

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RODRIGO DOS SANTOS COSTA

REAPROVEITAMENTO DE COPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA PARA A
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE E APLICAÇÃO EM PÃO INTEGRAL

RIO DE JANEIRO
2020

Rodrigo dos Santos Costa

REAPROVEITAMENTO DE COPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA PARA A
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE E APLICAÇÃO EM PÃO INTEGRAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Química, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Bacharel
em Química.

Orientador: Daniel Perrone Moreira (IQ - UFRJ)
Coorientadora: Suellen Silva de Almeida

Rio de Janeiro
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, tia e avó. Três mulheres fortes, incríveis e batalhadoras que sempre me ensinaram que quando não se nasce em berço de ouro, só é possível conquistar seus sonhos na base da luta. Vocês continuam sendo minha fonte de inspiração para que eu seja alguém melhor a cada dia.

Agradeço à minha companheira, Aline Alves, por toda dedicação, paciência, ensinamentos, amor e carinho. Este trabalho só foi possível graças a você, que me ajudou a dar vida a ele e a revisá-lo por horas. Que nossos caminhos continuem entrelaçados onde quer que queiramos ir.

Aos meus amigos antigos de vida, por todos os momentos maravilhosos que já passamos juntos, todos os carnavais, todas as festas e bares que frequentamos juntos.

Aos amigos de pedal, por todos os momentos incríveis desbravando nossa selva de pedra em cima do nosso preferido veículo a propulsão humana.

Agradeço aos professores amigos de faculdade que me acompanharam ao longo desta (quase infinita) saga da graduação, Raoni Schröder e Pierre Mothé. Ambos sempre me dando conselhos, me auxiliando na busca de estágios e intercâmbios e me passando seus conhecimentos com o maior prazer, dedicação e amor pela profissão de professor.

Aos meus colegas de laboratório do Labim, especialmente a Gabi, que me deu a base para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Joab, pela incrível paciência em todas as horas pós-expediente nas quais precisei trabalhar. E aos colegas do LBNA, pessoas maravilhosas com um espírito acolhedor que fizeram com que eu me sentisse em casa. Agradeço especialmente à minha coorientadora Suellen Almeida, que dedicou muitas horas e muita paciência para me passar todo seu conhecimento e me auxiliou imensamente na construção deste trabalho.

Finalmente, agradeço aos meus orientadores, oficiais e não oficiais, professora Denise Guimarães Freire, pelo incrível carinho, conhecimento e acolhimento em seu laboratório e ao professor Daniel Perrone, que me colocou no caminho profissional que mais me gera alegria na vida, a pesquisa em ciências de alimentos. Seu método de ensino me mostrou que outro sistema é possível.

*Você não pode esperar construir um mundo melhor
sem melhorar os indivíduos que nele habitam.*

Marie Curie

RESUMO

Projeto de Curso – IQWX01

TÍTULO: REAPROVEITAMENTO DE COPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE E APLICAÇÃO EM PÃO INTEGRAL

ALUNO: Rodrigo dos Santos Costa

ORIENTADORES: Daniel Perrone Moreira, DBQ – Instituto de Química – UFRJ;
Suellen Silva de Almeida, doutoranda PPGCAL – Instituto de Química – UFRJ

O setor agroindustrial brasileiro gera diariamente toneladas de resíduos como o resíduo de malte cervejeiro e o farelo de cacau e diversos outros coprodutos como o farelo de trigo. Atualmente, estudam-se diversas estratégias para reduzir e reaproveitar estes resíduos. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) se apresenta como uma técnica apropriada para destoxificação e produção de compostos de interesses com alto valor agregado, como as enzimas. As xilanases, alfa-amilases e feruloil-esterases são enzimas passíveis de serem obtidas por meio da FES utilizando os resíduos e coprodutos supracitados. Xilanases (hemicelulases) são enzimas capazes de degradar ligações β -1-4 de xilanas, polissacarídeos estruturais em plantas. Alfa-amilases têm a propriedade de degradar ligações α -1-4-glicosídeas no amido, no glicogênio e outros α -1-4-glucanos, produzindo dextrinas e, por fim, maltose. Feruloil-esterases são enzimas que clivam ligações de ésteres de ácido carboxílicos associados às xilanas podendo realizar *cross-links* entre cadeias deste polissacarídeo. Estas enzimas já encontram aplicação industrial, inclusive na indústria da panificação e de bebidas alcoólicas. A partir da técnica de fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus awamori* como microrganismo produtor e o farelo de trigo, o resíduo de malte cervejeiro e o farelo de cacau como substratos, observou-se a produção de todas as enzimas de interesse. Os tempos com maiores atividades enzimáticas para aplicação em pães integrais com o objetivo de melhora nas propriedades tecnológicas e nutricionais foram de 24 horas para o material fermentado de farelo de trigo e de 48 horas para o fermentado de resíduo de malte cervejeiro. Aplicaram-se os materiais fermentados e seus extratos nas massas dos pães estudados e avaliaram-se as propriedades físico-químicas e a quantidade de ácido ferúlico liberado nos pães. Apesar de não ter havido variação na massa, volume ou densidade dos pães, observou-se aumento de 206% no teor de ácido ferúlico no pão bioprocessado com fermentado de resíduo de malte e de 164% no pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo.

Palavras chaves: Bioprocessamento enzimático; Enzimas em panificação; Compostos fenólicos; Fermentação em estado sólido (FES).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos ácidos fenólicos encontrados em pães. Adaptado de (ANGELINO et al., 2017).....	13
Figura 2. Representação da ação da alfa-amilase no polissacarídeo clivando as ligações α -1-4 e liberando maltose como produto. Adaptado de novozyme.com.....	16
Figura 3. Sítios de ação de cada enzima presente no complexo xilanolítico. Adaptado de (AMORIM et al., 2017).....	18
Figura 4. Cadeia de xilana interligadas por cross-link de dímeros do éster de ácido ferúlico. a: ácido ferúlico; b: estrutura da arabinoxilana associada ao etil ferulato. XLN representa a endoxilanase e seu sítio de ação. FAE representa a feruloil-esterase e seu sítio de ação. Adaptado de (DILOKPIMOL et al., 2016).....	20
Figura 5. Esquematização do processo de colonização do substrato por um fungo filamentosos. Adaptado de (BOUÇA, 2017) com modificações.....	23
Figura 6. Cultivo de <i>Aspergillus awamori</i> em farelo de trigo.....	24
Figura 7. Fluxograma representando o processo do beneficiamento do chocolate (adaptado de Rodrigues et al., 2011).....	25
Figura 8. Representação esquemática da interação dos constituintes majoritários da parede secundária vegetal. Adaptado de (BOUDET et al., 2003).....	27
Figura 9. Fluxograma representando o processo de fabricação da cerveja. Adaptado de funbrew.com.eu.....	28
Figura 10. Fluxograma cronológico com as etapas do trabalho.....	39
Figura 11. Teor de proteínas totais no extrato enzimático expresso em (mg/mL). Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de fermentação da mesma amostra (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	41
Figura 12. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	43
Figura 13. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	44
Figura 14. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	45
Figura 15. Atividade xilanásica ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.....	46
Figura 16. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	47
Figura 17. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	48

Figura 18. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	49
Figura 19. Atividade amilásica ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.	50
Figura 20. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	51
Figura 21. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	52
Figura 22. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	53
Figura 23. Atividade de feruloil-esterase ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.	54
Figura 24. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	55
Figura 25. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	56
Figura 26. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).	57
Figura 27. Imagem da massa do pão controle (PC) dentro da panificadora utilizada. a: Início da fermentação; b: Fim da fermentação; c: Pão assado.	60
Figura 28. Imagem da massa do pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro (PBM) dentro da panificadora utilizada. a: Início da fermentação; b: Fim da fermentação; c: Pão assado.	60
Figura 29. Imagem da massa do pão bioprocessado com PES de farelo de trigo (PBF) dentro da panificadora utilizada. a: Início da fermentação; b: Fim da fermentação; c: Pão assado.	61
Figura 30. Fatias dos pães assados. a: Pão controle; b: Pão bioprocessado com PES de farelo de trigo (PBF); c: Pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro (PBM)	61
Figura 31. Teor de ácido ferúlico solúvel nas amostras dos pães produzidos. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de duplicatas. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). PC = Pão controle; PBM = Pão bioprocessado com fermentado de resíduo de mate cervejeiro; PBF = Pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	do inglês, <i>Analysis of Variance</i>
BSG	do inglês, <i>Brewer's Spent Grain</i>
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
FAE	do inglês, <i>Ferulic Acid Esterase</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
PDA	do inglês, <i>Potato Dextrose Agar</i>
PES	Preparado Enzimático Sólido

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. Introdução	11
1.1 Pão integral.....	11
1.2 Compostos fenólicos	12
1.2.1 Compostos fenólicos em pão.....	14
1.2.2 Bioprocessamento enzimático como estratégia para liberação de compostos fenólicos ¹⁴	
1.3 Enzimas na indústria da panificação	14
1.3.1 Alfa-amilases (EC 3.2.1.1).....	15
1.3.2 Peptidases (EC 3.4).....	16
1.3.3 Xilanases (EC 3.2.1.8).....	16
1.3.4 Feruloil-esterases (3.1.1.73).....	18
1.4 Fermentação em estado sólido (FES)	20
1.5 Reaproveitamento de coprodutos e resíduos agroindustriais.....	24
1.5.1 Farelo de cacau.....	24
1.5.2 Farelo de trigo	26
1.5.3 Resíduo de malte cervejeiro	28
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e métodos	32
3.1 Matéria prima	32
3.2 Microrganismo.....	32
3.3 Propagação de inóculo	32
3.4 Processo de FES	32
3.5 Medida de pH.....	33
3.6 Medida de umidade	33
3.7.1 Quantificação de proteínas totais	33
3.8 Metodologia dos ensaios enzimáticos.....	33
3.8.1 Extração das enzimas	33
3.8.2 Quantificação das atividades enzimáticas	34

3.8.2.1	<i>Feruloil-Esterase</i>	34
3.8.2.2	<i>Xilanase</i>	35
3.8.2.3	<i>Alfa-amilase</i>	35
3.8.2.4	<i>Peptidase</i>	36
3.9	<i>Condições de Bioprocessamento dos pães</i>	36
3.9.1	<i>Preparo dos pães</i>	36
3.9.2	<i>Características tecnológicas dos pães</i>	38
3.9.3	<i>Análise do teor de ácido ferúlico solúvel</i>	38
4.	Resultados e discussão	40
4.1	<i>Umidade, atividade de água e pH</i>	40
4.2	<i>Teor de proteínas</i>	41
4.3	<i>Atividades enzimáticas</i>	42
4.3.1	<i>Perfil de produção de xilanase</i>	42
4.3.2	<i>Perfil de produção de alfa-amilase</i>	47
4.3.3	<i>Perfil de produção de feruloil-esterase</i>	51
4.3.4	<i>Perfil de produção de peptidases</i>	55
4.3.5	<i>Determinação do coproduto e do tempo ideal de fermentação</i>	58
4.4	<i>Características físico-químicas dos pães</i>	59
4.5	<i>Liberção de compostos fenólicos no pão integral</i>	63
5.	Conclusões	66
6.	Perspectivas futuras	67
7.	Referências bibliográficas	68

1. Introdução

1.1 Pão integral

Segundo a legislação brasileira, pães “são produtos obtidos de farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionados de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e de cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos. Podem apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos” (ANVISA, 2005).

Pães constituem um dos alimentos mais consumidos no mundo, atingindo um consumo de 100 g por dia (aproximadamente 3 fatias de pão) em muitos países (LECLERCQ et al., 2009; HEUER et al., 2015). No Brasil, de acordo com dados da ABIP, a Associação Brasileira da Indústria da Panificação, o setor cresceu cerca de 3,2% em 2017, resultando num faturamento de R\$ 90,3 bilhões.

Eles podem variar em forma, tamanho, textura, ingredientes utilizados e em características sensoriais, de acordo com a cultura local aonde são produzidos. Parte desta diferença se deve ao tipo de cereal utilizado para sua produção, sendo comumente utilizado grãos como arroz, centeio, cevada, aveia e trigo (CAUVAIN, 2015). O trigo é, certamente, o grão mais utilizado para a produção devido ao teor de glúten presente no mesmo, que contribui tanto para características sensoriais como para características tecnológicas (ANGELINO et al., 2017).

Quatro ingredientes básicos são utilizados na panificação, sendo eles, a farinha, a água, o fermento e o sal, entretanto, é comum a adição de óleos, nozes, sementes, gorduras, açúcar, leite, ovos, entre outros ingredientes que podem conferir boas características sensoriais e/ou tecnológicas ao produto. A farinha é o ingrediente majoritário e, logo, a qualidade da farinha utilizada na produção do pão é de extrema importância.

Na farinha de trigo estão presentes várias classes de proteínas, dentre elas albuminas e globulinas, em menor quantidade, e glutelinas e prolaminas, majoritariamente. Entretanto, o que se conhece por glúten compreende apenas as glutelinas (gluteninas) e as prolaminas (gliadinas) hidratadas. Apesar de não serem solúveis em água, essas proteínas têm a capacidade de absorver a água presente no meio, de se hidratar formando ligações entre si, gerando a rede de glúten (CAUVAIN, 2015).

A composição em aminoácidos do glúten é característica, contendo grande quantidade de prolina. Este aminoácido permite a formação de folhas beta, conectadas por ligações de hidrogênio, gerando espirais, e assim, conferindo a característica elástica observada no glúten. Além disso, a presença de resíduos de cisteína permite a formação de ligações de dissulfeto, que liga as cadeias poliméricas que formam o glúten. Enquanto a gliadina, um grupo heterogêneo de prolaminas hidrofóbicas, confere o aspecto viscoso típico observado na massa de pão (BELTON, 2012).

No processo de produção do pão ocorrem três etapas básicas: a mistura dos ingredientes, na qual se inicia o processo de formação do glúten e a incorporação dos componentes à massa do pão, a fermentação da massa, etapa na qual ocorre o processo de crescimento da massa devido à liberação de dióxido de carbono proveniente do metabolismo do fermento adicionado, geralmente uma cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. E por último, a etapa de forneamento, onde ocorre a cocção do pão. Nesta última, ocorrem reações de Maillard, gerando compostos que conferem cor, aroma e sabor ao produto final (PROST et al., 2012; BRANDÃO; LIRA, 2011).

Pães feitos com farinha de trigo refinada, composta apenas pelo endosperma do grão, são alimentos com alto teor de carboidratos, entretanto, quando feitos com farinha integral, possuem também vitaminas (sobretudo do complexo B), fibras, minerais e compostos bioativos (DZIKI, 2014). Além de características nutricionais, observa-se ainda características sensoriais conferidas pelo gérmen e farelo do grão, visto que nessas frações estão contidos lipídeos e carboidratos não amiláceos como as arabinoxilanas.

O consumo de produtos integrais vem sendo associado com a redução de doenças crônicas como a diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e até certos tipos de câncer (TEBBEN; SHEN; LI, 2018). Tais benefícios são associados a presença de componentes como fibras dietéticas e compostos bioativos, como os flavonoides e os compostos fenólicos (DZIKI, 2014).

1.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em diversas plantas e compreendem uma das classes de compostos bioativos. Nos vegetais,

eles podem atuar como pigmentos, antioxidantes, atrativos para polinizadores, conferir proteção contra parasitas, entre outras funções (ANGELINO et al., 2017).

Por outro lado, nos alimentos eles conferem atributos sensoriais como adstringência, amargor, cor, sabor e odor, além de estarem relacionados com a estabilidade oxidativa da matriz alimentar (YIN et al., 2018).

Dentre os compostos fenólicos existentes estão os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos, entre outros. Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos de acordo com a sua estrutura: os ácidos hidroxibenzóicos como o ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico e os ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sinápico (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Estudos recentes *in vitro* associam o consumo de compostos fenólicos na prevenção e na redução de doenças cardiovasculares, de certos tipos de câncer e de diabetes devido as suas propriedades antioxidantes, antimutagênica, antialérgica e anti-inflamatória (ANGELINO et al., 2017).

Na figura 1 são demonstrados exemplos dos compostos majoritários encontrados naturalmente em cereais.

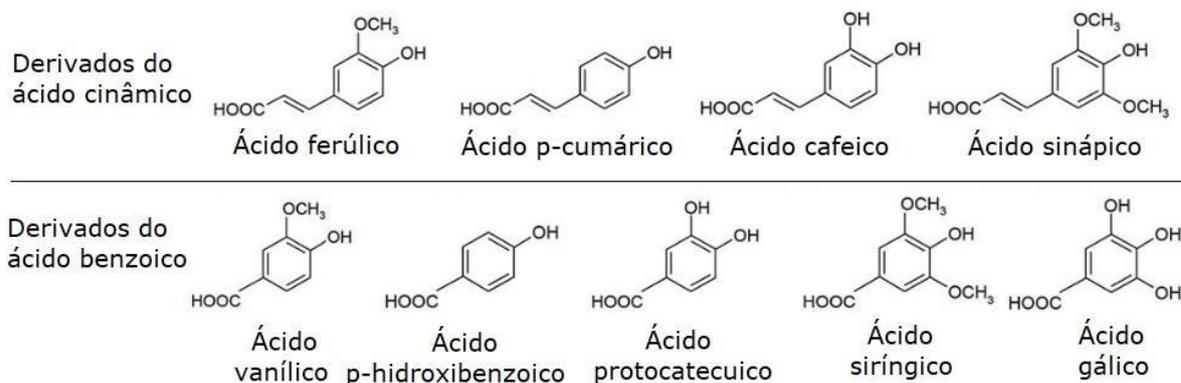


Figura 1. Estrutura dos ácidos fenólicos encontrados majoritariamente em pães. Adaptado de (ANGELINO et al., 2017).

Quando falamos de compostos fenólicos é interessante discutir o conceito de biodisponibilidade. Apesar de serem de suma importância para uma alimentação saudável, diversos compostos fenólicos estão presentes na matriz alimentar sob a forma dita insolúvel. Ou seja, eles estão associados a carboidratos, proteínas, e

outros componentes estruturais da matriz e, ao serem ingeridos e atingirem o trato gastrointestinal humano, não são passíveis de serem absorvidos e metabolizados por nosso organismo (HOLST; WILLIAMSON, 2008).

1.2.1 Compostos fenólicos em pão

Em geral, os ácidos fenólicos encontrados em maior abundância em cereais, e conseqüentemente, em pães, são o ácido ferúlico, seguido do ácido sinápico, p-cumárico e cafeico (VITAGLIONE; NAPOLITANO; FOGLIANO, 2008). O trigo e o centeio são os cereais com a maior quantidade dessas moléculas, tendo em média 1.342 µg/g e 1.366 µg/g, respectivamente (ANGELINO et al., 2017).

No trigo, o ácido ferúlico chega a representar cerca de 90% do total de fenólicos presente, sendo que 99% dele encontra-se sob a forma insolúvel (YIN et al., 2018). A maior parte dele encontra-se associada como conjugados O-glicosídeos, gerando o éster do ácido ferúlico, o etil ferulato. Parte dele encontra-se também sob a forma de dímeros de ácido ferúlico, associados ou não à matriz alimentar (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

1.2.2 Bioprocessamento enzimático como estratégia para liberação de compostos fenólicos

Além da seleção de grãos com maior teor, diversas estratégias vêm sendo investigadas para aumentar a quantidade de fenólicos solúveis em pães como adição de ingredientes com elevado teor de fenólicos (ALVES; PERRONE, 2015), germinação de grãos (HÜBNER; ARENDT, 2013), uso de fermentos naturais como *levain* (ANGELINO et al., 2017) e bioprocessamento enzimático (MOORE et al., 2006).

1.3 Enzimas na indústria da panificação

Enzimas são proteínas, polímeros de cadeia longa de aminoácidos, altamente especializadas em catalisar reações bioquímicas e, desta forma, aumentar a taxa de formação do produto. Originalmente, elas eram obtidas por extração de plantas ou animais produtores, mas atualmente a produção de enzimas é feita também por processos de fermentação em meios de cultivo líquidos ou sólidos, sendo utilizado

fungos, leveduras e/ou bactérias como microrganismos produtores (KORNBRUST; FORMAN; MATVEEVA, 2012).

Atualmente as enzimas são amplamente utilizadas na indústria da panificação. Dentre as enzimas mais comumente utilizadas encontram-se as amilases, as hemicelulases, as glicose-oxidases e as proteases, todas tendo diferentes aplicações e possuindo regulações específicas em cada país (CAUVAIN, 2015).

1.3.1 Alfa-amilases (EC 3.2.1.1)

As alfa-amilases são parte de um grupo maior de enzimas capazes de catalisar o mesmo tipo de reação química, a quebra de moléculas de amido em oligossacarídeos menores, com cerca de 6 a 7 unidades de glicose. Elas atuam hidrolisando ligações α -1-4-glicosídicas no amido, no glicogênio e outros α -1-4-glucanos produzindo dextrinas e, por fim, maltose (CAUVAIN, 2015).

Essas enzimas atuam juntamente com as beta-amilases na degradação da amilopectina e da amilose, polissacarídeos que compõem o amido. Enquanto a alfa-amilase atua dentro da cadeia glicosídica, a beta-amilase atua na extremidade não redutora (YIN et al., 2018). Na figura 2 está demonstrado o sítio de ação desta enzima no polissacarídeo.

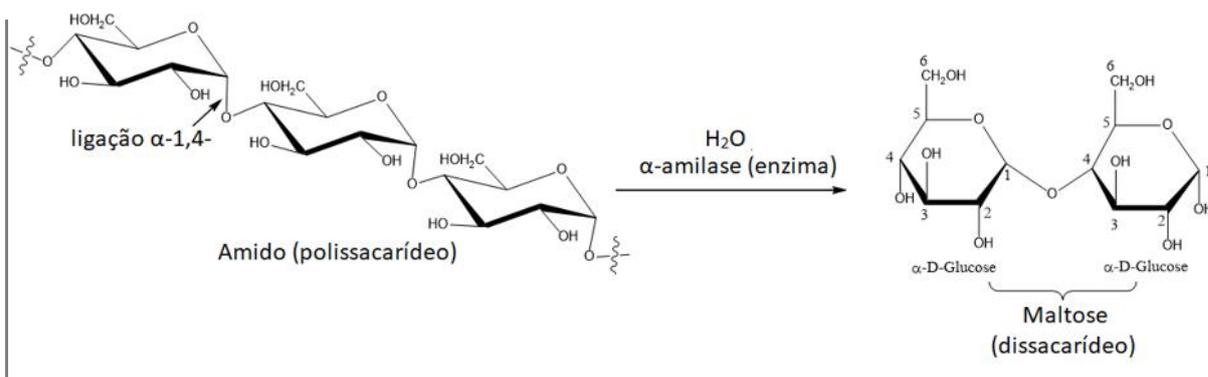


Figura 2. Representação da ação da alfa-amilase no polissacarídeo clivando as ligações α -1-4 e liberando maltose como produto. Adaptado de novozyme.com.

A presença da alfa-amilase é natural em grãos como o trigo. Entretanto, sua quantidade é relativamente pequena e é comum a adição desta enzima na própria farinha para que haja atividade enzimática suficiente durante o processo de panificação (TEBBEN; SHEN; LI, 2018).

A levedura responsável pelo crescimento da massa do pão durante o processo de fermentação é capaz de utilizar a maltose liberada pela amilase para utilização como fonte de carbono no seu metabolismo (TEBBEN; SHEN; LI, 2018). Isto gera um resultado positivo, já que há maior produção de gás carbônico, o que leva a uma massa de pão com maior volume, menor dureza de casca e menor taxa de cristalização do amido, que leva ao endurecimento do pão (MATSUSHITA et al., 2017).

Entretanto, a adição em excesso de alfa-amilase pode resultar em massas de pão grudentas, com perda de propriedades tecnológicas como redução da capacidade de retenção de ar pela massa e menor volume específico de pão (MATSUSHITA et al., 2017).

1.3.2 *Peptidases (EC 3.4)*

As peptidases, também chamadas de proteases ou enzimas proteolíticas, representam um grupo de enzimas capazes de clivar ligações peptídicas específicas entre aminoácidos, liberando fragmentos de proteínas e expondo grupamentos carboxílicos (-COOH) e aminos (-NH₂) (KORNBRUST; FORMAN; MATVEEVA, 2012).

Estas hidrolases encontram diversas aplicações na indústria alimentícia, como na hidrólise da caseína para a produção de queijos, e podem ser obtidas a partir de células animais, vegetais, bacterianas e fúngicas (MUSSATTO, 2014).

Na indústria da panificação ela é aplicada sobretudo na degradação do glúten quando se utiliza uma variedade de trigo que contém elevados teores do complexo proteico (CAUVAIN, 2015). Entretanto, esta aplicação é limitada a poucos países produtores desta variedade, como os Estados Unidos.

Seu uso pode ser prejudicial na panificação justamente devido à degradação da malha de glúten, que pode levar à uma perda da estrutura interna da massa do pão, resultando na perda de gás e, conseqüentemente, na redução de seu volume total (GOESAERT et al., 2005).

1.3.3 *Xilanases (EC 3.2.1.8)*

As xilanases (endo-1-4- β -xilana xilanolidrolase) representam um grupo de enzimas pertencentes a classe das hemicelulases, ou seja, enzimas com propriedades de degradação da hemicelulose. Sua atuação se dá nas xilanas, polissacarídeos estruturais em diversas plantas, com liberação de xilose e de pequenos xilooligossacarídeos (SUNGURTAS et al., 2004).

Devido ao grau de polimerização deste polissacarídeo, a atividade das xilanases no meio onde atuam é dependente de um complexo de enzimas associadas, chamado de complexo xilanolítico (NEETA; ABHAY; MALA, 1999). Este complexo, geralmente composto de β -1,4-endoxilanases, β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -glucoronidases, acetil xilano esterases e ácido fenólico (ácido ferúlico e *p*-cumárico) esterases hidrolisam diversas ligações na cadeia principal e nas cadeias laterais do polímero como demonstrado na figura 3.

Nas células vegetais, a xilana encontra-se na parede celular primária e secundária, juntamente com a celulose e a lignina, interagindo com estes polissacarídeos por meio de ligações covalentes e interações não-covalentes. Ela se apresenta na interface entre a lignina e a celulose e, desta forma, acredita-se que a coesão das fibras e a integridade da parede celular da planta estão diretamente correlacionadas com as xilanas (BOTELLA et al., 2007).

As endo-xilanases podem ter classificações quanto à natureza do substrato em que atuam e ao seu ponto isoelétrico e massa molar e quanto a sua capacidade de promover a liberação de arabinose (NEETA; ABHAY; MALA, 1999). Sabe-se que as endo-xilanases de origem fúngica possuem massas molares entre 7 e 60 kDa, seu pH ótimo de atuação está na faixa entre 3,5 e 6,0 e sua temperatura ideal entre 40 e 60°C (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987).

Na panificação as xilanase têm um efeito positivo nas propriedades da massa de pão integral, durante as etapas de mistura e fermentação, aumentando a qualidade do produto final. Idealmente, utiliza-se as endoxilanases capazes de atacar preferencialmente as xilanas insolúveis na massa, liberando oligossacarídeos solúveis. Desta forma, há um aumento na extensibilidade da massa do pão, melhora nas propriedades de manipulação da massa e no volume final do pão (GOESAERT et al., 2005).

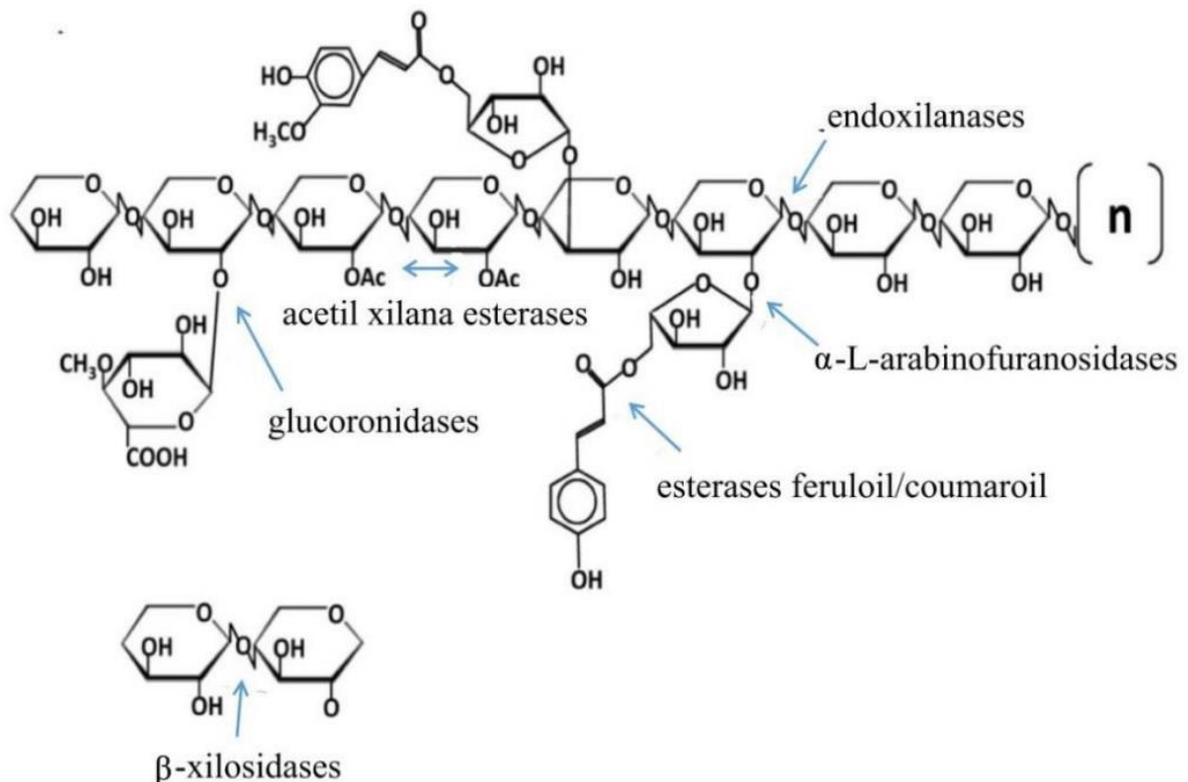


Figura 3. Sítios de ação de cada enzima presente no complexo xilanólico. Adaptado de (AMORIM et al., 2017).

Diversos estudos comprovaram que o uso de xilanase na produção de pães resulta em aumento de volume, da validade dos pães (*shelf life*) e da viscosidade e na diminuição na dureza do miolo. Assim, elas podem ser aplicadas como melhoradores de farinha substituindo diferentes aditivos sintéticos (TEBBEN; SHEN; LI, 2018).

Por fim, na literatura também é relatado que o uso excessivo desta enzima pode ter efeitos negativos sobre a massa do pão, enfraquecendo-a e tornando-a pegajosa, e resultando em pães com estrutura de miolo e distribuição alveolar irregular (DAHIYA; SINGH, 2018).

1.3.4 Feruloil-esterases (3.1.1.73)

A feruloil-esterase (FAE) é uma das enzimas componentes do complexo xilanólico, responsável pela liberação do ácido ferúlico ligado sob a forma de éster a cadeia polissacarídea da xilana. Elas atuam como enzimas auxiliares, sendo

dependente da atividade de outras enzimas que degradam outras partes da cadeia e expõem seu sítio de ação (LONG et al., 2016).

O ácido ferúlico encontra-se majoritariamente na parede celular vegetal associado a matriz lignocelulósica sob a forma de éster formado por ligações entre seu grupo carboxílico e o 5-O do grupo hidroxila de um resíduo de α -L-arabinofuranosil em uma glucoroarabinoxilana (DILOKPIMOL et al., 2016).

Estes ácidos hidroxicinâmicos podem formar *cross-links* por meio de dímeros do éster que realizam ligações intermoleculares entre cadeias de arabinoxilanas e entre cadeias de lignina e arabinoxilanas (lignina-ferulato-arabinoxilana). Por isso eles são considerados essenciais para a estrutura da célula vegetal, aumentando a força mecânica da parede celular (DILOKPIMOL et al., 2016).

As FAEs possuem diversas aplicações na indústria, como seu uso na produção de bioetanol por meio da degradação da biomassa utilizada (TABKA et al., 2006) ou na indústria de bebidas alcoólicas, sendo aplicada produção de uma bebida típica japonesa chamada de *Awamori* (KANAUCHI et al., 2008) e para remoção de *off-flavors* e melhoramento do sabor e aroma de saquê (DILOKPIMOL et al., 2016).

Além disso, os ácidos hidroxicinâmicos são fitoquímicos de grande interesse industrial e de pesquisa devido às propriedades que eles apresentam. Seu potencial antioxidante confere à molécula a capacidade de neutralizar radicais livres como espécies de oxigênio reativas que causam câncer, danos ao DNA e aceleram o processo de envelhecimento celular (GRAF, 1992). Esses compostos fenólicos também são precursores da síntese de compostos de sabor, como a vanilina e o guaiacol, intermediários na rota de degradação do ácido ferúlico e de interesse da indústria de cosméticos (DI GIOIA et al., 2011).

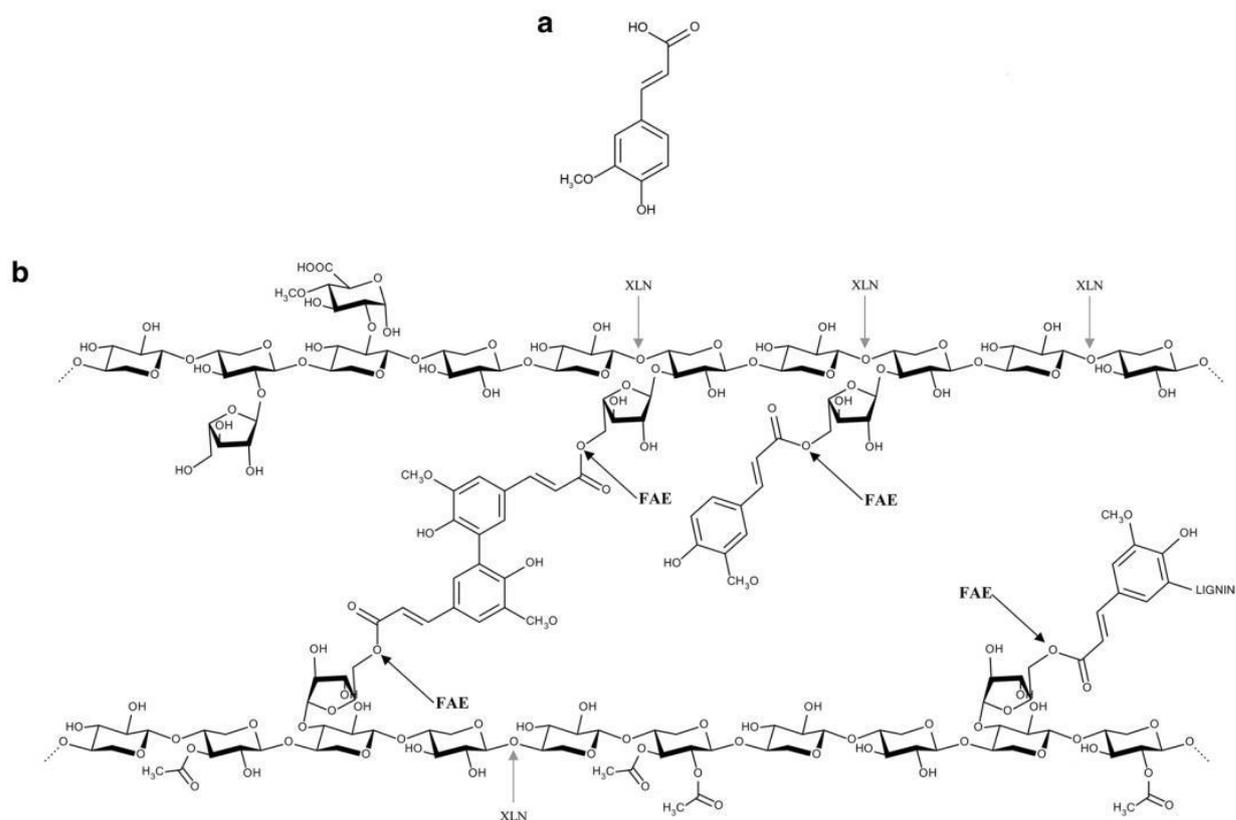


Figura 4. Cadeia de xilana interligadas por *cross-link* de dímeros do éster de ácido ferúlico. **a:** ácido ferúlico; **b:** estrutura da arabinoxilana associada ao etil ferulato. XLN representa a endoxilanas e seu sítio de ação. FAE representa a feruloil-esterase e seu sítio de ação. Adaptado de (DILOKPIMOL et al., 2016).

1.4 Fermentação em estado sólido (FES)

Com uma economia em constante crescimento há também aumento na produção de resíduos agroindustriais e estratégias mais ecologicamente viáveis devem estar em foco para que a humanidade possa continuar a se desenvolver no planeta. A utilização de bioconversores para lidar com estes resíduos têm sido alvo de diversos estudos recentes e, neste contexto, a fermentação em estado sólido (FES) se destaca como uma alternativa ao aproveitamento de resíduos sólidos com simultânea produção de moléculas com elevado valor agregado (PATEL; SHUKLA, 2017).

A fermentação em estado sólido consiste num processo no qual é realizado o crescimento de um microrganismo na ausência ou quase de água livre no meio sólido. A água presente está ligada ao sólido no sistema, formando uma fina película sobre as partículas de meio sólido. Como o metabolismo e o crescimento dos

microrganismos utilizados é dependente de água, mantém-se a umidade no meio sem que se exceda a capacidade máxima de retenção de água pelo meio (STEUDLER, 2019).

O meio utilizado pode ter função de suporte, no qual é necessário adicionar nutrientes nele, ou de suporte e substrato. Desta forma, os microrganismos se desenvolvem de forma muito similar ao seu habitat natural, crescendo no interior e/ou na superfície da matriz utilizada (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ISRAILIDES, 2007).

Se comparada a fermentação submersa, a FES apresenta vantagens por necessitar de um consumo de água menor para realização do processo. Por isto, pode-se utilizar fermentadores menores, com menos agitação e com custos de esterilização reduzidos. Ademais, a FES permite a utilização de substratos de baixíssimo valor agregado, como resíduos agroindustriais, o que leva a uma redução no custo operacional além de ser uma estratégia positiva para preservação do meio ambiente (MARTINS et al., 2011).

Para garantir a reprodutibilidade da fermentação é necessário controlar alguns parâmetros que afetam diretamente o crescimento do microrganismo, como a umidade, a atividade de água (A_w), o pH do meio, a transferência de calor, a concentração de inóculo, o tamanho de partícula e a concentração de nutrientes (STEUDLER, 2019).

O pH do meio é medido de forma global, não representando o pH em microambientes no cultivo. Isto não é um problema, visto que diversos microrganismos são capazes de secretar enzimas estáveis sob condições de grande variação de pH (PANDEY, 2003).

A concentração de inóculo utilizada na fermentação deve ser controlada uma vez que uma baixa concentração pode levar a efeitos indesejáveis como contaminação do meio por outro microrganismo, enquanto uma concentração celular muito alta pode ocasionar a exaustão do meio de forma precoce, resultando numa produtividade baixa dos compostos de interesse (AMORIM et al., 2017).

A atividade de água é um parâmetro termodinâmico do meio sendo relacionado ao potencial químico da água, ou seja, a quantidade de moléculas de água disponíveis em torno das partículas do substrato. Ela afeta diretamente o crescimento do microrganismo e a produtividade de metabólitos (PANDEY, 2003).

Enquanto que a umidade varia de acordo com a quantidade de água que o substrato é capaz de absorver de forma que não permaneça água livre, ela está relacionada a porcentagem de água na massa total do substrato utilizado. Baixas umidades podem resultar em um crescimento reduzido do microrganismo, enquanto que umidades excessivas podem dificultar as trocas gasosas e aumentar o risco de contaminação do meio (STEUDLER, 2019).

O tamanho de partícula utilizado representa um importante parâmetro físico de controle da FES, influenciando no crescimento microbiano e no seu acesso ao substrato. Partículas muito pequenas podem formar agregados compactos ao serem hidratadas, o que dificulta o processo de crescimento do microrganismo, principalmente de fungos filamentosos. E partículas demasiado grandes diminuem a superfície de contato do microrganismo com o substrato (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

Existem outros fatores importantes que devem ser considerados para realizar uma fermentação em estado sólido com sucesso, dentre eles, a escolha do microrganismo adequado e o meio utilizado como substrato. Pode-se utilizar bactérias, leveduras e fungos como microrganismos fermentadores, entretanto, devido a reduzida quantidade de água utilizada, leveduras e fungos demonstram maior potencial para uso. De toda forma, o microrganismo e o substrato utilizados devem estar de acordo com o produto almejado com o processo (MARTINS et al., 2011).

Devido ao seu potencial de crescimento, de produção de enzimas termoestáveis com elevado interesse econômico e científico e de produção de compostos bioativos, os fungos filamentosos têm sido majoritariamente utilizados para este processo (SOCCOL et al., 2017). Estes, são capazes de colonizar o substrato formando hifas, como demonstrado na figura 5, conferindo uma vantagem frente a outros microrganismos.

As hifas sintetizadas no substrato pelo fungo crescem no interior da matriz, caracterizando as hifas penetrativas (Figura 5 (3)), e na interface ar-líquido, chamadas de hifas aéreas (Figura 5 (1)). À medida que o fungo se desenvolve, cresce o conjunto de hifas no meio, chamado de micélio. Com o aumento da densidade das hifas aéreas seus poros passam a reter água, gerando uma camada úmida de tal forma que a parte inferior do meio pode se tornar anaeróbica (Figura 5

(2)). A quantidade de oxigênio disponível no meio é de extrema importância e a difusão dele através do substrato pode limitar o crescimento do fungo (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

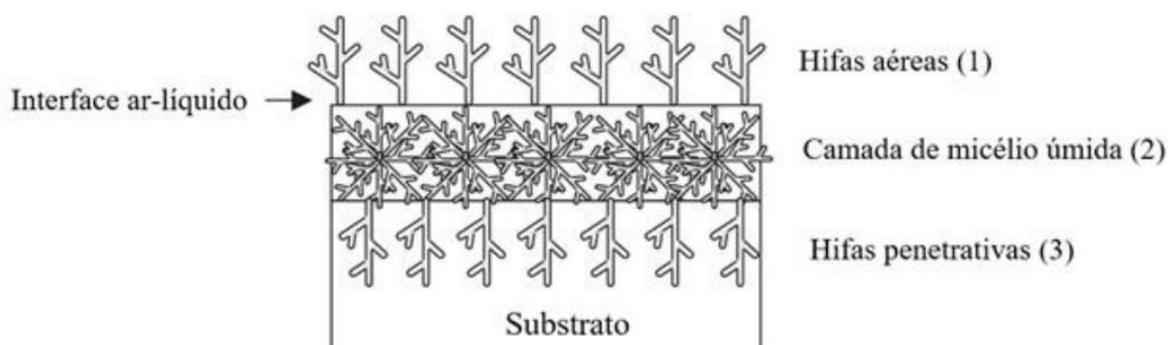


Figura 5. Esquemática do processo de colonização do substrato por um fungo filamentososo. Adaptado de (BOUÇA, 2017) com modificações.

Durante o crescimento celular no meio há produção de enzimas que degradam polímeros estruturais do substrato, como a celulose a hemicelulose, gerando compostos que são utilizados como fonte de carbono. Dentre estas enzimas extracelulares estão xilanasas, feruloil-esterases, proteases, amilases, celulasas entre outras (BOTELLA et al., 2007).

Neste trabalho optou-se por utilizar o fungo *Aspergillus awamori* como organismo fermentador, uma vez que existem diversos trabalhos na literatura que utilizam este microrganismo como produtor de xilanasas e de compostos bioativos de interesse (AMORIM et al., 2017; YIN et al., 2018). Na figura 6 é demonstrada uma imagem de microscopia óptica (Zeiss, SteREO Discovery V.12, com objetiva PlanApo 1.5x) realizada durante o desenvolvimento deste trabalho.



Figura 6. Cultivo de *Aspergillus awamori* em farelo de trigo.

1.5 Reaproveitamento de coprodutos e resíduos agroindustriais

Diariamente são geradas toneladas de resíduos provindos da agro indústria e que representam uma constante preocupação no setor devido ao impacto ambiental e econômico causado pelos mesmos. Existem diversas alternativas para valorização destes resíduos atualmente, como por exemplo a utilização de bagaço de cana para produção de enzimas de interesse (JUNIOR LETTI et al., 2018) ou a utilização de resíduo de malte cervejeiro em ração animal (MOREIRA et al., 2013).

Desta forma, destacaremos dois resíduos e um coproduto da indústria agro alimentícia que serão utilizados como objeto de estudo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

1.5.1 Farelo de cacau

O cacau (*Theobroma cacao*) é uma espécie de planta tropical encontrada nas planícies úmidas da América do Sul e Central no estrato inferior da floresta. Fruto tradicional da cultura brasileira, começou a ser cultivado no Brasil no século XVII e atualmente é amplamente cultivado nas regiões norte e nordeste do Brasil, sobretudo na Bahia (PINHEIRO; SILVA, 2017).

Por ser a principal matéria prima para produção do chocolate, possui alto interesse econômico além de valor social e cultural associado ao fruto. Uma vez colhido, suas sementes são extraídas, fermentadas, secas, torradas, moídas e/ou prensadas. Daí, a manteiga de cacau extraída da semente é destinada às indústrias farmacêutica e cosmética, enquanto que as amêndoas prensadas seguem para a fabricação de chocolate (SALTINI; AKKERMAN; FROSCH, 2013).

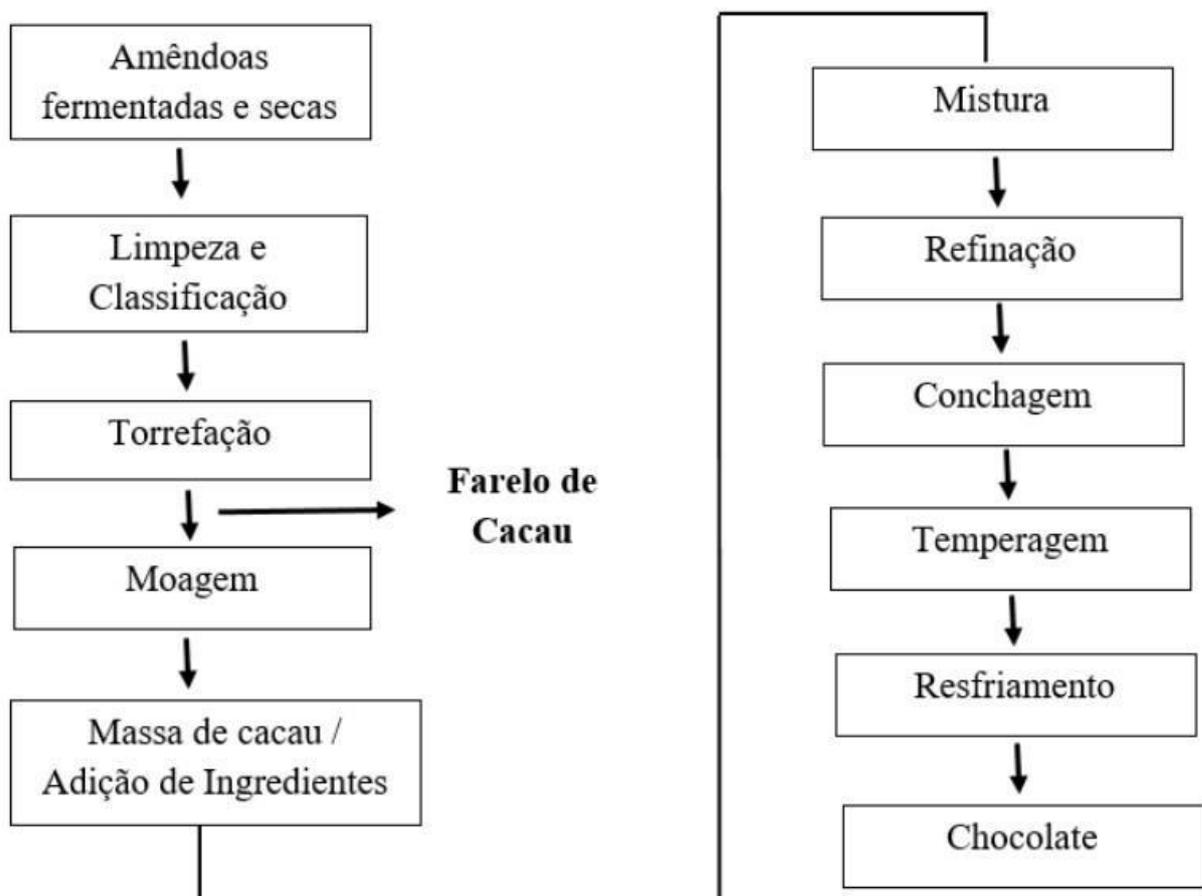


Figura 7. Fluxograma representando o processo do beneficiamento do chocolate (adaptado de Rodrigues et al., 2011).

Segundo dados do IBGE, em 2017 foram produzidas 274,874 toneladas de amêndoas de cacau, o que gerou um resíduo de aproximadamente 27,487 toneladas. O bagaço gerado pela indústria cacauceira, chamado de farelo de cacau é obtido no processamento das amêndoas durante a etapa de torrefação e constitui a casca que se desprende da semente devido à alta temperatura a qual a semente é

submetida e a partes do grão que ficaram aderidos à casca, tendo uma composição heterogênea (DE OLIVEIRA SILVA et al., 2005).

O reaproveitamento deste resíduo tem aplicação limitada na alimentação animal devido ao teor de metilxantinas presente nele, como a teobromina, composto que apresenta grande toxicidade para ruminantes. Além disso, sua aplicação como adubo na própria plantação do cacau não é recomendada, uma vez que a casca pode constituir fonte de inóculo de patógenos para a planta (DE OLIVEIRA SILVA, 2018).

Desta forma, estratégias vêm sendo desenvolvidas para o reaproveitamento do farelo como matéria prima para outras aplicações. Dentre elas destacam-se o uso do farelo para crescimento de microrganismos fermentadores, para a produção de etanol (DE OLIVEIRA SILVA, 2018) e a destoxificação do mesmo para aplicação em ração animal (AMORIM et al., 2017).

Apesar da sua heterogeneidade, o farelo de cacau é composto por cerca de 12 a 20% de proteínas, 6-7% de cinzas, 10 a 20% de umidade e 70% de carboidratos, sendo a celulose, a hemicelulose e a lignina os carboidratos majoritários (CARVALHO et al., 2008). Assim, ele apresenta grande potencial para ser utilizado como matéria prima para processos biotecnológicos, como meio de cultivo para produção de enzimas (AMORIM et al., 2017), mas também para alimentação humana.

1.5.2 Farelo de trigo

O farelo de trigo constitui a parte mais externa do grão de trigo e engloba diversas camadas como a epiderme, a hipoderme, o pericarpo, a aleurona, entre outras. Estas camadas são compostas por diversos polissacarídeos estruturais, chamados de fibras insolúveis, como a celulose, hemicelulose, lignina, xilanas e beta-glucanas. Uma representação esquemática da interação de alguns desses compostos é apresentado na figura 8.

Além disso, estão associados nesta matriz: proteínas, enzimas, lipídeos, minerais, vitaminas B e E e compostos fenólicos (MATEO ANSON et al., 2011). Coproduto da indústria da farinha de trigo, ele é separado logo na primeira etapa de refino da farinha e estima-se que para cada 100 gramas de farinha de trigo refinada produzida, são obtidos 22 g de farelo de trigo (XIE et al., 2010).

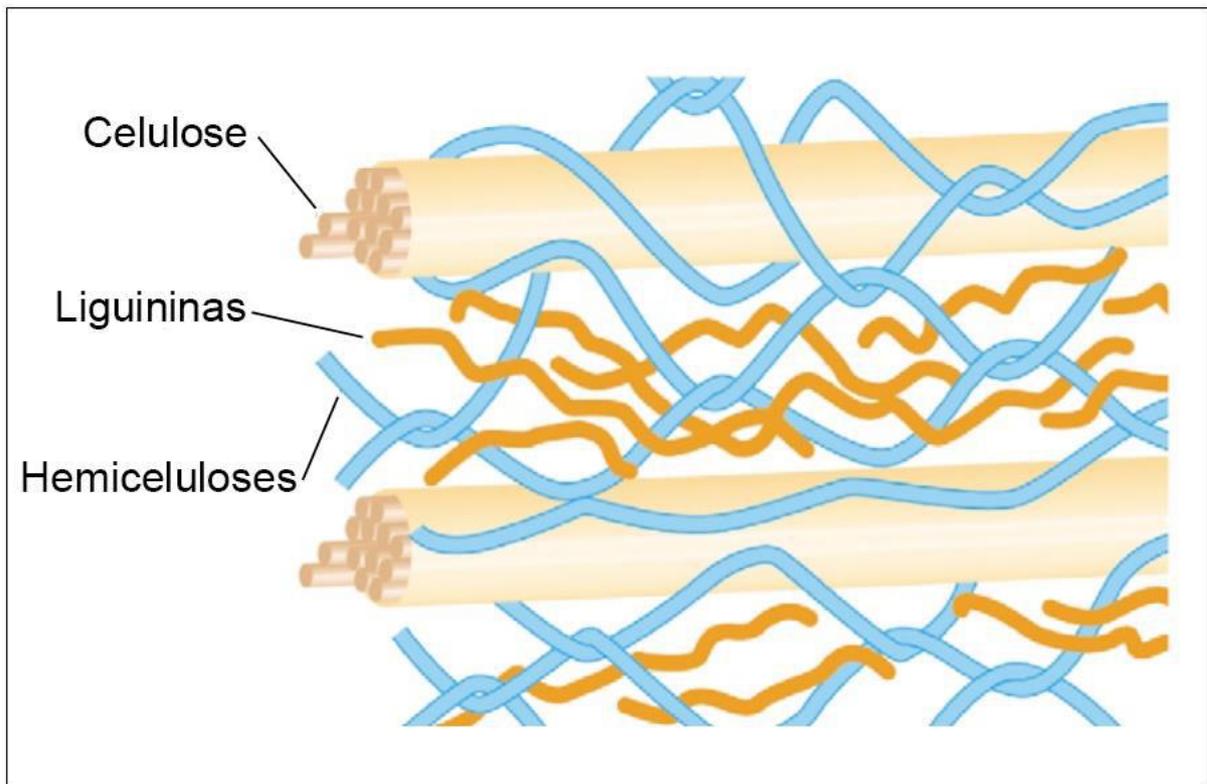


Figura 8. Representação esquemática da interação dos constituintes majoritários da parede secundária vegetal. Adaptado de (BOUDET et al., 2003).

Por ser uma matriz rica em fibras, é uma excelente alternativa de consumo para uma dieta mais saudável visto que o consumo de fibras é relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer do cólon retal (LAIRON et al., 2005).

Além do benefício nutricional, a adição de farelo de trigo na produção de pães é associada a alterações tecnológicas positivas, bem como indesejáveis. Há estudos que demonstram que a adição de farelo resulta em um aumento na capacidade de retenção de água da massa e em alterações sensoriais positivas nos pães (CAUVAIN, 2015).

Entretanto, sua adição resulta em pães com um volume menor, devido a malha de glúten menos desenvolvida e ao alto teor de fibras. A ação de enzimas naturais do farelo de trigo, como a α -amilase, juntamente com a elevada capacidade de retenção de água das fibras podem resultar num enfraquecimento da rede de glúten, gerando perda de ar durante a fermentação e cocção (PACKKIA-DOSS et al., 2019).

Por fim, destaca-se seu uso como meio de cultivo para fermentações em estado sólido. Por ser rico em nutrientes, este coproduto é amplamente utilizado como substrato para fermentação, tendo diversos estudos focado na obtenção de compostos fenólicos presentes e estruturalmente ligado aos polissacarídeos (ANSON et al., 2009).

1.5.3 Resíduo de malte cervejeiro

O processo industrial de produção da cerveja é composto de três fases principais. Inicialmente há a etapa de produção do mosto, onde ocorre o a maltagem do grão, moagem, mostura, fervura e filtragem do mosto. Em seguida, há a fermentação do líquido rico em açúcares obtidos na primeira etapa por cepas selecionadas de levedura e, por fim, ocorrem os processos de clarificação da cerveja bruta, maturação da cerveja, envase e pasteurização (Aqarone, 2001).

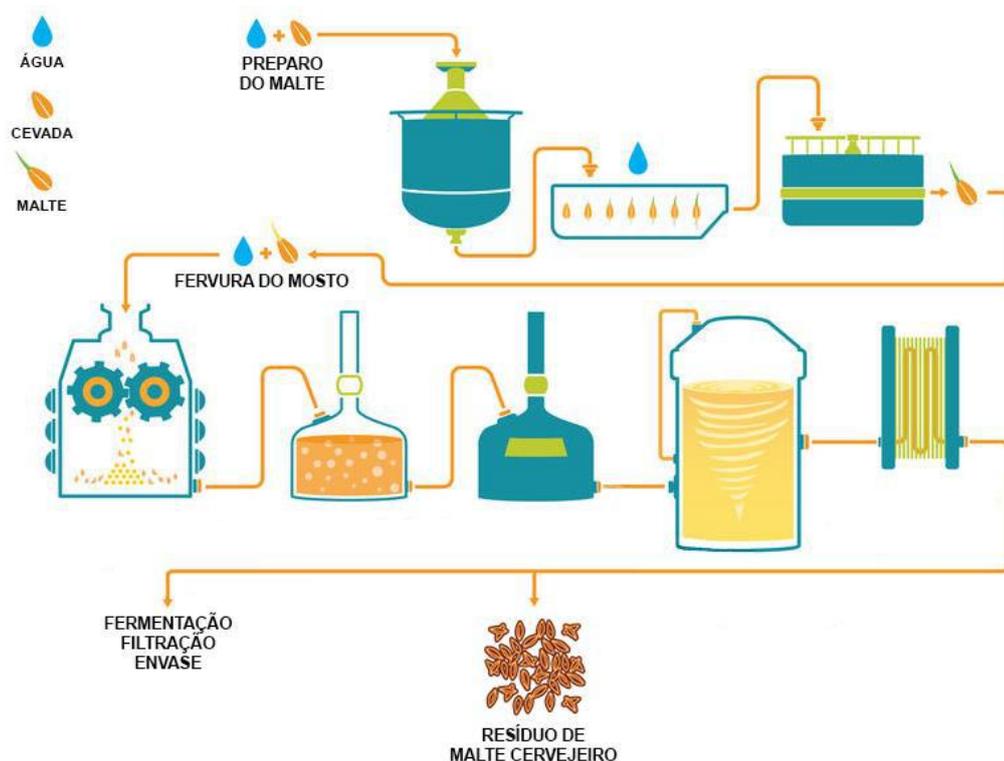


Figura 9. Fluxograma representando o processo de fabricação da cerveja. Adaptado de funbrew.com.eu.

Durante a etapa de filtragem do mosto, ocorre a formação do bagaço do malte, que em primeiro momento é utilizado como torta filtrante no próprio tanque de mostura. Após este processo, o bagaço torna-se um resíduo de grande importância

representando 85% de todo resíduo gerado. Segundo um levantamento realizado em 2015, no Brasil foram produzidos 13,85 bilhões de litros de cerveja, gerando aproximadamente 2,77 bilhões de quilos de bagaço de malte (ZORZAN, 2017). A biomassa gerada possui um valor de mercado baixíssimo, variando de 1 a 6 euros/tonelada de resíduo (FILLAUDEAU; BLANPAIN-AVET; DAUFIN, 2006; IKRAM et al., 2017).

Ele contém cerca de 20% em proteínas e 70% em fibras lignocelulósicas (MUSSATTO, 2014) e é majoritariamente destinado a alimentação animal. Entretanto, por ser um material com elevado teor de umidade (cerca de 70%) e açúcares residuais, seu processo de estocagem e transporte é complicado devido ao grande risco de contaminação e degradação microbiológica (IKRAM et al., 2017).

O bagaço de malte (BSG) tem despertado o interesse de pesquisadores recentemente devido ao seu potencial benéfico à saúde humana, como o alto teor de fibras e de compostos fenólicos, como os ácidos ferúlico, p-cumárico, sinápico e cafeico (IKRAM et al., 2017).

As fibras presentes são compostas por celulose, formada por polímeros lineares de glicose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose, o componente em maior quantidade no bagaço, é composta majoritariamente por arabinoxilanas (AX) que representam até 40% da massa seca total. As arabinoxilanas são polímeros formados principalmente por unidades de xilose conectadas por ligações β -1-4, podendo haver unidades de arabinose ao longo da cadeia nas quais o ácido ferúlico pode estar ligado sob a forma de éster. Além disso, as AX podem estar interligadas por dímeros de ésteres de ácido ferúlico conectados à ambas cadeias do polissacarídeo (MENDIS; SIMSEK, 2014).

Na literatura é relatado que os compostos fenólicos presentes no BSG em quantidades consideráveis são o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, chegando a quantidades de 350 mg/100 g e 50 mg/100g de massa seca, respectivamente, para o bagaço de malte de pilsen (MOREIRA et al., 2013). Entretanto, como mencionado anteriormente, grande parte destes ácidos fenólicos encontram-se associados a polissacarídeos estruturais, tornando-os insolúveis.

Devido a composição rica em fibras e proteínas e sua capacidade de absorção de água, a utilização desta biomassa como meio de cultivo para fermentação em estado sólido também é relatada. Utilizou-se microrganismos como

Aspergillus oryzae (XU et al., 2008) e *Aspergillus brasiliensis* (OUTEIRIÑO et al., 2019) para obtenção de enzimas de interesse, como xilanases, α -amilases, entre outras.

Por fim, devido a sua composição nutricional, a utilização do bagaço para produção de alimentos é uma alternativa viável para valorização do mesmo, podendo ser utilizado inteiro ou sob a forma de farinha e tendo diversas aplicações na indústria da panificação (NOCENTE et al., 2019; ZORZAN, 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o reaproveitamento de coprodutos da agroindústria (farelo de cacau, farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro) para a produção de enzimas de interesse por fermentação em estado sólido e sua aplicação em pão integral visando melhoria tecnológica e liberação de compostos fenólicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de produção das enzimas xilanase, feruloil-esterase, alfa-amilase e peptidase, produzidas pelo fungo *Aspergillus awamori* por fermentação em estado sólido, usando como substratos farelo de cacau, farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro;
- A partir da cinética de produção das enzimas, determinar os coprodutos e os tempos de fermentação com maior potencial para aplicação em pão integral;
- Avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático nas características tecnológicas e na liberação de compostos fenólicos de pão integral.

3. Materiais e métodos

3.1 Matéria prima

Foram utilizados três coprodutos como meios de cultivo para a fermentação em estado sólido: farelo de cacau, farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro. O farelo de cacau triturado foi doado pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), localizada ao sul da Bahia. O farelo de trigo foi adquirido em estabelecimento comercial do Rio de Janeiro. O resíduo industrial de malte cervejeiro foi obtido através de doação da cervejaria Allegra®, localizada na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. Como forma de pré-preparo das amostras, o farelo de cacau foi triturado, o farelo de trigo foi utilizado em sua forma comercial e o resíduo de malte foi congelado e, em seguida, liofilizado e triturado para melhor conservação e estocagem.

3.2 Microrganismo

Foi utilizado o fungo *Aspergillus awamori* (IOC 3914), obtido da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC; Rio de Janeiro, Brasil).

3.3 Propagação de inóculo

A partir de uma cultura estoque, foi realizado o crescimento do fungo em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) por um período de 7 dias a 30°C em câmara de crescimento para obtenção dos esporos. Foi utilizado uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e a concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A concentração de inóculo utilizada foi equivalente a 1×10^7 esporos/g de meio de cultivo (AMORIM et al., 2017).

3.4 Processo de FES

A fermentação dos três coprodutos foi realizada em béqueres de 600 mL contendo 15 g de meio com granulometria inferior a 1,70 mm, com leito inicial de aproximadamente 1,0 cm de altura. O meio de farelo de cacau foi suplementado com 2% de ureia (Sigma Aldrich, EUA) (AMORIM et al., 2017). Todos os meios tiveram suas umidades ajustada de acordo com a quantidade de água passível de ser absorvida pelo mesmo. As umidades iniciais foram de 55, 60 e 70% para os

meios de resíduo de malte cervejeiro, farelo de cacau e farelo e trigo, respectivamente. O processo de fermentação foi realizado em câmara climática com temperatura de 30°C e umidade de 90%.

3.5 Medida de pH

Para a medida de pH do meio após a fermentação foi pesado 0,5 g de material fermentado, ao qual foi adicionado 5,0 mL de água destilada. A mistura foi então agitada, seguida de repousou por 10 minutos. Foi aferido, então, o pH do sobrenadante utilizando um potenciômetro (BOUÇA, 2017).

3.6 Medida de umidade

Foi aferido o teor de umidade final do produto fermentado em balança determinadora de umidade (MX-50 moisture analyzer, A&D, EUA) (GODOY et al., 2009).

3.7 Medida de atividade de água

A atividade de água do material fermentado foi verificada em higrômetro (Aqualab, EUA) (GODOY et al., 2009).

3.7.1 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais presentes no material fermentado foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976) com modificações, em microplaca de 96 poços. O ensaio foi realizado em todos os extratos enzimáticos. O resultado da análise foi expresso em massa de proteína por litro de extrato enzimático (g/L) e foi utilizado para cálculo da atividade específica das enzimas analisadas.

3.8 Metodologia dos ensaios enzimáticos

3.8.1 Extração das enzimas

Para obtenção o extrato enzimático a partir do material fermentado, foi adicionado água destilada na proporção 5 mL por grama de material e incubada em agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Decorrido este tempo, a suspensão foi prensada manualmente em gaze de algodão e a solução obtida foi

centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O extrato foi acondicionado em tubos de 2,0 mL de volume e conservados a 4°C, aproximadamente, por no máximo 12 horas. As atividades enzimáticas foram quantificadas utilizando este sobrenadante resultante (AMORIM et al., 2017).

3.8.2 *Quantificação das atividades enzimáticas*

Todas as atividades enzimáticas descritas abaixo foram realizadas em triplicata utilizando tubos de 2,0 mL de volume. As atividades enzimáticas foram expressas: em atividade por grama de meio de cultivo (U/g de massa seca de PES) e em produtividade enzimática, atividade por grama de meio de cultivo por hora de fermentação (U/g de massa seca de PES x h).

3.8.2.1 *Feruloil-Esterase*

A atividade de feruloil-esterase foi quantificada a partir da concentração de ácido ferúlico no meio, uma vez que esta enzima catalisa a conversão do etil ferulato em ácido ferúlico, segundo (CARLOS, 2016) com modificações. Foi utilizada uma solução de etil ferulato 1,33 milimol.L⁻¹ solubilizado em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH = 6,5 como substrato da reação. Foi adicionado 100 µL de solução de extrato enzimático a um tubo em banho térmico a 40°C, seguida da adição de 300 µL de solução de substrato. Após 30 minutos de reação, foi adicionado 133 µL de uma solução de ácido sulfúrico 0,35 mol.L⁻¹ e 133 µL de uma solução de hidróxido de sódio 0,7 mol.L⁻¹. No branco dos ensaios, as soluções ácida e básica foram adicionadas antes da adição do substrato. Enfim, foi adicionado 400 µL de uma solução de ácido benzoico 1,0mM em todas as amostras. Este atua como um padrão interno na análise. As amostras foram filtradas em filtros de seringa 0,45 µm (Analítica, São Paulo, Brasil) e, em seguida, analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Resolução associada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Shimadzu®, Kyoto, Japão) utilizando uma coluna de cromatografia Kromasil® C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm). Foi realizada uma corrida isocrática com fase móvel composta por uma mistura de metanol contendo 1% de acetonitrila (58%) e água contendo 0,3% de ácido fórmico e 1% de acetonitrila (42%), com fluxo de 1 mL/min. Foi acompanhado o sinal analítico em 325 nm. Nos cromatogramas, foi possível identificar os sinais analíticos referentes ao ácido ferúlico e ao etil ferulato, substrato

da reação. A identificação do ácido ferúlico se deu por padrão externo e a sua quantificação foi feita por meio de curva de calibração. A quantidade inicial de ácido ferúlico presente nos brancos dos ensaios foi descontada. Uma unidade de atividade de FAE foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido ferúlico hidrolisado do substrato etil ferulato por minuto a 40°C. A atividade enzimática foi expressa em atividade enzimática (U/g de massa seca de PES) e em produtividade enzimática (U/g de massa seca de PES x h).

3.8.2.2 *Xilanase*

A enzima xilanase é responsável pela catálise do polissacarídeo xilana liberando xilose como produto no meio. Desta forma, sua atividade foi determinada utilizando o método do açúcar redutor de Miller (1959). Foi utilizada uma solução de xilana de Birchwood (Sigma-Aldrich, EUA) 1% (p/v) em tampão universal (BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A., 1931), pH 5,0, como substrato da reação. A reação enzimática foi realizada com 10 μL de extrato enzimático e 90 μL de solução de xilana em tubo de 2,0 mL inserido em um banho térmico a 40°C por 5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 300 μL de solução DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), o tubo foi posto em banho térmico a 100°C, seguido da adição de 1,0 mL de água destilada. A absorvância da solução resultante foi aferida em espectrofotômetro em 540 nm (UV-1800, Shimadzu®). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que produz 1 μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições reacionais. A partir de uma solução de xilose 1g/L, foi construída uma curva padrão utilizando diferentes diluições. A atividade enzimática foi expressa em atividade enzimática (U/g de massa seca de PES) e em produtividade enzimática (U/g de massa seca de PES x h).

3.8.2.3 *Alfa-amilase*

As amilases representam uma classe de enzimas capazes de catalisar a reação da conversão de amido em glicose. Sendo assim, foi utilizado como substrato desta reação uma solução de amido (Sigma-Aldrich, EUA) 1% (p/v) preparada em tampão universal (BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A., 1931) pH 5,0. A solução deve ser aquecida para solubilização total do amido. Assim como nos ensaios para quantificação da atividade de xilanase, a atividade de amilase foi

determinada a partir do método do açúcar redutor (Miller, 1959). Logo, os ensaios são similares ao ensaio descrito no item 3.9.4, tendo sido utilizado os mesmos volumes de extrato enzimático e substrato, mesmas condições e procedimentos. Em seguida, foi aferida a absorvância da solução em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições reacionais. A partir de uma solução de glicose 1g/L, foi construída uma curva padrão utilizando diferentes diluições. A atividade enzimática foi expressa em atividade enzimática (U/g de massa seca de PES) e em produtividade enzimática (U/g de massa seca de PES x h).

3.8.2.4 *Peptidase*

A atividade de peptidase no extrato enzimático foi quantificada utilizando uma solução de azocaseína (Sigma Aldrich, EUA) na concentração de 5 g/L, solubilizada em tampão universal (BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A., 1931) pH 5,0. Em um banho térmico a 40°C, foram incubados 50 μL de extrato enzimático e 500 μL de solução de azocaseína durante 5 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 1,0 mL de solução ácido clorídrico 1,0 mol.L^{-1} para parar a reação. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 2 minutos e, em seguida, a absorvância das amostras foi aferida a 345 nm (BOUÇA, 2017). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa uma diferença unitária de absorvância entre a amostra e seu respectivo branco por minuto, nas condições do ensaio enzimático.

3.9 Condições de Bioprocessamento dos pães

3.9.1 *Preparo dos pães*

Foi realizado o preparo de três tipos de pães: pão controle (PC), pão bioprocessado com fermentado de resíduo de malte (PBM) e pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo (PBF). A formulação deles foi baseada em uma metodologia previamente conhecida e utilizada pelo grupo de pesquisa (SILVA, 2018) e é demonstrada na tabela 1.

Tabela 1. Formulação utilizada para preparo dos pães integrais.

Ingredientes	PC	PBM	PBF
Farinha de trigo integral (g)	405	405	405
Farelo de trigo (g)	45	36	36
Açúcar mascavo (g)	12	12	12
Sal refinado (g)	4,5	4,5	4,5
Fermento biológico seco (g)	4,5	4,5	4,5
Azeite de oliva (mL)	22,5	22,5	22,5
PES de farelo de trigo (g)	-	-	9
PES de resíduo de malte cervejeiro (g)	-	9	-
Água (mL)	320	320	320

PC = Pão controle; PBM = Pão bioprocessado com fermentado de resíduo de malte cervejeiro; PBF = Pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo

A quantidade de extrato enzimático utilizada foi calculada com base na atividade enzimática aferida previamente e de tal forma que não houvesse excesso de enzimas na massa do pão. Optou-se por utilizar 9,0 g de material fermentado, ou seja, 45 mL de extrato enzimático aquoso. Ambos, PES e extrato aquoso foram adicionados a massa, o volume de água mineral adicionada foi descontado do volume de extrato adicionado para que o protocolo de aplicação fosse padronizado.

Os pães foram feitos em duplicata de processo utilizando panificadoras automáticas, pré-programadas para realizar as etapas de mistura dos ingredientes, fermentação e forneamento em tempos específicos, como demonstrado na tabela 2.

Outros estudos comprovaram a reprodutibilidade das panificadoras no que se refere à quantidade de calor empregada durante o processo de forneamento (SILVA, 2018). Após resfriamento, os pães foram fracionados, moídos e armazenados em sacos plásticos estéreis a -20 °C até o momento das análises.

Tabela 2. Ciclos de panificação utilizados para a produção das replicatas de pão integral.

Ciclos de panificação	Tempo (minutos)
Mistura (farinha, farelo de trigo, água e extrato enzimático)	7 minutos
Autólise (hidratação da farinha)	35 minutos
Mistura (restante dos ingredientes)	9 minutos
Fermentação	25 minutos
Mistura	18 minutos
Fermentação	1 hora e 45 minutos
Forneamento	1 hora
Tempo total	4 horas e 12 minutos

3.9.2 Características tecnológicas dos pães

O volume dos pães foi aferido pela técnica de deslocamento de painço, utilizada em outros trabalhos desenvolvidos no grupo de pesquisa. Nela, uma caixa plástica de volume conhecido foi preenchida com sementes de painço e nivelada com o auxílio de uma régua plástica. Em seguida, parte das sementes é retirada, o pão é inserido sobre elas e a caixa é preenchida novamente com as sementes e nivelada com a régua. Foi medido o volume de sementes que remanescentes em uma proveta graduada de 1000mL e foi definido o volume do pão por diferença (SILVA, 2018). A massa do pão foi aferida em balança comercial (Mettler P1000N®). A densidade do pão foi calculada pela razão entre a massa e o volume do mesmo.

3.9.3 Análise do teor de ácido ferúlico solúvel

Para a extração de compostos fenólicos solúveis das amostras dos pães, 1,0 g de amostra foi pesada em balança analítica, em tubo de 50 mL de volume, seguido da adição de 10 mL solução gelada de etanol:água (80:20 v/v). Os tubos foram colocados sob agitação em vórtex (Vortex Gene®) por 10 minutos e posteriormente foram centrifugados a 2500 g por 5 minutos a 10°C (Sorval ST 16R, Thermo Scientific®). O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi re-extraído. Com os

sobrenadantes reunidos após a segunda etapa de extração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador (R215, Buchi®) e o resíduo seco obtido foi reconstituído com 10mL de água Milli-Q (DINELLI et al., 2011). As extrações foram realizadas em duplicata de amostra.

Para determinação do teor de ácido ferúlico, as soluções aquosa obtida na etapa de extração foram filtradas em filtros de seringa 0,45 µm (Analítica, São Paulo, Brasil) e, em seguida, analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Resolução associada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Shimadzu®, Kyoto, Japão) utilizando uma coluna de cromatografia Kromasil® C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e sistema de gradiente de eluição. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de ácido fórmico 0,3% e acetonitrila 1% (eluente A) e uma solução de acetonitrila 1% em metanol (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/ min e volume de injeção de 25 µL. A coluna foi equilibrada com 18,2% do eluente B previamente e, após a injeção da amostra, essa proporção aumentou para 20,2 % de B em 1 minuto, aumentou constantemente até 60,4 % de B em 20 minutos e então, retornou à proporção inicial de 18,2% de B sendo mantida constante até 35 minutos. A identificação do ácido ferúlico se deu por padrão externo e a sua quantificação foi feita por meio de curva de calibração.

Na figura abaixo, é apresentado um fluxograma da metodologia do trabalho para melhor compreensão deste.

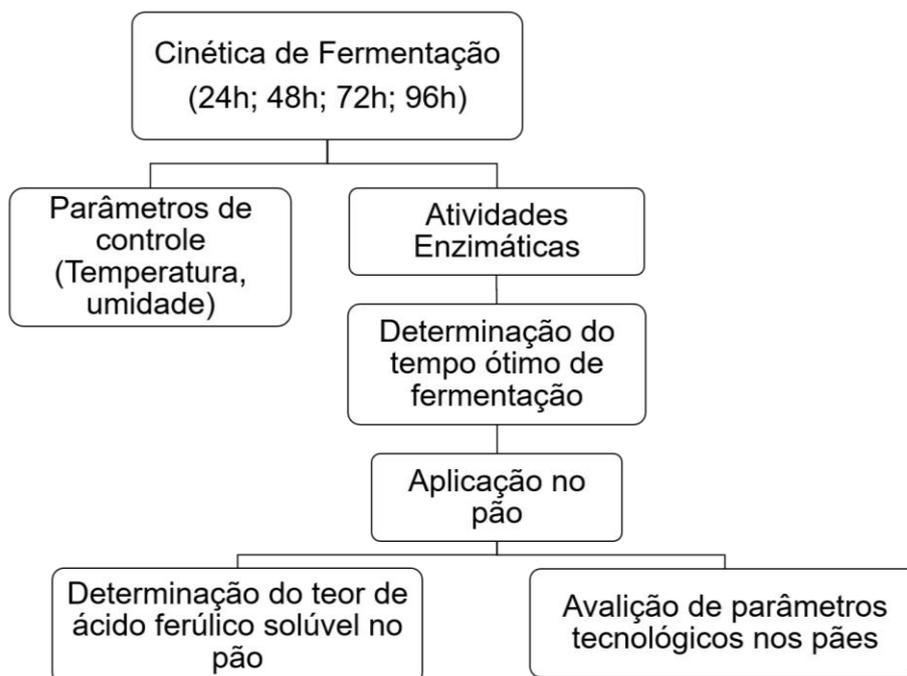


Figura 10. Fluxograma cronológico com as etapas do trabalho.

4. Resultados e discussão

4.1 Umidade, atividade de água e pH

Os valores obtidos para as análises de umidade, atividade de água e pH para os três diferentes meios de cultivo ao longo da cinética de crescimento do fungo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Valores de umidade, atividade de água (a_w) e pH para a cinética de crescimento do fungo ao longo de 96 horas de fermentação. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de fermentação (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fermentado de resíduo de malte cervejeiro			
Tempo (horas)	Umidade (%)	Atividade de água (a_w)	pH
24	53,13 ± 0,7 ^a	0,982 ± 0,005 ^a	6,45 ± 0,15 ^a
48	56,06 ± 2,0 ^a	0,983 ± 0,019 ^a	5,70 ± 0,20 ^b
72	55,09 ± 6,8 ^{ab}	0,981 ± 0,003 ^a	4,15 ± 0,15 ^c
96	55,70 ± 6,4 ^b	0,974 ± 0,002 ^a	3,85 ± 0,15 ^d

Fermentado de farelo de trigo			
Tempo (horas)	Umidade (%)	Atividade de água (a_w)	pH
24	64,19 ± 0,5 ^a	0,985 ± 0,007 ^a	7,15 ± 1,50 ^a
48	66,17 ± 3,8 ^a	0,981 ± 0,005 ^a	6,80 ± 0,05 ^b
72	71,00 ± 1,5 ^a	0,982 ± 0,002 ^a	5,30 ± 0,10 ^c
96	62,79 ± 3,9 ^a	0,983 ± 0,003 ^a	5,05 ± 0,05 ^d

Fermentado de farelo de cacau			
Tempo (horas)	Umidade (%)	Atividade de água (a_w)	pH
24	53,09 ± 1,6 ^a	0,988 ± 0,002 ^a	6,75 ± 0,15 ^a
48	52,35 ± 1,3 ^a	0,987 ± 0,003 ^a	6,50 ± 0,10 ^b
72	50,82 ± 0,7 ^a	0,985 ± 0,002 ^a	5,35 ± 0,05 ^c
96	48,57 ± 0,4 ^a	0,986 ± 0,002 ^a	5,15 ± 0,05 ^d

A umidade, a atividade de água (a_w) e o pH são parâmetros de controle acompanhados ao longo da cinética de fermentação e que tem por fim avaliar o crescimento do microrganismo no meio e que podem modificar sua produção metabólica (PANDEY, 2003).

De forma geral, observa-se que não houve variação na atividade de água ao longo de todas as fermentações. Em contrapartida, observou-se queda no pH, ou seja, acidificação do meio, verificada em todos os resíduos fermentados. Sabe-se por estudos prévios que o pH do meio é um parâmetro essencial para a atividade de

uma enzima (SOBRAL et al., 2012). O resultado obtido condiz com outros trabalhos que relatam o uso deste microrganismo como produtor de compostos de interesse (AMORIM et al., 2017).

A umidade não variou ao longo da cinética de fermentação para o farelo de cacau e de trigo. Durante a FES, o fungo consome a água disponível no meio para realizar suas reações de síntese, sendo assim, os resultados variaram de forma inesperada, apresentando valores constantes entre as análises. Houve variação apenas em 96 horas de fermentação com bagaço de malte cervejeiro.

Por possuir elevada heterogeneidade, o substrato e o microrganismo que se desenvolve nele devem ser bem homogeneizados para realização da análise de umidade (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

4.2 Teor de proteínas

O teor de proteínas totais de cada extrato aquoso enzimático utilizado para aplicação na massa do pão integral está demonstrado no gráfico abaixo.

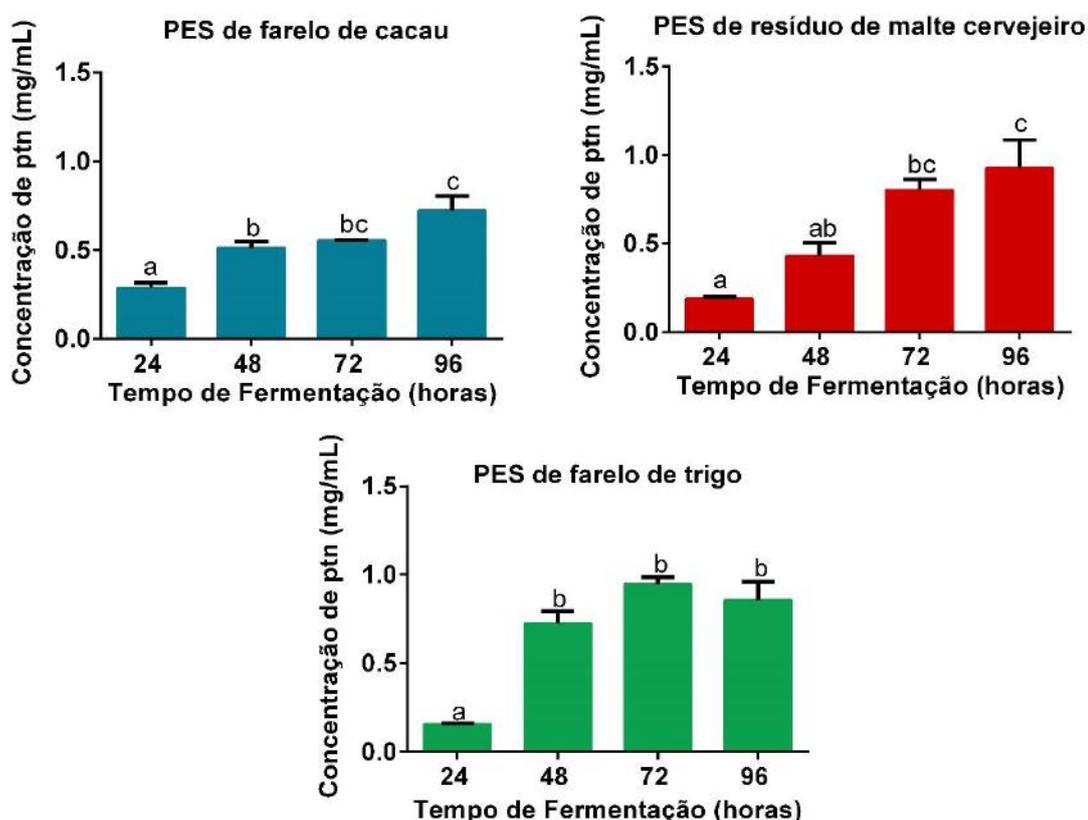


Figura 11. Teor de proteínas totais no extrato enzimático expresso em (mg/mL). Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes

letras indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de fermentação da mesma amostra (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os teores máximos de proteína se mantiveram abaixo de 1,0 mg/mL de extrato enzimático. O farelo de trigo foi o único meio com produção máxima de proteínas em 48 horas de fermentação e manutenção do teor até 96 horas. Os outros extratos enzimáticos obtidos a partir dos substratos apresentaram aumento gradativo no teor de proteínas ao longo das 96 horas de fermentação.

Observa-se que ao longo do processo fermentativo houve aumento na concentração de proteínas solúveis em todos extratos dos meios de fermentação. Como enzimas são compostas por proteínas, este resultado pode nos sugerir que houve produção de enzimas nos substratos avaliados ao longo da cinética de fermentação e/ou que houve liberação de proteínas insolúveis do substrato para o meio ao longo da fermentação

4.3 Atividades enzimáticas

4.3.1 Perfil de produção de xilanase

Foi verificada atividade enzimática de xilanase ao longo da cinética de fermentação de todos os meios de cultivo testados. Na figura abaixo, é demonstrado o perfil de atividade enzimática em base seca de PES e a produtividade para o resíduo de malte cervejeiro ao longo das 96 horas de cultivo do fungo.

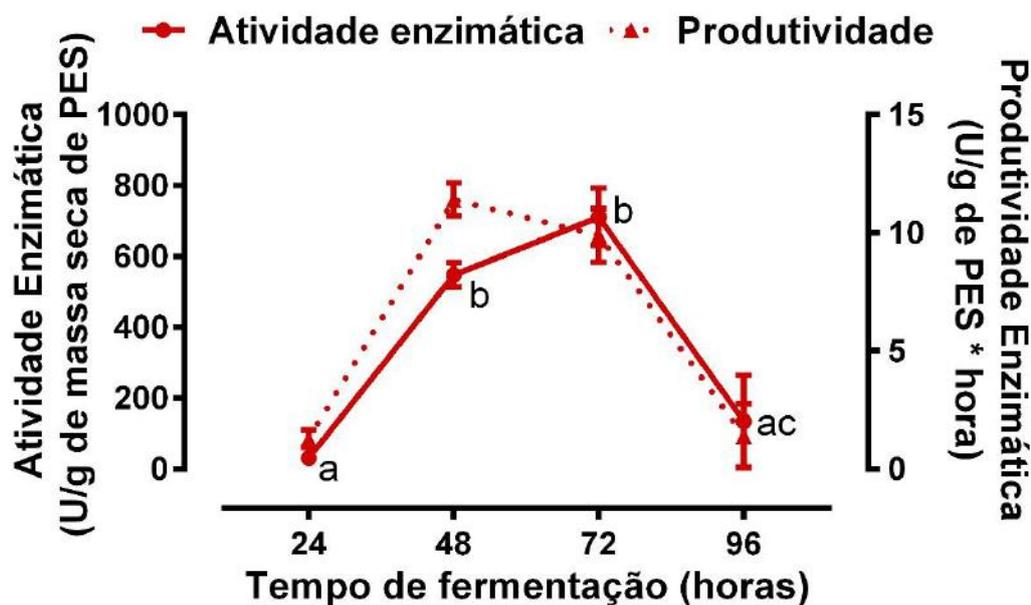


Figura 12. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

O resíduo de malte cervejeiro apresentou um pico de atividade enzimática em 48 horas de fermentação, atingindo o valor máximo médio de 547,9 U/g de massa seca de PES. A produtividade enzimática, ou seja, a atividade enzimática considerando o tempo de fermentação, também apresenta valor máximo em 48 horas (11,42 U/g de massa seca de PES x hora). Observando o gráfico, nota-se que ainda que haja um aumento na atividade de xilanase de 48 horas para 72 horas, não há diferença estatística entre estes tempos de fermentação.

Utilizando o farelo de trigo como substrato para cultivo do *Aspergillus awamori* obteve-se um perfil diferente de atividade e produtividade enzimática de xilanase. Este resultado é demonstrado na figura 13.

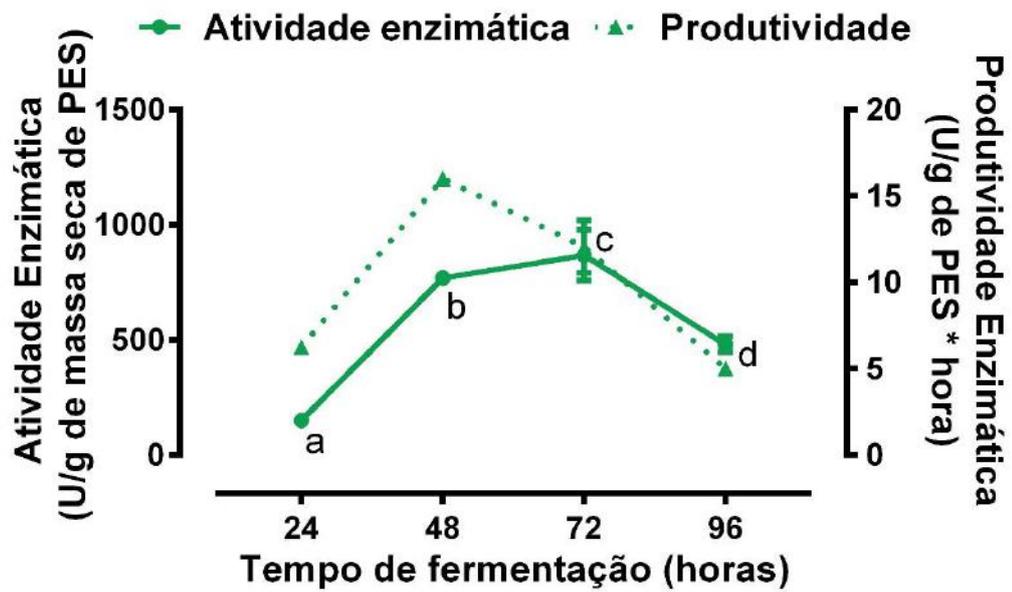


Figura 13. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Analisando os dados obtidos das análises constata-se que o pico máximo de atividade enzimática de xilanase neste meio se deu em 72 horas de fermentação atingindo um valor de 868,1 U/g de massa seca de PES, enquanto sua produtividade máxima foi em 48 horas com um valor de 16 U/g de massa seca de PES x hora.

Por último, é apresentado na figura 14 o perfil de atividade enzimática utilizando o farelo de cacau como substrato para fermentação.

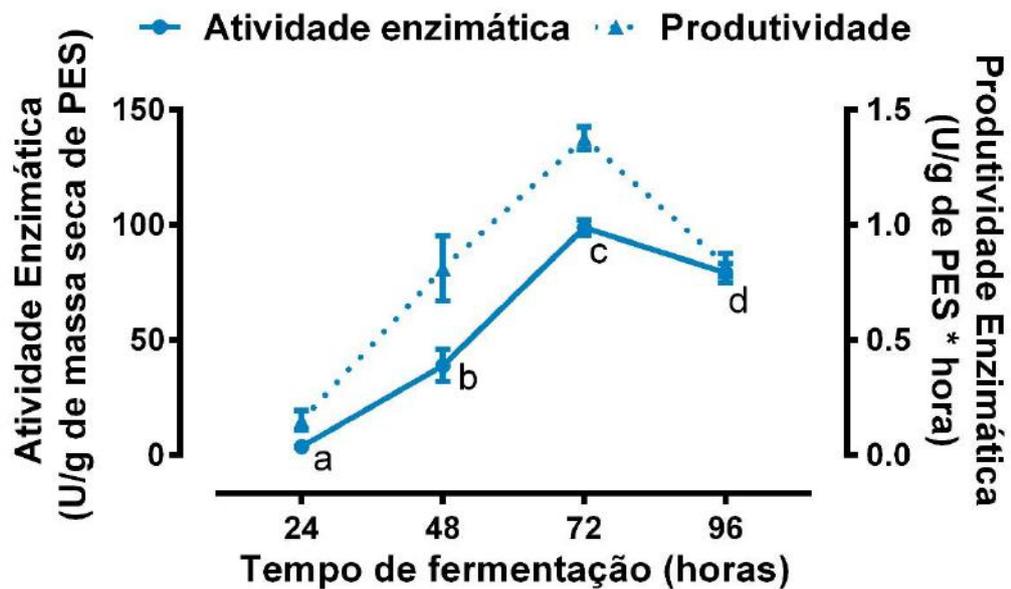


Figura 14. Perfil da atividade e produtividade enzimática de xilanase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Foi observado que o pico de produção enzimática de xilanase pelo fungo ocorreu em 72 horas de fermentação, com um valor de 98,9 U/g de massa seca de PES. A produtividade da enzima também se deu em 72 horas, tendo atingido um valor de 1,37 U/g de massa seca de PES x horas.

Já foi reportado na literatura o uso de farelo de cacau e de *A. awamori* para produção de xilanases com uma atividade máxima de 60 U/g de massa seca de PES. Neste presente trabalho obteve-se uma atividade maior apesar de terem sido utilizadas as mesmas condições de fermentação descritas na literatura (BOUÇA, 2017). Isso mostra que a FES deve ter parâmetros muito bem controlados, pois mesmo aqueles que, em um primeiro olhar, parecem sutis, como o tamanho de partícula ou a altura do leito utilizado, podem ter grandes influências em como o microrganismo se desenvolve no meio.

A literatura sobre produção de xilanases por fermentação em estado sólido é vasta e diversos trabalhos relatam o uso de fungos do gênero *Aspergillus*, incluindo o *A. awamori* (YIN et al., 2018). Quanto a atividade enzimática, há trabalhos que relatam resultados para a atividade de xilanase que vão desde dezenas (60 U/g) a

milhares (3152 U/g) de unidades de atividade enzimática (BOUÇA, 2017; OUTEIRIÑO et al., 2019).

Há grande variedade de substratos utilizados como meio de crescimento para o microrganismo e de espécies e cepas de fungos utilizados para a fermentação em estado sólido. Conseqüentemente, há uma grande variação nos resultados encontrados para a atividade de xilanase na literatura (BOTELLA et al., 2007; SUNGURTAS et al., 2004).

Deve-se atentar sempre para a finalidade da produção enzimática. Neste trabalho propôs-se a produção de enzimas nestes meios para posterior aplicação em massa de pão integral. Assim, as atividades enzimáticas devem estar de acordo com esta aplicação, valores muito baixos resultarão em mudanças inexpressivas na massa do pão e valores muito altos podem degradar a estrutura da massa de pão e resultar na perda da capacidade de retenção de ar (DAHIYA; SINGH, 2018).

Ao compararmos a atividade xilanásica obtidas com os diferentes substratos vemos que o farelo de trigo foi o meio que apresentou a maior atividade enzimática, seguido do resíduo de malte cervejeiro e do farelo de cacau. O resultado é apresentado na figura 15, abaixo.

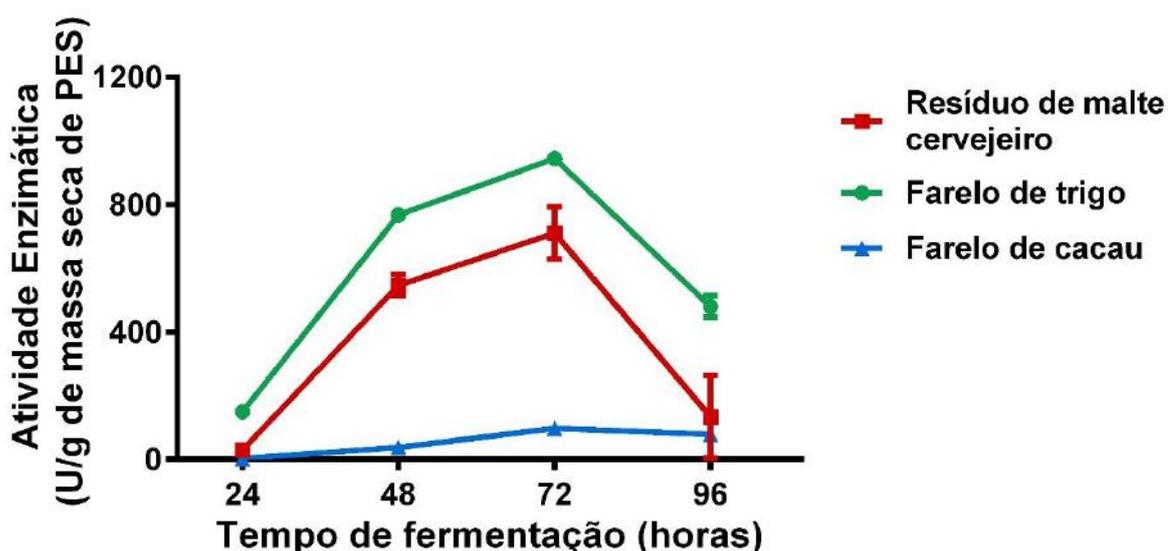


Figura 15. Atividade xilanásica ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.

Uma possibilidade é a de que, devido à composição estrutural do farelo de trigo, a grande quantidade de arabinoxilanas, ligninas e celulose presentes nele tenham induzido a produção desta enzima, bem como de outras enzimas

pertencentes ao complexo xilanolítico. O resíduo de malte também é composto em grande parte por polissacarídeos estruturais e, por isso, é esperado que este substrato também apresente grande atividade desta enzima (DILOKPIMOL et al., 2016).

Por outro lado, o farelo de cacau tem em sua composição diversos outros tipos de fibra que não as arabinosilanas. Esse fato pode ter induzido o microrganismo a sintetizar enzimas necessárias para seu desenvolvimento, mas não majoritariamente enzimas do complexo xilanolítico. Assim, há atividade de xilanase, porém menor se comparada aquela obtida utilizando o farelo de trigo e o resíduo de malte como substrato (VÁSQUEZ et al., 2019).

4.3.2 Perfil de produção de alfa-amilase

O perfil de produção de alfa-amilase ao longo da cinética de fermentação utilizando o resíduo de malte cervejeiro é apresentado na figura 16 abaixo.

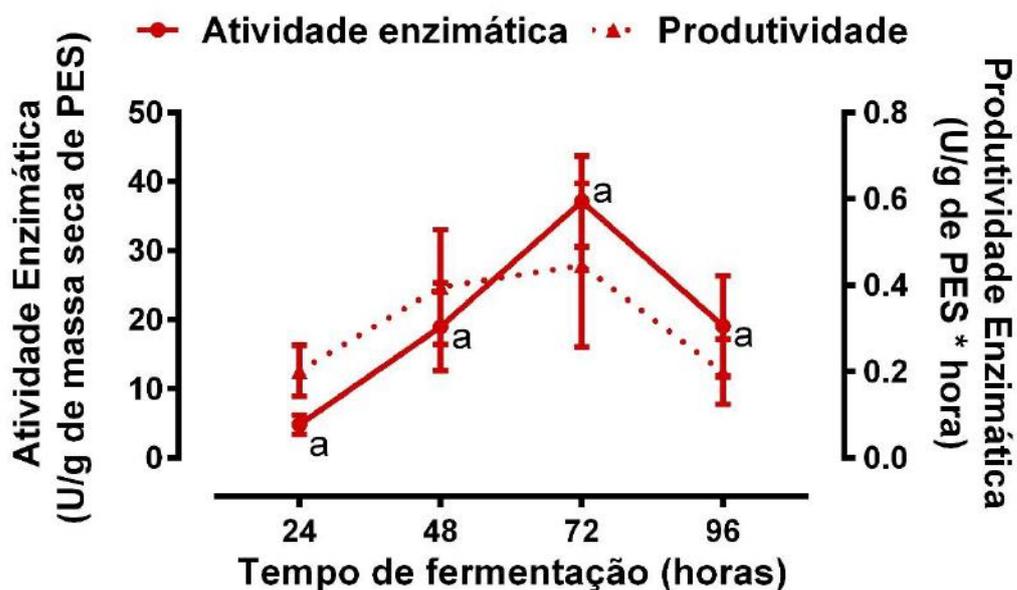


Figura 16. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Observa-se que houve produção da enzima em todos os dias de fermentação, entretanto, não houve variação estatística entre os dias.

Outros trabalhos demonstraram que podem ser obtido valores na ordem dos milhares para a atividade de amilase (5085 U/g de massa seca de PES) utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato para FES. Entretanto, para isto, é necessário a suplementação do meio com CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e licor de maceração de milho, um subproduto da moagem úmida do milho (XU et al., 2008).

A atividade e produtividade de amilase obtidas com farelo de trigo como meio de cultivo do *A. awamori* são apresentadas no gráfico abaixo.

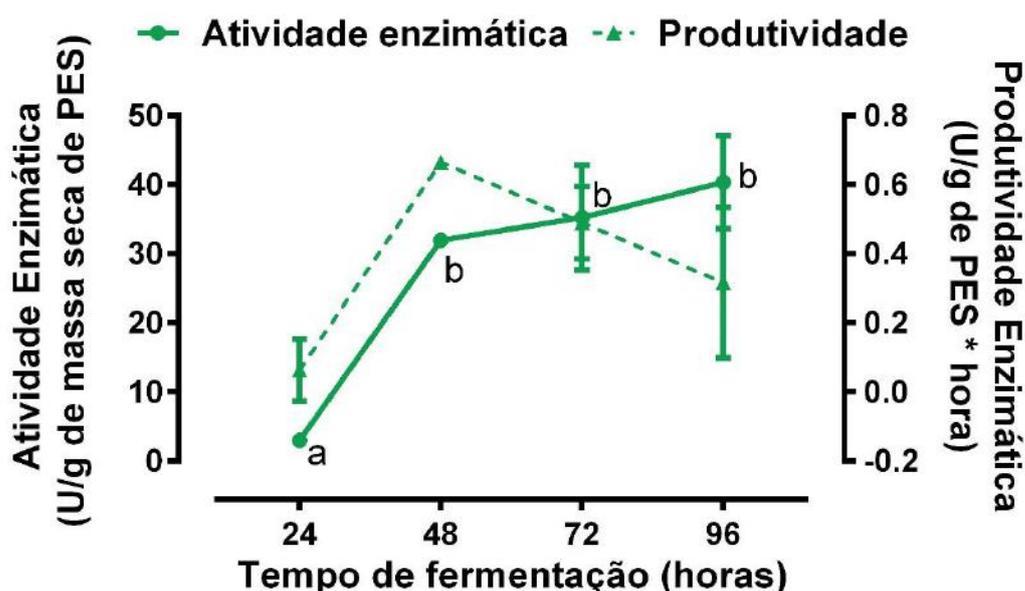


Figura 17. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

A partir da análise, observa-se que houve atividade amilásica durante todo o processo fermentativo, o pico de atividade enzimática tendo sido atingido com 48 horas de fermentação (35,3 U/g de massa seca de PES). Nota-se que não houve variação estatística a partir do segundo dia de fermentação, a atividade se manteve constante. A produtividade máxima também foi atingida em 48 horas, com um valor máximo de 0,66 U/g de massa seca de PES x hora.

A atividade de amilase obtida por FES em farelo de trigo é amplamente reportada na literatura, YIN et al., 2018 relatou atividade amilásica específica em torno de 900 U/g de proteína para outras espécies de *Aspergillus* como o *A. niger* e o *A. oryzae*. Enquanto que KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005 relataram

atividades em torno de 534 U/g de massa seca de PES utilizando *Thermomyces lanuginosus* como microrganismo produtor.

As diferentes formas de expressar a atividade enzimática dificultam a comparação entre os valores encontrados na literatura. A atividade pode ser expressa sob a forma de atividade específica, considerando a quantidade de proteínas presentes no extrato enzimático e resultando em valores muito diferentes dos correspondentes expressos em atividade enzimática por grama de substrato. Comumente, encontra-se trabalhos utilizando atividade específica quando se tem por objetivo purificar, ainda que em parte, as enzimas. Enquanto que trabalhos que utilizam o substrato total ou o extrato enzimático, costumam apresentar a atividade sob a forma de U/g de massa seca de substrato ou U/mL de extrato, respectivamente (SAHNOUN et al., 2013; XU et al., 2008; YIN et al., 2018).

Finalmente, apresenta-se na figura 18 o gráfico com a atividade e produtividade enzimática obtidos para a fermentação em estado sólido com farelo de cacau como substrato.

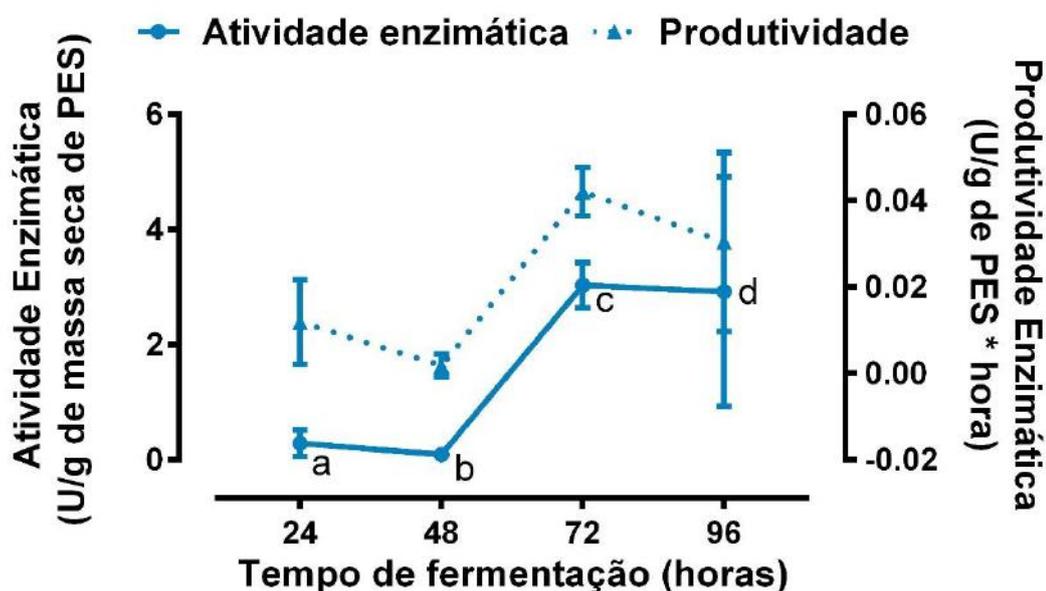


Figura 18. Perfil da atividade e produtividade enzimática de alfa-amilase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Este resíduo apresentou a menor atividade de amilase dentre os substratos analisados. Sua atividade e produtividade máximas de amilase durante o processo fermentativo se deu em 72 horas, atingindo um valor de 3,0 U/g de massa seca de PES e 0,04 U/g de massa seca de PES, respectivamente.

Na figura 19, abaixo é apresentada os valores para as atividades enzimáticas de amilase para os três resíduos agrupadas.

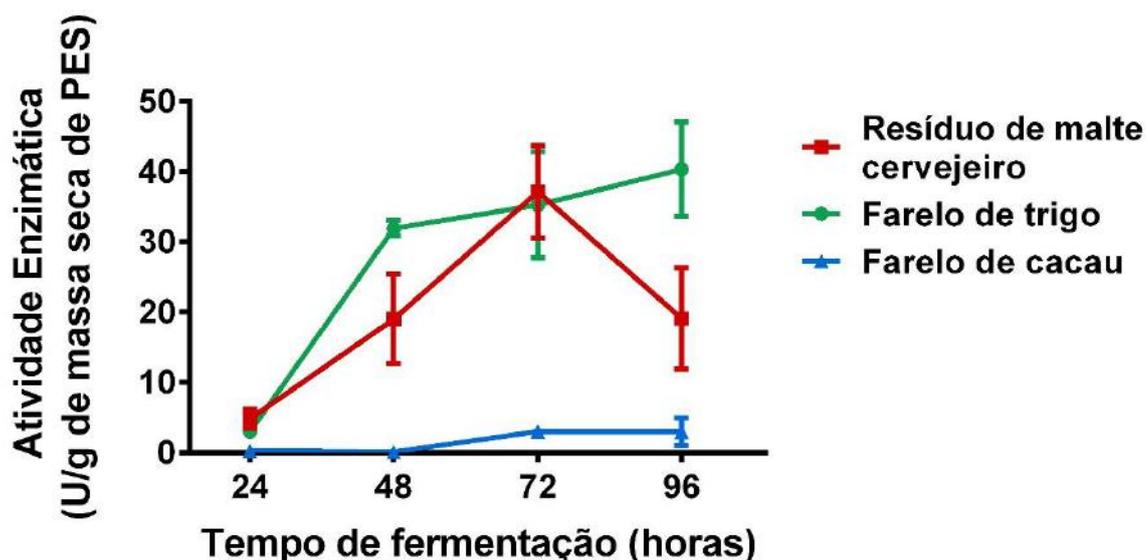


Figura 19. Atividade amilásica ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.

Ao compararmos as atividades enzimáticas de amilase obtidas utilizando os três diferentes meios fica claro que, dentre estes três meios, o farelo de trigo e o resíduo de malte cervejeiro são os substratos mais indicados para a obtenção de amilases por FES com *Aspergillus awamori*.

Apesar disso, a atividade amilolítica obtida por FES nestes dois substratos ainda é pequena se comparada com outros trabalhos da literatura. Entretanto, observa-se que há variações nas condições fermentativas, como temperatura, adição de tampão para controle do pH, adição de sais, como $MgSO_4$ ou $CaCl_2$ e de outros suplementos que aumentem as fontes de carbono e nitrogênio para o fungo (KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005).

Como este trabalho tem o viés de aplicação em produtos alimentícios, deve-se atentar para adição de qualquer reagente, pois o mesmo deve ser seguro para alimentação humana.

4.3.3 Perfil de produção de feruloil-esterase

A feruloil-esterase (FAE) é uma das enzimas que compõe o complexo xilanolítico, que degrada as arabinoxilanas e os compostos associados a ela, como os ésteres de ácido ferúlico. Desta forma, a sua atuação é intrínseca à atuação da xilanase. Diz-se que ambas atuam de forma sinérgica, ou seja, dependem da ação mútua para que elas possam acessar seus sítios de ação e atuem no polissacarídeo (TABKA et al., 2006).

Abaixo, apresenta-se o perfil de produção de feruloil-esterase durante a fermentação utilizando o resíduo de malte cervejeiro como meio de cultivo. A atividade é expressa em mU/g de massa seca de resíduo de malte fermentado.

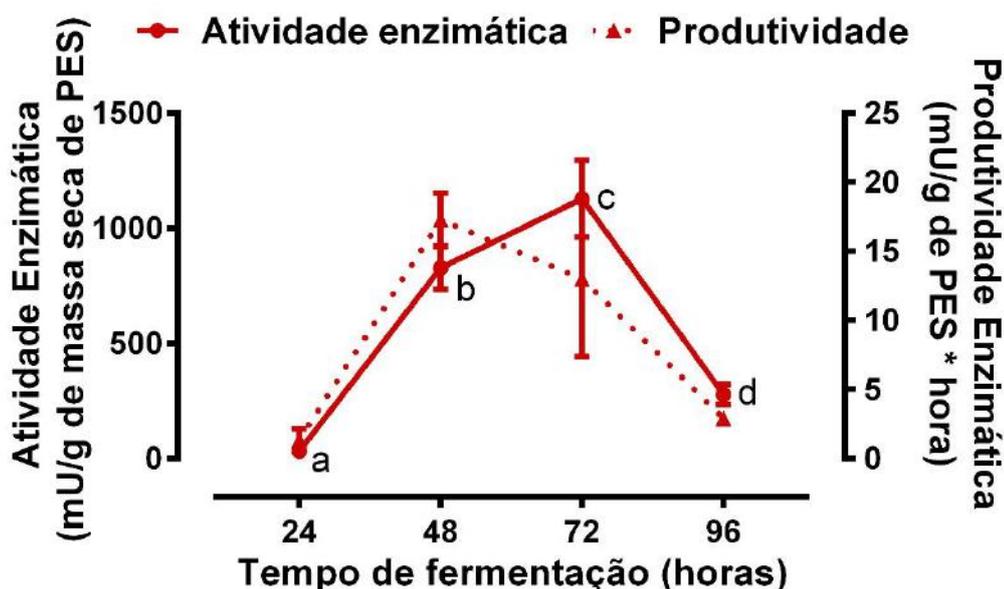


Figura 20. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Destes resultados expressos na figura 20 é possível concluir que 72 horas foi o tempo de fermentação no qual o fungo teve sua produção máxima (1128,3 mU/g de massa seca de PES). Entretanto, em 48 horas ele demonstrou a maior produtividade enzimática (17,21 mU/g de massa seca de PES x h), ou seja, do segundo para o terceiro dia ele demonstrou queda na produtividade enzimática.

Diversos trabalhos que investigam a atividade de xilanase obtida por FES analisam também a atividade de feruloil-esterase, certamente devido ao seu papel

em conjunto com a xilanase como supracitado. PANAGIOTOU; GRANOUILLET; OLSSON, 2006 utilizaram uma cepa de *Aspergillus brasilianum* e obtiveram uma atividade enzimática máxima de 1542 mU/g de massa seca de PES utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Concomitantemente, analisaram a atividade de xilanase no meio e obtiveram um máximo de 573 U/g de massa seca de PES.

Apresenta-se abaixo os resultados para a atividade enzimática e a produtividade de feruloil-esterase obtidos para a cinética de fermentação utilizando o farelo de trigo como meio de cultivo.

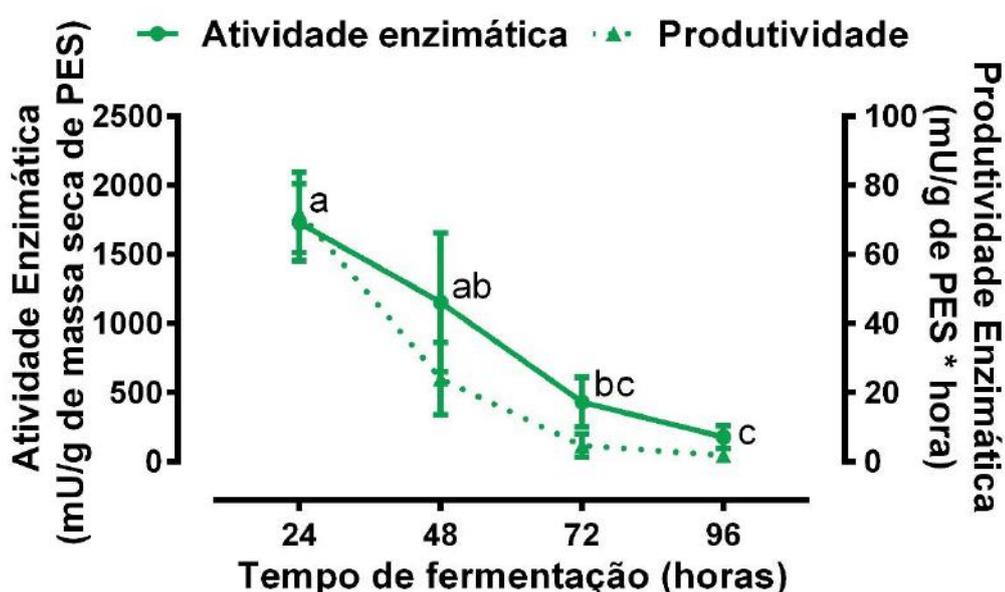


Figura 21. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Observa-se que o valor máximo obtido para a atividade e produtividade de FAE se deu em 24 horas de fermentação, atingindo um valor de 1730,3 mU/g de massa seca de PES e de 72,13 mU/g de massa seca de PES x h, respectivamente.

Além disso, é reportado o uso de farelo de trigo como meio de cultivo para diversos fungos com o objetivo de produção de enzimas do complexo xilanolítico. HEGDE et al., 2006 obtiveram atividade máxima de FAE com 72 horas de fermentação utilizando farelo de trigo e uma cepa selecionada de *A. niger* (1500 mU/g de massa seca de PES).

Finalmente, apresenta-se na figura 22, abaixo, o perfil de produtividade e atividade de feruloil-esterase ao longo dos quatro dias de cultivo utilizando o farelo de cacau como meio.

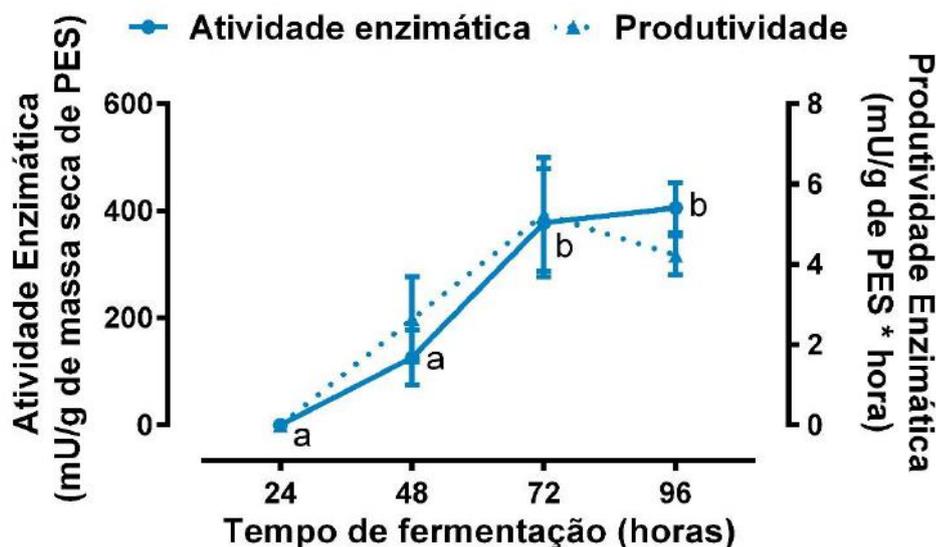


Figura 22. Perfil da atividade e produtividade enzimática de feruloil-esterase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

A atividade enzimática de FAE neste meio atingiu seu máximo em 72 horas (378,1 mU/g de massa seca de PES) bem como sua produtividade (5,25 mU/g de massa seca de PES x h).

Diferentemente dos outros dois substratos estudados neste trabalho, o farelo de cacau é um meio no qual não há um alto teor de ácido ferúlico ligado na matriz estrutural que compõe a parede celular. Desta forma, não há na literatura uma diversidade de pesquisa com o objetivo de produzir esta enzima.

Por último, comparamos as atividades e produtividades enzimáticas durante a cinética de crescimento do microrganismo para os três meios de cultivo utilizados na figura 23.

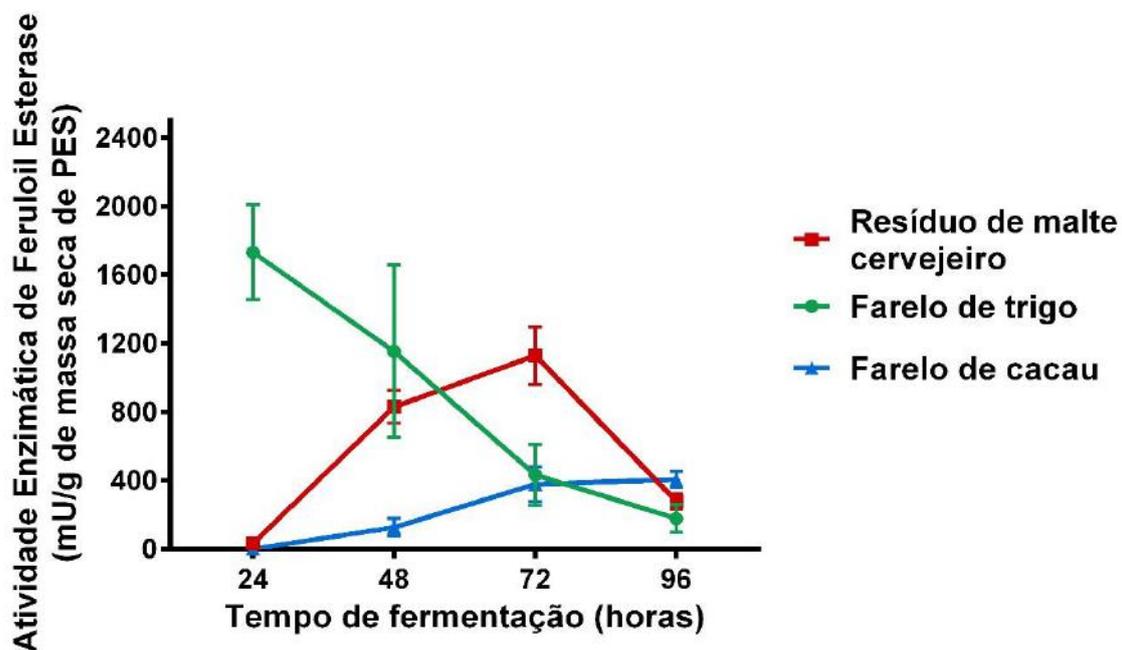


Figura 23. Atividade de feruloil-esterase ao longo dos quatro dias da cinética de fermentação utilizando os três substratos objetos de estudo deste trabalho.

Comparando os resultados de atividade de feruloil-esterase obtidos utilizando cada um dos substratos é possível concluir que todos os substratos apresentaram atividade enzimática, sendo o farelo de trigo aquele que apresentou a maior atividade dentre os três, chegando a um valor máximo de 1730,3 mU/g de massa seca em 24 horas de fermentação.

Seguido dele, vem o resíduo de malte cervejeiro, que teve seu pico de produção em 72 horas, alcançando o valor de 1128,3 mU/g de massa seca e, por fim, o farelo de cacau com a menor atividade máxima dentre eles em 72 horas 378,1 mU/g de massa seca de PES.

YIN et al., 2018 havia demonstrado atividade de FAE utilizando três diferentes fungos do gênero *Aspergillus*, incluindo o *A. awamori*, em farelo de trigo. As atividades enzimáticas relatadas por Yin, chegaram a 3500 mU/g de proteína. Em contrapartida, PANAGIOTOU; GRANOUILLET; OLSSON, 2006 demonstraram valores de atividade máxima de feruloil-esterase similares aos obtidos neste trabalho (1026 mU/g de massa seca de PES) utilizando resíduo de malte cervejeiro para uma FES com *Penicillium brasilianum*.

De certo, apesar das atividades enzimáticas obtidas serem altas, deve-se avaliar o teor de ácido ferúlico solúvel no pão bioprocessado pois, a atuação da

feruloil-esterase no meio é dependente de outras enzimas que compõe o complexo xilanolítico e capazes de degradar o restante do polissacarídeo no qual o ácido encontra-se ligado (PANAGIOTOU; GRANOUILLET; OLSSON, 2006).

Assim, visto que a atividade de xilanase PES obtido pela fermentação com o farelo de cacau foi baixa quando comparada aos outros substratos, não nos surpreende que a atividade de FAE em farelo de cacau como meio de cultivo seja menor.

Além disso, de forma qualitativa, observou-se que o crescimento do microrganismo foi menos pronunciado utilizando como substrato o farelo de cacau, enquanto que o resíduo de malte cervejeiro foi aquele no qual o fungo demonstrou de forma mais evidente uma maior colonização do meio.

4.3.4 Perfil de produção de peptidases

As peptidases representam uma classe de enzimas com propriedade proteolítica. O objetivo desta análise não era ser específica, mas apenas determinar a atividade de peptidases de forma geral no material fermentado. Na figura abaixo está representada o perfil da atividade proteolítica ao longo da fermentação utilizando o resíduo de malte cervejeiro como meio de cultivo.

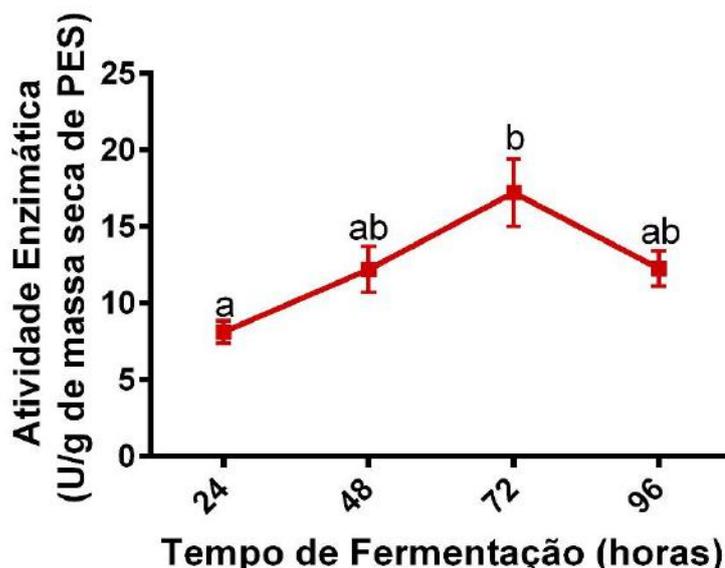


Figura 24. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando resíduo de malte cervejeiro como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

De maneira geral, observa-se que houve variação estatística entre o primeiro e o terceiro dia de fermentação. A atividade máxima atingida foi de 17,1 U/g de massa seca de PES em 72 horas de fermentação.

A diminuição na atividade enzimática das outras enzimas estudadas neste trabalho pode estar associada, pelo menos em parte, ao aumento na atividade de peptidase durante o processo fermentativo. Peptidases hidrolisam ligações peptídicas liberando fragmentos de proteínas e até aminoácidos livres, desta forma, elas degradam as próprias enzimas presentes no meio (GIOVANINI, 2014).

Abaixo, na figura 25, é apresentado o perfil de atividade de proteases ao longo da FES utilizando farelo de trigo como substrato.

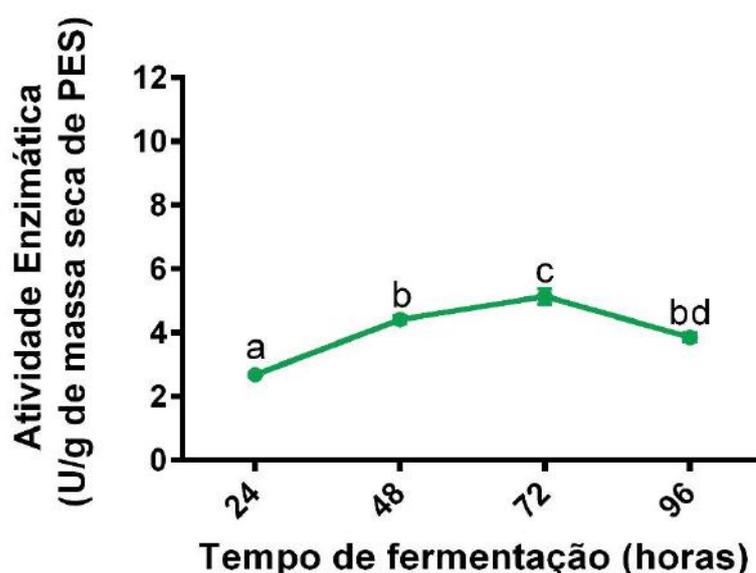


Figura 25. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando farelo de trigo como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Para o farelo de trigo, constata-se que houve um aumento na atividade de peptidase ao longo da cinética crescimento do fungo, tendo uma produção máxima em 72 horas (5,1 U/g de massa seca de PES).

Assim como para o resultado obtido para o resíduo de malte cervejeiro e para o farelo de trigo, houve aumento na atividade de proteases durante a FES realizada com o farelo de cacau como substrato, demonstrado na figura 25. Houve um pico de produção em 96 horas, atingindo 7,1 U/g de massa seca de PES.

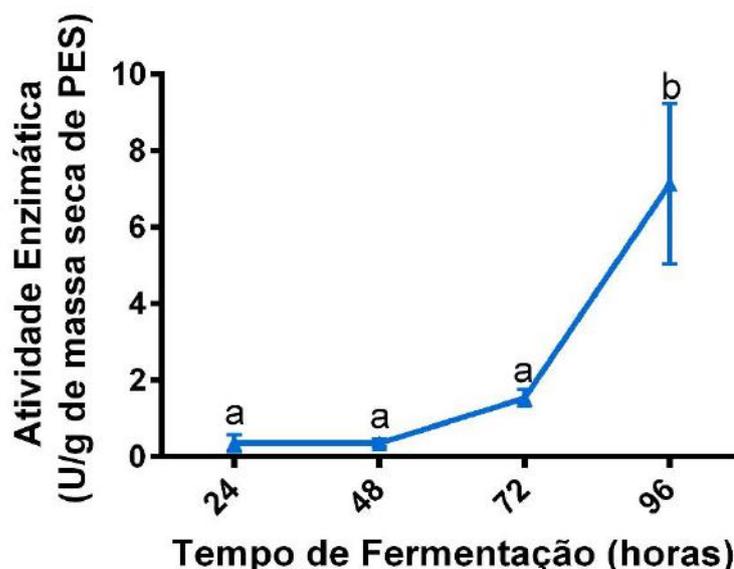


Figura 26. Perfil da atividade enzimática de peptidase ao longo da fermentação utilizando farelo de cacau como substrato. Resultados expressos sob a forma de média \pm desvio padrão de triplicata. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Todos estes resultados corroboram com o conceito de que ao longo do processo de fermentação em estado sólido, o microrganismo produz enzimas a partir das fontes de carbono e nitrogênio que estão disponíveis no meio de cultivo e que, ao longo dos dias, conforme os recursos para o desenvolvimento do fungo tornam-se escassos, ele passa a produzir peptidases para que proteínas e até mesmo suas enzimas atuem como fontes para garantir a subsistência dele no meio (GIOVANINI, 2014).

As peptidases obtidas por FES vêm sendo utilizadas na indústria alimentícia para a produção de queijos, como substituto da renina de origem animal, além de serem utilizadas para amaciar produtos cárneos e produzirem precursores de aroma e sabor em diversos alimentos (DE SOUZA et al., 2015).

Na indústria da panificação, a utilização de proteases se dá na degradação do glúten em cepas de trigo com elevado teor de proteínas, como algumas encontradas nos Estados Unidos. Como a malha do glúten é essencial para a estrutura do pão, sua utilização é restrita a este tipo de trigo visto que uma atividade muito expressiva pode fornecer resultados negativos para a massa do pão, como menor volume e capacidade de retenção de gás resultando em pães com formato indesejado (KORNBRUST; FORMAN; MATVEEVA, 2012).

4.3.5 Determinação do coproduto e do tempo ideal de fermentação

A partir dos dados obtidos para as análises enzimáticas utilizando os três substratos determinou-se o tempo de fermentação e os substratos que mais convinham para aplicação em pão integral.

A FES com farelo de trigo apresentou a maior atividade de feruloil-esterase com 24 horas de fermentação (1730,3 mU/g de massa seca de PES) e neste mesmo dia, a sua atividade de xilanase foi de 150,3 U/g de massa seca de PES. Como este trabalho tem por objetivo estudar o aumento na quantidade de compostos fenólicos solúveis em pães bioprocessados, optou-se por utilizar o farelo de trigo fermentado por 24 horas para a aplicação em pão integral.

Por outro lado, a FES com resíduo de malte cervejeiro apresentou a maior atividade de feruloil-esterase em 72 horas de fermentação 1128,2 mU/g de massa seca de PES, enquanto que sua atividade máxima de xilanase se deu em 48 horas, 547,9 U/g de massa seca de PES. Dentre estes resultados, escolheu-se por utilizar o PES com 48 horas de cultivo, pois neste tempo de fermentação a produtividade enzimática de FAE era máxima (17,2 mU/g m.s. PES/h) e sua atividade enzimática era elevada (828,9 mU/g de massa seca de PES), e assim, há menor consumo energético para manutenção do processo.

Finalmente, o PES de farelo de cacau apresentou os menores resultados para as análises de atividade enzimática (xilanase, feruloil-esterase e alfa-amilase) quando comparados aos resultados obtidos para os outros dois substratos. Assim, optou-se por produzir os pães apenas com os materiais fermentados de resíduo de malte cervejeiro e de farelo de trigo.

Tabela 4. Atividades enzimáticas referentes a cada PES utilizado para a produção dos pães.

	PES de farelo de trigo	PES de resíduo de malte cervejeiro
Feruloil-esterase	1731,2 ± 278 mU/g PES	828,9 ± 93,94 mU/g PES
Xilanase	150,3 ± 5,0 U/g PES	547,9 ± 6,1U/g PES
Amilase	3,0 ± 0,1 U/g PES	19,0 ± 6,4 U/g PES
Protease	2,7 ± 0,1U/g PES	12,2 ± 1,5 U/g PES

4.4 Características físico-químicas dos pães

Na tabela abaixo são descritos os valores obtidos nas análises das características físico-químicas dos pães produzidos.

Tabela 5. Massa, volume aparente e densidade aparente médios dos pães elaborados.

Amostra	PC	PBM	PBF
Massa (g)	706,0 ± 8,8 ^a	696,5 ± 5,5 ^a	704 ± 3,0 ^a
Volume (cm ³)	1875 ± 35 ^a	1550 ± 50 ^a	1930 ± 110 ^a
Densidade (g/cm ³)	0,38 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,02 ^a

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras. ANOVA seguido de pós-teste T de Tukey, $p < 0,05$. PC = Pão controle; PBM = Pão bioprocessado com fermentado de resíduo de malte cervejeiro; PBF = Pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo.

Os pães produzidos com adição do PES de resíduo de malte cervejeiro apresentaram os menores volumes dentre todos eles. Foi notado de forma qualitativa que a massa do pão apresentou grande volume durante o processo de fermentação da mesma. Ao final do processo de fermentação e início do forneamento da massa, observou-se que ela aparentava não ser capaz de reter o gás carbônico desenvolvido pela levedura na massa do pão. Bolhas de ar escapavam da superfície e a massa apresentava-se mole e sem forma definida.

Apesar do resultado não apresentar variação estatística no volume aferido entre o pão controle e o pão bioprocessado com malte, observa-se uma tendência deste último apresentar menor volume. Acredita-se que caso houvesse mais replicatas de análise, este resultado seria comprovado.

Nas figuras 27, 28 e 29 são apresentadas três fotos deste processo, no início da fermentação da massa, no final da fermentação e após ser assado na panificadora automática para os três pães produzidos.

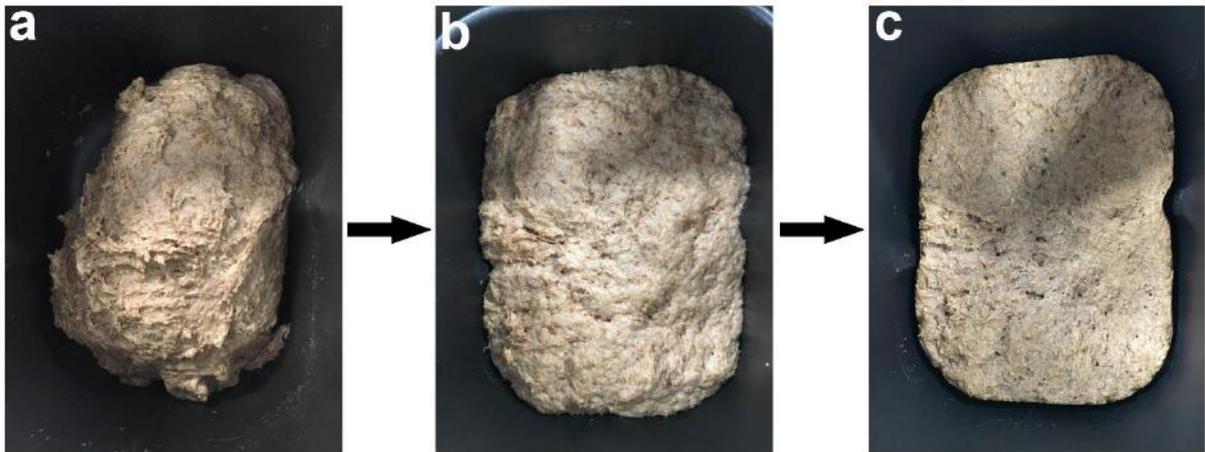


Figura 27. Imagem da massa do pão controle (PC) dentro da panificadora utilizada. **a:** Início da fermentação; **b:** Fim da fermentação; **c:** Pão assado.

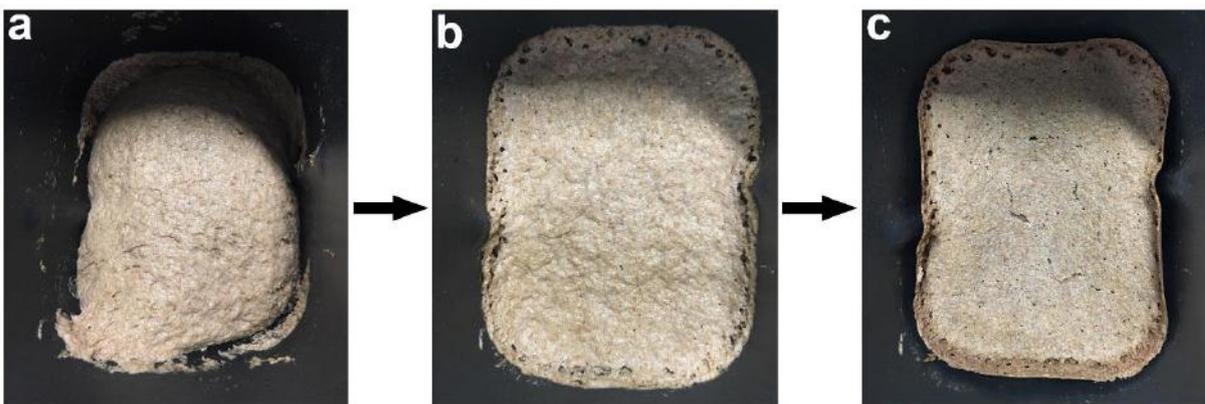


Figura 28. Imagem da massa do pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro (PBM) dentro da panificadora utilizada. **a:** Início da fermentação; **b:** Fim da fermentação; **c:** Pão assado.

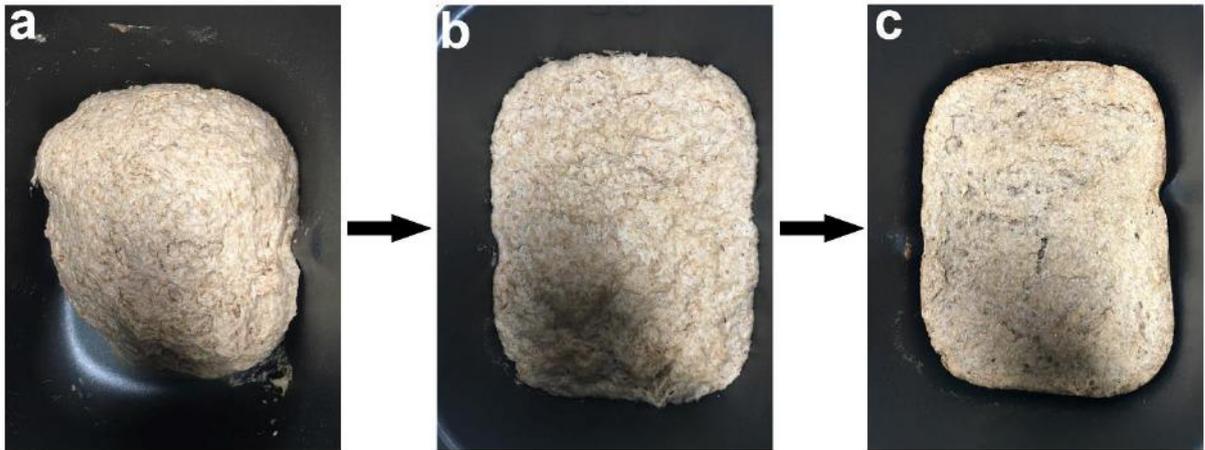


Figura 29. Imagem da massa do pão bioprocessado com PES de farelo de trigo (PBF) dentro da panificadora utilizada. **a:** Início da fermentação; **b:** Fim da fermentação; **c:** Pão assado.

Nos pães feitos utilizando-se o PES de farelo de trigo e seu respectivo extrato enzimático notou-se um aumento no volume do produto final. Nas imagens obtidas para esta amostra, e demonstradas na figura abaixo, é possível perceber que o pão bioprocessado com farelo de trigo demonstrou similaridade com o pão controle.

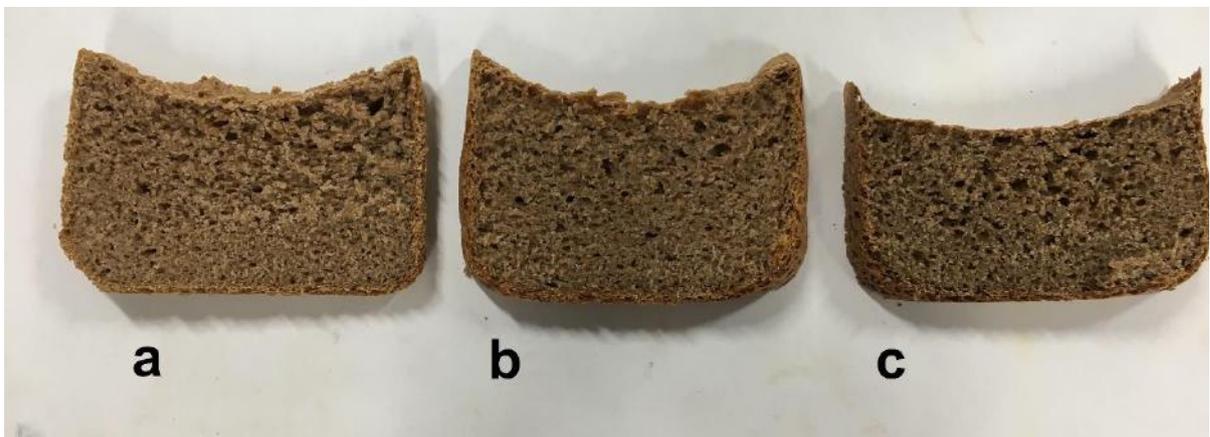


Figura 30. Fatias dos pães assados. **a:** Pão controle; **b:** Pão bioprocessado com PES de farelo de trigo (PBF); **c:** Pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro (PBM)

As atividades de xilanase utilizadas para produção dos pães neste trabalho foram similares às aquelas aplicadas por LAURIKAINEN et al., 1998, o qual reportou aumento de maciez da massa, aumento de 20% no volume específico do pão e

redução no processo de envelhecimento do pão, que resulta no aumento da dureza do mesmo e na redução da sua palatabilidade.

Observa-se que a quantidade de enzima aplicada para a produção dos pães não corresponde diretamente aquela aferida nos extratos enzimáticos. Parte das enzimas produzidas podem estar associadas ao PES, intracelular ao fungo, por exemplo, e assim, o extrato enzimático não contém toda a carga enzimática produzida pelo fungo no substrato e aplicada na massa do pão.

A partir da análise dos dados, especula-se por que a aplicação do PES de malte resultou em uma redução no volume do pão integral produzido. Por se tratar de um pão integral com adição de farelo de trigo, há em sua composição diversas fibras que atuam no grão como polissacarídeos estruturais (como as arabinosilanas, hemicelulose, ligninas) e que possuem grande capacidade de retenção de água.

O glúten, essencial para a formação da estrutura interna do pão não forma uma malha tão bem estruturada devido às fibras que interagem com a rede de proteínas e amido. Conseqüentemente, a massa do pão perde capacidade de retenção do gás carbônico produzido pela levedura durante o processo de fermentação (DAHIYA; SINGH, 2018).

Observa-se que o extrato enzimático de PES de resíduo de malte cervejeiro apresentava atividade proteolítica superior aquela observada para o farelo de trigo. É possível que a atuação desta enzima também possa ter acarretado uma desestruturação da massa do pão devido a ação dela no glúten. De toda forma, como a atividade enzimática aferida é pequena, assim, acredita-se que seu efeito seja minoritário.

GRAY; BEMILLER, 2003 demonstraram que xilanases e outras enzimas apresentam um efeito positivo sobre a malha do glúten, tornando-a mais forte de forma direta ou indireta. Hemiceluloses insolúveis em água são transformadas em formas solúveis pela ação das xilanases, retendo então a água no meio e resultando em massas mais macias e em crostas de pães mais finas e uniformes.

Atualmente, o uso de enzimas na panificação vem sendo preferido em detrimento do uso de aditivos químicos sintéticos, uma vez que as enzimas são inertes no produto. Enzimas tem o potencial de aumentar a estabilidade da massa, a flexibilidade, o volume específico, maquinabilidade (a massa não gruda na pá da batedeira) e a estrutura da casca dos pães (DAHIYA; SINGH, 2018).

Sabe-se que o processo de formação da rede de glúten na massa envolve a segregação do glúten com o amido. Nesta etapa, a xilanase afeta de forma significativa a massa do pão e caso ela seja adicionada antes da adição e mistura dos outros ingredientes, pode-se obter uma *overdose* do efeito da enzima, resultando em efeitos negativos como os relatados neste trabalho (DAHIYA; SINGH, 2018).

WANG; VAN VLIET; HAMER, 2004 observaram que a adição de xilanase purificada juntamente com outros ingredientes resultou em pães com menor volume específico, utilizando farinha com baixo teor de glúten, como neste trabalho. Entretanto, quando sua adição ocorreu após o processo de hidratação da farinha e formação do glúten, houve aumento no volume total dos mesmos.

Desta forma, a atuação da xilanase durante o processo de reaglomeração do glúten causa quebras em sua estrutura afetando as propriedades reológicas deste complexo proteico na massa do pão. Logo, a adição da xilanase e de suas enzimas acessórias deve ser realizada certo tempo após a adição dos outros ingredientes, para que a malha do glúten se desenvolva e não seja afetada de forma negativa.

Finalmente, observou-se também que a produção de pães integrais comerciais geralmente inclui em sua formulação glúten de trigo vital, em pó, como aditivo alimentar. A inclusão deste ingrediente permite que mesmo pães com alto teor de fibras insolúveis mantenham a estrutura interna durante a fermentação e retenham o ar desenvolvido neste processo, sendo considerado um ingrediente crítico na formulação de pães integrais industrializados (TEBBEN; SHEN; LI, 2018).

4.5 Liberação de compostos fenólicos no pão integral

Na figura 31, abaixo, é apresentado o gráfico com os teores de ácido ferúlico solúvel obtidos para cada uma das amostras.

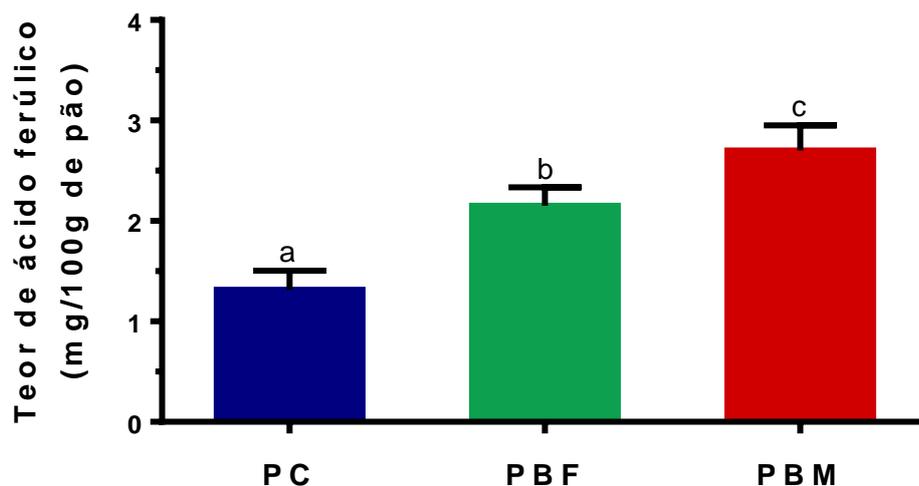


Figura 31. Teor de ácido ferúlico solúvel nas amostras dos pães produzidos. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de duplicatas. Diferentes letras indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas avaliadas (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). PC = Pão controle; PBM = Pão bioprocessado com fermentado de resíduo de malte cervejeiro; PBF = Pão bioprocessado com fermentado de farelo de trigo.

A amostra de pão controle apresentou um teor de ácido ferúlico solúvel de 1,31 mg/100 g de amostra de pão, enquanto que a amostra de pão bioprocessado com PES de farelo de trigo apresentou um teor de 2,15 mg/100 g de amostra de pão e a amostra de pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro 2,70 mg/100 g de amostra de pão. Assim, houve um aumento de 164% de no teor de ácido ferúlico no pão de PES de farelo de trigo e de 206% no pão de PES de resíduo de malte cervejeiro, sendo este último o veículo de bioprocessamento mais eficaz na liberação de ácido ferúlico.

A partir dessa análise é possível concluir que o bioprocessamento enzimático das massas dos pães teve um resultado positivo na liberação de ácido ferúlico da matriz do alimento para fração solúvel. ANSON et al., 2009 observou que a aplicação de enzimas no bioprocessamento de pães resultou em um aumento de 430% no teor de ácido ferúlico em comparação com um pão controle, chegando a um valor de 9 mg/100 g de pão integral bioprocessado. A maior eficiência de liberação relatada por MATEO ANSON et al.(2009) pode estar relacionada com diferenças no bioprocessamento, uma vez que os autores citados adicionaram enzimas no farelo utilizado na produção dos pães por longos períodos de tempo (20 horas), enquanto no presente trabalho as enzimas só ficaram em contato com os

ingredientes do pão no tempo do processo de panificação (aproximadamente 4 horas).

Observa-se ainda que apesar do PES de farelo de trigo apresentar maior atividade de FAE, o pão bioprocessado com PES de resíduo de malte cervejeiro foi aquele que apresentou maior liberação de compostos fenólicos solúveis. Como hipótese, acredita-se que a maior atividade de xilanase observada no PES de malte permitiu que a feruloil-esterase tivesse acesso ao seu sítio de ação no polissacarídeo, assim aumentando a liberação do ácido ferúlico na matriz.

Enquanto no PES de farelo de trigo, apesar da maior atividade de FAE, há menor atividade de xilanase e a sua atuação pode ser restringida devido ao efeito estérico. Conclui-se que deve haver um balanço entre a quantidade de FAE e de xilanases aplicadas na massa do pão, já que ambas atuam juntas para a liberação de compostos fenólicos.

Além do aumento no teor ácido ferúlico solúvel em pães bioprocessados enzimaticamente, outros trabalhos verificaram a eficiência do bioprocessamento na bioacessibilidade e na biodisponibilidade de compostos fenólicos ANGELINO et al., 2017; MATEO ANSON et al., 2011, o que indica um possível potencial funcional dos pães bioprocessados com farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro.

5. Conclusões

Houve produção de todas as enzimas de interesse propostas neste trabalho, *i. e.* xilanase, alfa-amilase e feruloil-esterase, nos três coprodutos da agroindústria por meio da fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Aspergillus awamori*. O resíduo de malte cervejeiro e o farelo de trigo apresentaram os resultados mais expressivos de atividade para as enzimas estudadas, quando comparados ao resíduo de farelo de cacau.

O tempo ideal de fermentação utilizando o resíduo de malte cervejeiro foi de 48 horas, no qual as enzimas xilanase e feruloil-esterase apresentaram atividades de 547,9 U e 828,0 mU por grama de massa seca de PES, respectivamente. Para o farelo de trigo, o tempo ideal de fermentação foi 24 horas, apresentando atividades máximas de feruloil-esterase e de xilanase de 1730,3 mU e 150,3 U por grama de massa seca de PES, respectivamente.

As características tecnológicas do pão integral, como volume aparente e densidade aparente, não foram afetadas pelo bioprocessamento enzimático. Por outro lado, o bioprocessamento enzimático utilizando os fermentados de farelo de trigo e de resíduo de malte cervejeiro se mostrou uma estratégia eficaz para a liberação de compostos fenólicos em pão integral, visto que levou ao aumento do teor de ácido ferúlico solúvel.

6. Perspectivas futuras

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido recomenda-se a aplicação de um planejamento experimental para determinação das melhores condições (momento de adição e quantidade de enzimas adicionadas na massa dos pães) e do melhor tempo de fermentação utilizando os substratos estudados por meio de modelos matemáticos; a análise do efeito da adição de glúten na formulação dos pães enzimaticamente bioprocessados, a análise de parâmetros reológicos da massa e a textura do produto final, a análise sensorial e análises de bioacessibilidade, biodisponibilidade e bioatividade dos pães bioprocessados para determinar de maneira mais assertiva seu potencial funcional.

7. Referências bibliográficas

- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, jun. 2014.
- ALVES, G.; PERRONE, D. Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins. **Food Chemistry**, v. 185, p. 65–74, 2015.
- AMORIM, G. M.; OLIVEIRA, A. C.; GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. March, p. 34–41, 2017.
- ANGELINO, D.; COSSU, M.; MARTI, A.; ZANOLETTI, M.; CHIAVAROLI, L.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D.; MARTINI, D. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. **Food and Function**, v. 8, n. 7, p. 2368–2393, 2017.
- ANSON, N. M.; SELINHEIMO, E.; HAVENAAR, R.; AURA, A. M.; MATTILA, I.; LEHTINEN, P.; BAST, A.; POUTANEN, K.; HAENEN, G. R. M. M. Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6148–6155, 2009.
- ANVISA. Resolução de diretoria colegiada-RDC N°263. **Ministério da Saúde**, v. 184, p. 0–5, 2005.
- BELTON, P. S. **The molecular basis of dough rheology**. Second Edi ed. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I. DE; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. v. 42, p. 98–101, 2007.
- BOUÇA, G. Produção e Caracterização de Xilanases obtidas por Fermentação em Estado Sólido Rio de Janeiro. 2017.
- BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics : a better control of synthesis for new and improved uses. **TRENDS in Plant Science**, v. 8, n. 12, p. 576–581, 2003.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRANDÃO, S. S.; LIRA, H. DE L. **Tecnologia de panificação e confeitaria**. [s.l.: s.n.].
- CARLOS, J. Methods and substrates for feruloyl esterase activity detection, a review. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**”, 2016.
- CARVALHO, G. G. P.; GARCIA, R.; PIRES, A. J. V.; PEREIRA, O. G.; FERNANDES, F. E. P.; CECON, P. R.; AZEVÊDO, J. A. G. Fracionamento de

proteínas de silagem de capim-elefante emurcheado ou com farelo de cacau. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 648–656, 2008.

CAUVAIN, S. **Technology of Breadmaking**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

DAHIYA, S.; SINGH, B. Microbial Xylanases in Bread Making. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 140–149, 2018.

DE OLIVEIRA SILVA, H. G.; PIRES, A. J. V.; DA SILVA, F. F.; VELOSO, C. M.; DE CARVALHO, G. G. P.; CEZÁRIO, A. S.; SANTOS, C. C. Farelo de cacau (*Theobroma cacao* L.) e torta de dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) na alimentação de cabras em lactação o: consumo e produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1786–1794, 2005.

DE OLIVEIRA SILVA, R. **UTILIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA CACAUEIRA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**. [s.l: s.n.].

DE SOUZA, P. M.; DE ASSIS BITTENCOURT, M. L.; CAPRARA, C. C.; DE FREITAS, M.; DE ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

DI GIOIA, D.; LUZIATELLI, F.; NEGRONI, A.; FICCA, A. G.; FAVA, F.; RUZZI, M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 309–316, 2011.

DILOKPIMOL, A.; MÄKELÄ, M. R.; AGUILAR-PONTES, M. V.; BENOIT-GELBER, I.; HILDÉN, K. S.; DE VRIES, R. P. Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2016.

DINELLI, G.; SEGURA-CARRETERO, A.; DI SILVESTRO, R.; MAROTTI, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; BENEDETTELLI, S.; GHISELLI, L.; FERNADEZ-GUTIERREZ, A. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7670–7681, out. 2011.

DZIKI, D. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. n. October 2017, 2014.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 5, p. 463–471, 2006.

GIOVANINI, G. T. **Produção , liofilização , purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo Scopulariopsis koningii . Produção , liofilização , purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo Scopulariopsis koningii** . [s.l: s.n.].

- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. V.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 5, p. 317–322, 2009.
- GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12–30, jan. 2005.
- GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435–448, out. 1992.
- GRAY, J. A.; BEMILLER, J. N. Bread staling: Molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 1–21, 2003.
- HEGDE, S.; KAVITHA, S.; VARADARAJ, M. C.; MURALIKRISHNA, G. Food Chemistry Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105 q. v. 96, p. 14–19, 2006.
- HEUER, T.; KREMS, C.; MOON, K.; BROMBACH, C.; HOFFMANN, I. Food consumption of adults in Germany: results of the German National Nutrition Survey II based on diet history interviews. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 10, p. 1603–1614, 28 maio 2015.
- HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73–82, 2008.
- HÜBNER, F.; ARENDT, E. K. Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 853–861, 2013.
- IKRAM, S.; HUANG, L. Y.; ZHANG, H.; WANG, J.; YIN, M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 2017.
- JUNIOR LETTI, L. A.; DESTÉFANIS VÍTOLO, F. M.; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA, G.; KARP, S. G.; PEDRONI MEDEIROS, A. B.; FERREIRA DA COSTA, E. S.; BISSOQUI, L.; SOCCOL, C. R. **Solid-State Fermentation for the Production of Mushrooms**. [s.l.: s.n.].
- KANAUCHI, M.; WATANABE, S.; TSUKADA, T.; ATTA, K.; KAKUTA, T.; KOIZUMI, T. Purification and characteristics of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* G-2 strain. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. 458–463, 2008.
- KORNBRUST, B. A.; FORMAN, T.; MATVEEVA, I. **Applications of enzymes in breadmaking**. Second Edi ed. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.
- KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168–171, 2005.
- LAIRON, D.; ARNAULT, N.; BERTRAIS, S.; PLANELLS, R.; CLERO, E.;

- HERCBERG, S.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 6, p. 1185–1194, 2005.
- LAURIKAINEN, T.; HÄRKÖNEN, H.; AUTIO, K.; POUTANEN, K. Effects of enzymes in fibre-enriched baking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 239–249, 1998.
- LECLERCQ, C.; ARCELLA, D.; PICCINELLI, R.; SETTE, S.; DONNE, C. LE. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005 – 06 : main results in terms of food consumption. v. 12, n. 12, p. 2504–2532, 2009.
- LONG, L.; DING, D.; HAN, Z.; ZHAO, H.; LIN, Q.; DING, S. Thermotolerant hemicellulolytic and cellulolytic enzymes from *Eupenicillium parvum* 4-14 display high efficiency upon release of ferulic acid from wheat bran. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 422–434, 2016.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.
- MATEO ANSON, N.; AURA, A.; SELINHEIMO, E.; MATTILA, I.; POUTANEN, K.; VAN DEN BERG, R.; HAVENAAR, R.; BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Bioprocessing of Wheat Bran in Whole Wheat Bread Increases the Bioavailability of Phenolic Acids in Men and Exerts Antiinflammatory Effects ex Vivo. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 137–143, 2011.
- MATSUSHITA, K.; SANTIAGO, D. M.; NODA, T.; TSUBOI, K.; KAWAKAMI, S.; YAMAUCHI, H. The bread making qualities of bread dough supplemented with whole wheat flour and treated with enzymes. **Food Science and Technology Research**, v. 23, n. 3, p. 403–410, 2017.
- MENDIS, M.; SIMSEK, S. Arabinoxylans and human health. **Food Hydrocolloids**, v. 42, n. P2, p. 239–243, 2014.
- MOORE, J.; CHENG, Z.; SU, L.; YU, L. (LUCY). Effects of Solid-State Enzymatic Treatments on the Antioxidant Properties of Wheat Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 9032–9045, nov. 2006.
- MOREIRA, M. M.; MORAIS, S.; CARVALHO, D. O.; BARROS, A. A.; DELERUE-MATOS, C.; GUIDO, L. F. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 382–388, 2013.
- 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, maio 2014.
- NEETA, K.; ABHAY, S.; MALA, R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.
- NOCENTE, F.; TADDEI, F.; GALASSI, E.; GAZZA, L. Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential. **Lwt**, v. 114, n. April, p. 108421, 2019.

OUTEIRIÑO, D.; COSTA-TRIGO, I.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P.; PÉREZ GUERRA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M. Production of xylanases from brewery spent grain and subsequent application into the spent solid residue after treatment with renewable ionic liquids for the production of sugars-containing solutions. **Process Biochemistry**, n. June, p. 1–8, 2019.

PACKKIA-DOSS, P. P.; CHEVALLIER, S.; PARE, A.; LE-BAIL, A. Effect of supplementation of wheat bran on dough aeration and final bread volume. **Journal of Food Engineering**, v. 252, n. December 2018, p. 28–35, 2019.

PANAGIOTOU, G.; GRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1117–1124, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PATEL, S.; SHUKLA, S. Fermentation of Food Wastes for Generation of Nutraceuticals and Supplements. In: **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 707–734.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ISRAILIDES, C. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 3 SPEC. ISS., p. 216–219, 2007.

PINHEIRO, I. R.; SILVA, R. O. Reaproveitamento dos Resíduos Sólidos da Indústria Cacaueira. p. 95–99, 2017.

PROST, C.; POINOT, P.; RANNOU, C.; ARVISENET, G. **Bread aroma**. Second Edition. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. v. 13, p. 127–135, 2003.

SAHNOUN, M.; NAILI, B.; ELGHARBI, F.; KAMMOUN, R.; GABSI, K.; BEJAR, S. Effect of *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 α -amylase on rheological dough properties and bread quality. **Biologia (Poland)**, v. 68, n. 5, p. 808–815, 2013.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 167–187, 2013.

SILVA, S. **BIOACESSIBILIDADE E METABOLISMO COLÔNICO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PÃES ADICIONADOS DE INFUSÃO DE CAFÉ VERDE E BIOPROCESSADOS ENZIMATICAMENTE**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

SINGH NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues**. [s.l.: s.n.].

SOBRAL, G. G. DE; LEAL, W.; HENRIQUE, T.; CAROLINA, A. **EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA XILANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus aculeatus* URM 6603**, 2012.

SOCCOL, C. R.; SCOPEL, E.; ALBERTO, L.; LETTI, J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; PORTO, L.; VANDENBERGHE, D. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.

STEUDLER, S. **Solid State Fermentation**. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 169

SUNGURTAS, J.; SWANSTON, J. S.; DAVIES, H. V.; MCDOUGALL, G. J. Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 273–281, 2004.

TABKA, M. G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 897–902, 2006.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689–692, 1 ago. 1987.

TEBBEN, L.; SHEN, Y.; LI, Y. **Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. v. 81

VÁSQUEZ, Z. S.; DE CARVALHO NETO, D. P.; PEREIRA, G. V. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; DE OLIVEIRA, P. Z.; TIBURCIO, P. B.; ROGEZ, H. L. G.; GÓES NETO, A.; SOCCOL, C. R. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. **Waste Management**, v. 90, p. 72–83, 2019.

VITAGLIONE, P.; NAPOLITANO, A.; FOGLIANO, V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 451–463, 2008.

WANG, M.; VAN VLIET, T.; HAMER, R. J. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 3, p. 341–349, 2004.

XIE, C. YAN; GU, Z. XIN; YOU, X.; LIU, G.; TAN, Y.; ZHANG, H. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 125–128, 2010.

XU, H.; SUN, L.; ZHAO, D.; ZHANG, B.; SHI, Y.; WU, Y. Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 535, n. May 2007, p. 529–535, 2008.

YIN, Z.; WU, W.; SUN, C.; LEI, Z.; CHEN, H.; LIU, H.; CHEN, W.; MA, J.; MIN, T.; ZHANG, M.; WU, H. Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three *Aspergillus* species. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1120–1130, 2018.

ZORZAN, V. Aproveitamento de resíduos da indústria cervejeira na elaboração de cupcake. p. 0–43, 2017.

