenção de amilases e celulasas. No entanto, no caso das amilases, outros fatores devem ser considerados durante o planejamento experimental, a fim de otimizar os processos de fermentação. Enquanto para as celulasas, foi observada presença de curvatura nos dados, sugerindo que os modelos lineares ajustados aos dados experimentais não são suficientes para descrever adequadamente as respostas observadas.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração refere-se a

cinética de produção de cada uma das enzimas avaliadas. Picos de atividade amilolítica foram observadas com 96 horas e 144 horas de fermentação por *A. niger* e *T. asperellum*, respectivamente. Enquanto a atividades de CMCases e FPases se manteve estável por períodos mais longos para os dois microrganismos testados.

Por fim, a obtenção de enzimas amilolíticas e celulolíticas através da fermentação em estado sólido do bagaço de malte apresenta-se promissora na busca de alternativas sustentáveis para a destinação adequada do resíduo associada a ganhos econômicos em função da obtenção de biocompostos com alto valor agregado.

5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros a caracterização do bagaço de malte através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) se faz necessária, a fim de realizar a caracterização lignocelulósica do subproduto.

Além disso, considerando os resultados observados nos dados estatísticos, surge como perspectiva também a condução de novos experimentos utilizando modelos com termos quadráticos, como planejamentos de superfície de resposta, (planejamento central composto), visando capturar os efeitos não lineares observados.

Sugere-se ainda o refinamento dos níveis experimentais dessas variáveis, com maior resolução e inclusão de pontos intermediários, bem como a investigação de novos fatores que possam influenciar as variáveis resposta. A adoção desses modelos permitirá uma análise mais flexível e robusta dos dados, garantindo resultados mais representativos para o estudo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, B.A; KHUDOR, M.H; ALKHURSAN, R.N. Poultry feed fungi: a practical guide. A practical guide. 2021.
- ABDEL-AZEEM, A. M., *et al.* *Aspergillus*: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications. **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives**, p. 121-179, 2019.
- AFONSO, S. de O. M. ***Aspergillus niger*: sua utilização na indústria farmacêutica.** Dissertação de Mestrado. Egas Moniz School of Health & Science (Portugal). 2015.
- AGRÁRIA. **Agrária Malte.** Guarapuava - PR. 2024.
- AIYER, P. V. D. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004.
- ALEIXO-JÚNIOR, M. E. **Produção e caracterização de enzimas produzidas por *Penicillium sp* FSDE 15 usando bagaço de malte.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2018.
- ALVES, J. N. **Caracterização físico-química do bagaço de malte: abordagem experimental e suas possibilidades de aproveitamento.** Monografia (Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul). Porto Alegre. 2023.
- ALVES, L. M. F. **Análise físico-química de cervejas tipo pilsen comercializadas em Campina Grande na Paraíba.** Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). 2014. Universidade Estadual da Paraíba – Departamento de Química, Campina Grande, 2014.
- ALVES, R. O. *et al.* Produção de celulasas por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. *Revista Geama*, v. 6, n. 1, p. 44-50, 2020.
- ANDRADE, E. S. P., *et al.* **Produção de proteases e celulasas fúngicas a partir do engaço de uva.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa - PB. 2022.
- APROLÚPULO, **Mapa do Lúpulo Brasileiro 2023.** Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo. Lages. Santa Catarina. 2024.
- AQUARONE, E., *et al.* Produção de Etanol. In: *Biotecnologia Industrial*. Vol. 3. (4. ed.). São Paulo: Edgar Blücher Ltda. p. 9-11. 2001.
- ARAÚJO, L. A. **Cinética da produção de amilases produzido por *Aspergillus sp.* FSDE16 em bagaço de malte.** 2018.

ARCHER, D. B.; WOOD, D. A. Fungal exoenzymes. In: GROW, N.A.R. and GADD, G.M. (Eds). *The growing fungus*. London: Chapman & Hall. p. 137-162. 1995.

BARBOSA, L. M. **A produção de cerveja ao longo da história**. Trabalho de conclusão de curso (Técnico em alimentos integrado ao ensino médio)-Instituto Federal de São Paulo-Campus Barretos, 2018.

BATISTA, E. L. A. **Cerveja artesanal: Uma revisão sobre o seu processo de produção e seu potencial antioxidante**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). 2021. Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2021.

BATTISTI, J. de A. **Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* - cepa PI3S3 - Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas**. 105 f. Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2021.

BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. *Revista Unimontes Científica*, v. 20, n. 1, p. 150-169, 2018.

BEZERRA, F. C., *et al.* **Produção e caracterização da amilase de um novo isolado de *Aspergillus sp.* em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**. Monografia. Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2022.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*, 1997, 15.3-4: 583-620.

BIAZOTTO, A. D. M. **Uso de adjuntos não-convencionais na produção de cerveja**. (Trabalho de conclusão de especialização - Pós-graduação *Latu Sensu* em Tecnologia Cervejeira - IQAR). Araraquara - SP. 2024

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORZANI, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Vol. III. São Paulo: Edgard Blücher, 1993.

BORZANI, W., *et al.* **Biotecnologia industrial: fundamentos**. Vol. I. São Paulo. Editora Blucher, 2001.

BRAZILIAN FARMERS. Rise of hops production in Brazil: heading towards the top of Latin America. 2023.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen—total. **Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties**, v. 9, p. 595-624, 1982.

BRUGGER, M. M. Lúpulos para produção cervejeira e o processo de dry Hopping: uma revisão da literatura. 2024.

BRUNELLI, L. T. **Produção de cerveja com mel: Características físico-químicas, energética e sensorial.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

BRUST, L. A. C., *et al.* Enfermidades em bovinos associadas ao consumo de resíduos de cervejaria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 956-964, 2015.

CAETANO, M. F., *et al.* Caracterização química do bagaço de malte proveniente do processo produtivo cervejeiro. **Anais do CENAR**, v. 3, p. 24-24, 2018.

CARRERA-PARRA, A. B. Uso de *Trichoderma* sp como agente biocontrolador de Botrytis cinerea en una plantación de fresa (*Fragaria* sp) ubicada en la parroquia Valparaíso Cantón Guano. Monografía. Escola Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. 2022.

CARVALHO, L. G. Dossiê Técnico. Produção de cerveja. **Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2007.

CASTRO, A. M.; PEREIRA-JUNIOR, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CASTRO, L. dos S. **Análise global da expressão gênica durante a formação de celulasas pelo fungo *Trichoderma reesei*.** 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

CATALOGUE OF LIFE. (2025). Annual Checklist.

CAVALCANTE, P. A. W., *et al.* Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CÉSPEDES VILLALBA, F. D., *et al.* **Análise de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético de resíduos gerados na Indústria Cervejeira.** Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu. 2022.

CHIMINI, A. C., *et al.* Resíduos da indústria cervejeira na produção de novos substratos para o cultivo do cogumelo ganoderma lucidum. **Energia na Agricultura**, v. 35, n. 2, p. 265-275, 2020.

COELHO, G. D., *et al.* Produção e Caracterização da Celulase (CMCase) por Fungo Isolado da Fase Termofílica de um Processo de Compostagem em Fermentação em Estado Sólido Tendo Bagaço de Coco Verde como Substrato. **Revista Saúde e Ciência**, v. 7, n. 2, p. 323-338, 2018.

CORONADO, M. A., *et al.* Physicochemical characterization and SEM-EDX analysis of brewer's spent grain from the craft brewery industry. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7744, 2020.

CRIPWELL, R. A.; VAN ZYL, W. H.; VILJOEN-BLOOM, M. Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications. *Journal: Encyclopedia of Mycology*, p. 326-336, 2021.

DE FRANÇA, Í. B.; DA SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 51331-51345, 2021.

DIAS, A. da S. **Produção de celulasas por fungos filamentosos isolados de solo do bioma cerrado visando aplicação em biocombustíveis**. Monografia (Universidade Estadual Paulista (Unesp)). São Paulo. 2024.

DIAS, E. da S. C. **Fungos filamentosos isolados em bioma Cerrado para produção de amilase**. Monografia (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)), Ilha Solteira - SP. 2025.

DÍAZ, G. V., *et al.* *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. **Mycology**, v. 12, n. 3, p. 160-173, 2021.

DRAGONE, G.; SILVA, T. A. de O.; SILVA, J. B. de A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016. Cap. 3. p. 51-84.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol.**, v. 24, p. 89- 98, 1998.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. Documentos 54. EMBRAPA. São Carlos. 2011.

FERREIRA, P. S. *et al.* Obtenção e caracterização da farinha de bagaço de malte. In: **Congresso on-line Brasileiro de Tecnologias de Cereais e Panificação**. 2020.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure Appl Chem**; 59: 257-268, 1987.

GOLDIN, A. Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 18, n. 10, p. 1111-1116, 1987.

GONÇALVES, L. A. **Produção e caracterização de amilase secretada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Engenharia - UNESP. Ilha Solteira. 2019.

GUEDES, C. A. L. **Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fermentação sólida e fermentação submersa em fibra de sisal (*Agave sisalana*) utilizando *Trichoderma reesei***. 2019. 135f. (Tese de Doutorado) Programa de

Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande - Paraíba - Brasil, 2019.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

IBGE. Cevada – Produção agropecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: IMESP**, 1985.

IUBMB. **Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc**. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Reino Unido. 2024.

JAKLITSCH, W.M. European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. **Stud Mycol**. v. 63, p.1–91, 2009.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic actives of multi-enzymatic complex system from *penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food chemistry**. 2008.

KERBER, C. M. da C. **Trichoderma koningiopsis 20I2A1M: produção de enzimas do complexo hemicelulolítico e aplicação na sacarificação do bagaço de cevada**. 2020. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR.

KUBICEK, C.P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I.S. Fungal genus *Hypocrea* / *Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal Zhejiang University Science B**. v. 9, p. 753–763, 2008.

KUDDUS, M. (Ed.). Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects. 2018.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 5. Ed. Berlin: VLB Berlim, p. 17. 2014.

LEMOS, D. G. de L. **Utilização de bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de *Aspergillus* spp. isolados de amostras do solo da caatinga de Pernambuco**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. Recife. 2021.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier Editora, 1995.

LENTZ, M. The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 20, 2018.

LIMA, K. C. V. de. **Produção de Celulases por Isolados de *Trichoderma* spp. 2022. 34f.** Monografia (Bacharelado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2021.

LIMA, R. C. F. **Produção de enzimas alfa-amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias). Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Alegre. 2019.

LINS, S. A. da S. **Produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo sacarino.** 2017. 125f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. 2017

LONSANE, B. K., *et al.* Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7.6: 258-265, 1985.

LÓPEZ-PÉREZ, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: present status and perspectives. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1224-1231, 2016.

LOURENÇO, J. M. Utilização de enzimas nos processos industriais para fabricação de cervejas. 2022.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell. concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 467 - 475, 2002.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Thichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, p. 274–288, 2012.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja.** Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 133, 2006.

MACIEL, M. Do campo ao copo, a cerveja rende um papel vital na economia brasileira, **SINDICERV**. Brasília. 2023.

MASSARDI, M. M.; MASSINI, R. M. M.; DE JESUS SILVA, D. Caracterização química do bagaço de malte e avaliação do seu potencial para obtenção de produtos de valor agregado. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. 0083-0091, 2020.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. A cerveja no Brasil: Anuário da cerveja 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2020.

MARCUSSO, E. F.; OLIVEIRA, V. C. de. Anuário da cerveja 2024. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2024.

MARTINS, I. M. N. B. R. Produção e caracterização de celulases e hemicelulases obtidas por cultivo de fungos mesófilos em resíduos agroindustriais. 2019. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P.; SERVULO, E. F. C. **Caracterização de Resíduos Cervejeiros**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

MCKELVEY, S. M., MURPHY, R. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: KAVANAGH, K. (Org.). *Fungi: Biology and Applications*. 3 ed. Wiley Blackwell, 2018. p. 201-226.

MEIER, H. BarthHaas Report 2023/2024: **Beer industry under pressure worldwide/Beer production down slightly**. 2024.

MEYER, M. C., MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. "*Trichoderma*: uso na agricultura." EMBRAPA. Brasília. 2019.

MICHEL, M. *et al.* Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 569-587, 2016.

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

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. Editora Springer. 2006.

MOSHER, M.; TRANTHAM, K. **Brewing science: A multidisciplinary approach**. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2017.

MORADO, R. **Larousse da cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. (1ª ed.). São Paulo: Alaúde Editorial, 2017.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264-1275, 2014.

SCHOCH, C. L., *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*, 2020. baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

MOURA, J. D. de., *et al.* **Produção de lipases fúngicas por fermentação em estado sólido para tratamento de efluentes de laticínio**. In: CONGRESSO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 17., 2020, Poços de Caldas. Anais Poços de Caldas. 2020.

NETO, J. dos S., *et al.* Efeito de trichoderma asperellum na produção de mudas de alface crespa. **Revista Agrotecnologia-Agrotec**, v. 15, n. FluxoCont, p. 86-95, 2024.

OLIVEIRA, J. B. de. **Desenvolvimento de bioprocesso utilizando fungos filamentosos amazônicos, visando aplicação no pré-tratamento biológico de biomassas vegetais**. 2023. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2023.

OLIVEIRA, R. M. de. **Produção de hidrolases por leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos**. Monografia (Universidade Federal do Tocantins). Palmas - TO. 2019.

PALMA, M. B. **Produção de Xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 188, 2003.

PANDEY, A. Aspects of Fermenter Design for Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 335-361, 1991.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN. E.C.S. **Microbiologia**. v. 1. Rio de Janeiro: MAKRON Books, 1980.

PELENZ, A. **Produção de celulases a partir de capim elefante (pennisetum purpureum) por fermentação em estado sólido**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.

PEREIRA, A. C. de S.; MATHIAS, T. R. dos S.. **Avaliação da imobilização de bactérias lácticas em bagaço de malte**. Trabalho de Conclusão de Curso Pf(Ciências Biológicas com habilitação em biotecnologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2019.

PEREIRA, J L.; SILVA, M. T. Fungal Biotechnology: Industrial Applications and Market. 1. ed. New York: Springer, p. 2018.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Methods for the assessment of soil fungi. Chap. 8. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **A handbook of tropical soil biology: sampling & characterization of below-ground biodiversity**. London. Earthscan, 2008.

PIFFER, L., *et al.* **Avaliação da utilização do bagaço de malte cervejeiro como carga em espuma de poliuretano**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). Porto Alegre. 2024.

PINA, R. L., CRUZ; D. C. P.; MARTELLI, M. C. Avaliação da influência de aromas gerados por leveduras não convencionais utilizadas na produção de cerveja: uma revisão. **Research, Society And Development**, v. 11, n. 17, 2022.

- PINHEIRO, T., *et al.* Intensifying ethanol production from brewer's spent grain waste: Use of whole slurry at high solid loadings. **New Biotechnology**, v. 53, n. April 2018, p. 1–8, 2019.
- POLASTRI, P., *et al.* Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de malte para produção de energia renovável. 6º Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade. Foz do Iguaçu. 2023.
- QIN, F.; JOHANSEN, A. Z.; MUSSATTO, S. I. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. **Industrial crops and products**, v. 125, p. 443-453, 2018.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.
- REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.
- RÊGO, P. S.; BRITO, J. G. L. de. Produção e caracterização de farinha de bagaço de malte a partir de resíduo cervejeiro. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 958-963. Garanhuns, PE: Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas. 2021.
- REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. 1.ed. São Paulo: ADEN, 1997. p. 149.
- RIBEIRO, J. V. S., *et al.* **Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma amilase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola***. 2022.
- RIBEIRO, M. M., *et al.* **Processos Fermentativos para Produção de Amilases por *Penicillium sp.*** 2019.
- ROCHA, B. C. Avaliação da termoestabilidade e das condições de extração das amilases produzidas por *Aspergillus sp. fsde16* em bagaço de malte. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química) Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2019.
- RODELLA, A.A., ALCARDE, J.C. Avaliação de materiais orgânicos empregados como fertilizantes. **Sci. Agric.**, 51:556-562, 1994.
- RODRIGUES, E. M. G. Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 11, n. 1, p. 46-57, 2021.
- RODRIGUES, E. M. G. Produção de amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e determinação do pH e temperatura ótimos na atividade enzimática. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 12, n. 1, p. 08-20, 2022.

- RODRIGUES, E. M. G.; D'AMICO C. de C.; GERAGE, K. R. G. Estudo comparativo da produção de amilases utilizando como substrato subprodutos agroindustriais. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 13, n. 1, p. 8-21, 2023a.
- RODRIGUES, E. M. G.; D'AMICO C. de C.; GERAGE, K. R. G. Produção de celulases por fungos filamentosos utilizando fermentação em estado sólido. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 13, n. 2, p. 32-44, 2023b.
- SANDHYA, C., *et al.* Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.
- SANTANA, F. R., *et al.* **Resíduo úmido cervejeiro como substrato para obtenção de extrato enzimático amilásico por *Aspergillus niger* NCQS 40371**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2021.
- SANTOS, F. A. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com hidróxido de sódio**. Monografia. Engenharia Química. Universidade Federal do Paraíba. João Pessoa. 2018.
- SANTOS, L. V. de A. **Aplicações de Enzimas Pectinolíticas - do Laboratório à Indústria: Revisão de Literatura**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química - Universidade Federal da Paraíba). João Pessoa. 2023.
- SCHMIDELL, W., *et al.* Fermentação em estado sólido. In: Biotecnologia industrial. Vol. 2: Engenharia Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, p. 519-543. 2021.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.
- SILVA, L. C., *et al.* **Utilização da fermentação em estado sólido para valorização do bagaço de malte: uma revisão bibliográfica**. In: Engenharia de alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos-volume 1. Editora Científica Digital, 2024. p. 226-240.
- SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5a. Edição. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 1995.
- STEYAERT, J. M., *et al.* Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 156, n. 10, p. 2887-2900, 2010.
- SOCCOL, C. R. *et al.* Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.
- TAKAHASHI, J. A., *et al.* Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, 2018.
- TARTARINE, N. **Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Biotecnologia IQ. UNESP. São Paulo. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12^a. ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 12, 2017.

TYŚKIEWICZ, R., *et al.* *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth.

International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 4, p. 2329, 2022.

VIEIRA, F. J. A. Desenvolvimento de embalagem biodegradável ativa contendo extrato de bagaço de malte e sua aplicação em queijo tipo prato fatiado. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ponta Grossa. 2022.

ZHANG, W., *et al.* Production of *Aspergillus niger* cellulase using defatted rice bran and its use in lignocellulosic saccharification reaction. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 115003, 2025.

ZUCCONI, F.; BERTOLDI, M. de. Specifications for solid waste compost. **BioCycle** (USA), 1987.

YIN, W. T., *et al.* Mashing performance as a function of malt particle size in beer production. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 21, p. 5372-5387, 2023.

WILLEY, J., M.; SHERWOOD, L. M.; WOOLVERTON, C. J. **Prescott, Harley, and Klein's microbiology**. McGraw-Hill, 2008.

APÊNDICE 1 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE

Os ensaios de caracterização do bagaço de malte foram realizados em triplicatas.

1 pH

O pH foi determinado de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (1985). Uma suspensão contendo 1 g da amostra sólida e 10 mL de água deionizada foi preparada e previamente homogeneizada. Em seguida a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos e então, mensurado o pH em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões.

2 Umidade

Para análise de umidade pesaram-se 2 g da amostra em cadinhos previamente secos e aferidos. As amostras foram secas em estufa a 105 °C até atingir peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 1985). A umidade, em base úmida, foi determinada conforme a Equação 1.

$$U_{x.b.u} = \frac{(massa\ inicial - massa\ final\ da\ amostra)}{massa\ inicial\ da\ amostra} \cdot 100 \quad (1)$$

Considerando:

$U_{x.b.u}$ = Umidade em base úmida (%).

3 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado através da incineração da amostra em mufla conforme descrito pelo método do Instituto Adolfo Lutz (1985). Cadinhos de porcelana vazios e limpos foram depositados em mufla e deixados a 550 °C, durante 15 minutos. Após o preparo dos cadinhos, os mesmos foram deixados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados vazios. Pesou-se cerca de 2 gramas da amostra e levou-se a mufla durante 6 horas, a 550 °C, até obter a cinza clara. Após,

as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente por 2 horas e pesadas. O teor de cinzas foi determinado conforme a Equação 2.

$$\text{Teor de Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \cdot 100 \quad (2)$$

4 Teor de Matéria orgânica (MO)

Para determinar o teor de matéria orgânica foi realizada uma secagem preliminar das amostras em estufa a 105 °C, por um período de 24 h, visando eliminar toda a água presente nos resíduos (Rodella e Alcarde, 1994). Em seguida, foram pesadas as amostras nos cadinhos de porcelana, previamente preparados, e incineradas a uma temperatura de 550 °C, por 3 h. Após este período, os cadinhos foram adicionados em um dessecador e posteriormente, pesados conforme descrito por Goldin (1987).

O teor da matéria orgânica se dá pela perda da massa do resíduo que foi incinerado, considerando-se o material perdido pela queima no intervalo de variação da temperatura de 105 °C a 550 °C, sendo estimado por meio da Equação 3:

$$MO = \frac{(P-(T-C))}{P} * 100 \quad (3)$$

Em que:

MO (%) = Teor de matéria orgânica (%);

P = peso da amostra (g) depois de aquecida a 105 °C descontando o peso do cadinho;

C = peso do cadinho vazio (g);

T = peso da cinza e cadinho (g).

5 Teor de carbono

A quantificação de teor de carbono foi realizada a partir do valor determinado para a matéria orgânica conforme Zucconi e De Bertoldi (1987), segundo a Equação 4:

$$C = MO * 0,5 \quad (4)$$

Sendo:

C = Teor de Carbono Total (%);

MO = Teor de Matéria Orgânica (%).

6 Teor de nitrogênio

O nitrogênio foi determinado através do método de Kjeldahl, seguindo a metodologia descrita por Bremner e Mulvaney (1982). Inicialmente pesou-se 1 g do bagaço de malte moído e colocou-se no tubo de digestão. Adicionou-se 1,1 g da mistura digestora composta por sulfato de cobre e sulfato de potássio, e 4 mL de H₂SO₄ concentrado. Foram preparados dois tubos de digestão para o branco apenas com a mistura catalisadora e ácido sulfúrico. Os tubos foram condicionados a um bloco digestor no qual aumentou-se gradativamente a temperatura num intervalo de 50 °C, até atingir a temperatura de 385 °C, mantendo essa temperatura até a amostra ficar na cor azulado-transparente.

Para a destilação, a amostra digerida foi colocada no destilador de nitrogênio, onde a amostra foi aquecida previamente. Adicionou-se 25 mL da solução NaOH (40%), no qual foi liberado o nitrogênio na forma de gás, este gás foi recolhido após passar no condensador em 100 mL de ácido bórico 4% e 5 gotas dos indicadores verde de bromocresol 0,1% e vermelho de metila 0,2%, e então foi realizada a titulação com HCl, cujo volume gasto foi anotado para posterior cálculo. Com os dados calculou-se a concentração do nitrogênio utilizando-se a Equação 5:

$$N = \frac{(Mac * 28 * Vac)}{m} * 1000 \quad (5)$$

Em que:

N – Concentração de nitrogênio da amostra em g kg⁻¹;

Mac – concentração da solução padronizada de ácido sulfúrico, em mol L⁻¹;

Vac – volume da solução padronizada ácido sulfúrico gasto na titulação, em mL;

m – Massa da amostra digerida, em mg;
 28 – Equivale a duas vezes a massa de N (14 g).

7 Teor de Proteínas

O teor de proteína foi determinado pela Equação 5 levando em consideração o teor de nitrogênio obtido por meio da Equação 6:

$$P = N * 6,25 \quad (6)$$

Onde:

P = teor de proteína da amostra (%);

N = teor de nitrogênio da amostra (%);

6,25 = fator multiplicador para expressar o conteúdo de nitrogênio como conteúdo de proteína bruta.

8 Teor de Lipídios

Para determinação de lipídios foram pesadas 50 g da amostra homogeneizada e transferida para um béquer de 500 mL. Em seguida, foram adicionados 50 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol. Seguido de mais uma adição de 50 mL de clorofórmio e 50 mL de água. A solução foi agitada com o auxílio de um agitador mecânico, por 15 minutos, em capela de exaustão de gases. Posteriormente o material homogeneizado foi filtrado utilizando funil de vidro com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um funil de separação de 500 mL. Após completa separação e clarificação, a camada de clorofórmio (inferior) foi transferida para um balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, previamente tarado. O solvente foi evaporado em um rota-evaporador até sua completa remoção. O balão foi transferido para uma estufa a 105 °C por 1 hora, resfriado em dessecador e pesado até o peso constante conforme metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Posteriormente o teor de lipídeos foi determinado segundo a Equação 7:

$$L = \frac{N * 100}{P} \quad (7)$$

Sendo:

L (%) = Teor de Lípidos;

P = massa da amostra em g;

N = (massa do balão + massa óleo) - massa do balão.

9 Teor de carboidratos

Por meio dos teores de proteínas e lipídios, o teor de carboidratos foi estimado por diferença conforme o Instituto Adolfo Lutz (1985), através da Equação 8.

$$\text{Carboidratos}(\%) = 100 \% - P(\%) - L(\%) - U(\%) - \text{Teor de Cinzas}(\%) \quad (8)$$

Em que:

P (%) = Teor de Proteína;

L (%) = Teor de Lípidos;

U (%) = Teor de Umidade.

APÊNDICE 2 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³

TABELA 1 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	93,063	1	93,063	7,0196	0,017489
<i>Granulometria (2)</i>	<i>397,232</i>	<i>1</i>	<i>397,232</i>	<i>29,9626</i>	<i>0,000051</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>2540,395</i>	<i>1</i>	<i>2540,395</i>	<i>191,6181</i>	<i>0,000000</i>
1*2	150,300	1	150,300	11,3369	0,003924
1*3	3490,164	1	3490,164	263,2577	0,000000
2*3	858,728	1	858,728	64,7725	0,000001
1*2*3	1854,690	1	1854,690	139,8964	0,000000
Erro Puro	212,122	16	13,258		
Total SQ	9596,694	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,98.

FONTE: Autora (2025).

TABELA 2 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	137,7604	1	137,7604	265,3938	0,000000
<i>Granulometria (2)</i>	<i>62,4037</i>	<i>1</i>	<i>62,4037</i>	<i>120,2201</i>	<i>0,000000</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>24,3613</i>	<i>1</i>	<i>24,3613</i>	<i>46,9319</i>	<i>0,000004</i>
1*2	76,8268	1	76,8268	148,0060	0,000000
1*3	30,1504	1	30,1504	58,0844	0,000001
2*3	20,4980	1	20,4980	39,4892	0,000011
1*2*3	156,7748	1	156,7748	302,0249	0,000000
Erro Puro	8,3053	16	0,5191		
Total SQ	517,0808	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,98.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 3 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	7,605	1	7,605	4,9071	0,041600
<i>Granulometria (2)</i>	<i>1087,164</i>	<i>1</i>	<i>1087,164</i>	<i>701,4943</i>	<i>0,000000</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>60,072</i>	<i>1</i>	<i>60,072</i>	<i>38,7614</i>	<i>0,000012</i>
1*2	9,741	1	9,741	6,2854	0,023340
1*3	2,095	1	2,095	1,3515	0,262066
2*3	6,479	1	6,479	4,1807	0,057701
1*2*3	0,373	1	0,373	0,2404	0,630602
Erro Puro	24,797	16	1,550		
Total SQ	1198,325	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,98.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 4 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	1,990	1	1,9895	0,3563	0,558929
<i>Granulometria (2)</i>	<i>68,580</i>	<i>1</i>	<i>68,5802</i>	<i>12,2815</i>	<i>0,002936</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>64,059</i>	<i>1</i>	<i>64,0593</i>	<i>11,4719</i>	<i>0,003762</i>
1*2	971,681	1	971,6810	174,0107	0,000000
1*3	3,219	1	3,2193	0,5765	0,458719
2*3	0,098	1	0,0975	0,0175	0,896503
1*2*3	20,739	1	20,7390	3,7140	0,071907
Erro Puro	89,344	16	5,5840		
Total SQ	1219,710	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,93.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 5 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	36,5807	1	36,5807	63,6375	0,000001
<i>Granulometria (2)</i>	<i>244,9287</i>	<i>1</i>	<i>244,9287</i>	<i>426,0896</i>	<i>0,000000</i>
<i>Temperatura (3)</i>	<i>45,8437</i>	<i>1</i>	<i>45,8437</i>	<i>79,7519</i>	<i>0,000000</i>
1*2	261,6901	1	261,6901	455,2485	0,000000
1*3	11,5787	1	11,5787	20,1429	0,000373
2*3	102,3001	1	102,3001	177,9661	0,000000
1*2*3	132,2112	1	132,2112	230,0009	0,000000
Erro Puro	9,1973	16	0,5748		
Total SQ	844,3305	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,99.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 6 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	42,6133	1	42,6133	47,5894	0,000004
Granulometria (2)	1,7931	1	1,7931	2,0024	0,176214
<i>Temperatura (3)</i>	<i>247,8123</i>	<i>1</i>	<i>247,8123</i>	<i>276,7499</i>	<i>0,000000</i>
1*2	0,1441	1	0,1441	0,1610	0,693561
1*3	16,1048	1	16,1048	17,9854	0,000623
2*3	7,4817	1	7,4817	8,3553	0,010648
1*2*3	7,0200	1	7,0200	7,8398	0,012842
Erro Puro	14,3270	16	0,8954		
Total SQ	337,2963	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,96.

FONTE: A autora (2025).

APÊNDICE 3 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³ COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

TABELA 1 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	93,06	1	93,063	0,58187	0,452192
Granulometria (2)	397,23	1	397,232	2,48369	0,126678
<i>Temperatura (3)</i>	<i>2540,40</i>	<i>1</i>	<i>2540,395</i>	<i>15,88380</i>	<i>0,000460</i>
1*2	150,30	1	150,300	0,93975	0,340946
1*3	3490,16	1	3490,164	21,82223	0,000074
2*3	858,73	1	858,728	5,36919	0,028319
1*2*3	1854,69	1	1854,690	11,59644	0,002082
Falta de Ajuste	191,62	1	191,623	1,19812	0,283367
Erro Puro	4318,28	27	159,936		
Total SQ	13894,47	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,67.

FONTE: Autora (2025).

TABELA 2 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	<i>693,781</i>	<i>1</i>	<i>693,7813</i>	<i>574,0359</i>	<i>0,000000</i>
Umidade (1)	137,760	1	137,7604	113,9832	0,000000
Granulometria (2)	62,404	1	62,4037	51,6330	0,000000
<i>Temperatura (3)</i>	<i>24,361</i>	<i>1</i>	<i>24,3613</i>	<i>20,1566</i>	<i>0,000120</i>
1*2	76,827	1	76,8268	63,5667	0,000000
1*3	30,150	1	30,1504	24,9465	0,000031
2*3	20,498	1	20,4980	16,9601	0,000323
1*2*3	156,775	1	156,7748	129,7158	0,000000
Erro Puro	32,632	27	1,2086		
Total SQ	1235,189	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,97.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 3 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *A. niger* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	<i>328,320</i>	<i>1</i>	<i>328,320</i>	<i>102,0636</i>	<i>0,000000</i>
Umidade (1)	7,605	1	7,605	2,3641	0,135790
Granulometria (2)	1087,164	1	1087,164	337,9623	0,000000
<i>Temperatura (3)</i>	<i>60,072</i>	<i>1</i>	<i>60,072</i>	<i>18,6742</i>	<i>0,000188</i>
1*2	9,741	1	9,741	3,0281	0,093220
1*3	2,095	1	2,095	0,6511	0,426767
2*3	6,479	1	6,479	2,0142	0,167279
1*2*3	0,373	1	0,373	0,1158	0,736270
Erro Puro	86,854	27	3,217		
Total SQ	1588,703	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,94.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 4 - ANOVA PARA SÍNTESE DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
Umidade (1)	1,990	1	1,9895	0,11261	0,739784
Granulometria (2)	68,580	1	68,5802	3,88182	0,059147
Temperatura (3)	64,059	1	64,0593	3,62593	0,067593
1*2	<i>971,681</i>	<i>1</i>	<i>971,6810</i>	<i>54,99971</i>	<i>0,000000</i>
1*3	3,219	1	3,2193	0,18222	0,672854
2*3	0,098	1	0,0975	0,00552	0,941317
1*2*3	20,739	1	20,7390	1,17388	0,288186
Falta de Ajuste	7,980	1	7,9800	0,45169	0,507244
Erro Puro	477,010	27	17,6670		
Total SQ	1615,355	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,70.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 5 - ANOVA PARA SÍNTESE DE CMCases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	<i>62,403</i>	<i>1</i>	<i>62,4031</i>	<i>6,87778</i>	<i>0,014171</i>
Umidade (1)	36,581	1	36,5807	4,03176	0,054753
Granulometria (2)	<i>244,929</i>	<i>1</i>	<i>244,9287</i>	<i>26,99491</i>	<i>0,000018</i>
Temperatura (3)	<i>45,844</i>	<i>1</i>	<i>45,8437</i>	<i>5,05268</i>	<i>0,032958</i>
1*2	<i>261,690</i>	<i>1</i>	<i>261,6901</i>	<i>28,84228</i>	<i>0,000011</i>
1*3	11,579	1	11,5787	1,27615	0,268552
2*3	<i>102,300</i>	<i>1</i>	<i>102,3001</i>	<i>11,27505</i>	<i>0,002350</i>
1*2*3	<i>132,211</i>	<i>1</i>	<i>132,2112</i>	<i>14,57171</i>	<i>0,000716</i>
Erro Puro	244,975	27	9,0731		
Total SQ	1142,511	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,78.

FONTE: A autora (2025).

TABELA 6 - ANOVA PARA SÍNTESE DE FPases POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO INOCULADO COM *T. asperellum* CONSIDERANDO AS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	<i>5153,494</i>	<i>1</i>	<i>5153,494</i>	<i>521,5887</i>	<i>0,000000</i>
Umidade (1)	1,793	1	1,793	0,1815	0,673483
Granulometria (2)	<i>247,812</i>	<i>1</i>	<i>247,812</i>	<i>25,0813</i>	<i>0,000030</i>
Temperatura (3)	<i>42,613</i>	<i>1</i>	<i>42,613</i>	<i>4,3129</i>	<i>0,047467</i>
1*2	7,482	1	7,482	0,7572	0,391869
1*3	0,144	1	0,144	0,0146	0,904754
2*3	16,105	1	16,105	1,6300	0,212578
1*2*3	7,020	1	7,020	0,7105	0,406683
Erro Puro	266,770	27	9,880		
Total SQ	5743,233	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R² = 0,95.

FONTE: A autora (2025).