



# **Otimização da composição nutricional do meio de cultivo para produção de mananases por *Aspergillus niger* 1234 com biomassa de café**

Leonardo João Bicalho de Moraes de Barros

## **Trabalho de Conclusão de Curso de Química Industrial**

Orientador:

Ricardo Sposina Sobral Teixeira, D.Sc., Instituto de Química/UFRJ

Dezembro de 2023

# **Otimização da produção de mananases por *Aspergillus niger* 1234 com biomassa de café**

***Leonardo João Bicalho de Moraes de Barros***

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado por:

---

*Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc. (EQ-UFRJ)*

---

*Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc (EQ-UFRJ)*

---

*Andréa Medeiros Salgado, D.Sc (EQ-UFRJ)*

Orientado por:

---

*Ricardo Sposina Sobral Teixeira, D.Sc. (IQ-UFRJ)*

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Dezembro de 2023

2770

Barros, Leonardo João Bicalho de Moraes de  
Otimização da produção de mananases por  
*Aspergillus niger* 1234 com biomassa de café /  
Leonardo João Bicalho de Moraes de Barros. -- Rio  
de Janeiro, 2023.  
57 f.

Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de  
Química, Bacharel em Química Industrial, 2023.

1. Torta de Café. 2. Enzimas. 3. Planejamento  
experimental. 4. Produção. 5. *coffea arabica*. I.  
Teixeira, Ricardo Sposina Sobral, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu eterno guia, me capacitando para que eu sempre seguisse a frente, me concedendo inúmeras oportunidades de desenvolvimento.

A minha mãe, Josiane Bicalho de Moraes por todo amor e incentivo que me forneceu desde a minha infância, sou muito grato por todos os conselhos e por você sempre me incentivar a seguir o caminho que eu escolhi.

A minha avó, Ana Maria Bicalho de Moraes por todo amor e suporte diário ao longo de toda minha jornada de desenvolvimento.

As minhas tias Wilma Lima de Barros e Nilma Lima de Barros, por todo investimento ao longo de toda minha trajetória educacional.

A Raquel Coldibelli Ribeiro, por todo apoio nos projetos de pesquisa e pela parceria diária que temos desde que nos conhecemos, que possamos continuar contando um com o outro, tanto nos momentos alegres quanto nos difíceis.

A minhas amigas Gabriela Ferreira e Luana Santos por estarem ao meu lado desde o primeiro semestre da graduação, nossos momentos de estudo e descontração tornaram a Escola de Química um ambiente mais agradável.

Ao meu orientador Ricardo Sposina Sobral Teixeira, que acreditou em meu potencial como pesquisador e me forneceu um ambiente saudável com muito apoio para que eu pudesse liderar meu projeto e desenvolver vários aspectos que trago para minha jornada profissional.

A toda equipe do Laboratório Bioetanol que me recebeu de braços abertos como aluno de Iniciação Científica e contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico.

A Escola de Química da UFRJ e todo seu corpo docente que me proporcionaram um ambiente cheio de oportunidades de aprendizado dentro e fora da sala de aula.

A família que a Bayer me concedeu, Alexandre, Anna, Bruna e Veronica; vocês preencheram meus dias no último ano de graduação, muito obrigado por todo o aprendizado e momentos alegres que tivemos.

Ao programa PIBIC/CNPq/UFRJ pela bolsa de Iniciação Científica e as bolsas de apoio: FINEP (01.09.0566.001421/08) e FAPERJ (E-26/010.002491/2019).

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

ROBERT COLLIER

## RESUMO

Barros, Leonardo João Bicalho de Moraes. **Otimização da produção de mananases por *Aspergillus niger* 1234 com biomassa de café.** Orientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As atividades agrícolas e a indústria de alimentos produzem resíduos agroindustriais de biomassas, que podem ser utilizadas como fonte nutricional para o cultivo de microrganismos. Resíduos agroindustriais como semente de açaí, palha de soja e torta de café são ricos em mananas podendo ser hidrolisadas em açúcares fermentáveis e até mesmo usadas para produzir enzimas, como mananases (EC 3.2.1.78). Essas enzimas são hidrolases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas internas da cadeia principal de mananas lineares, gerando mananoligossacarídeos de cadeia curta. Existem muitos microrganismos capazes de produzir mananases, entretanto, os fungos são vantajosos, pois secretam as enzimas, facilitando sua recuperação, e são adaptáveis a condições variáveis de temperatura, pH e umidade. O presente trabalho é baseado em uma prospecção científica sistemática visando à pesquisa acadêmica envolvendo a produção de mananases, seguida da utilização de metodologias estatísticas para otimizar sua produção experimental a partir do *Aspergillus niger* 1234 no cultivo em estado líquido utilizando biomassa de café como fonte de carbono. A prospecção científica foi realizada nas plataformas Web of science e Scopus e analisada segundo adaptação da metodologia sugerida por BAHRUTH et al., (2006). Restringiu-se aos principais parâmetros do processo de produção fúngica de mananases, como duração do cultivo, composição do meio, temperatura e pH. Os resultados foram analisados possibilitando a conformação de um meio de cultivo e o planejamento de experimentos de produção de mananases. Analisando os artigos encontrados, foi possível verificar que 90% deles utilizavam a biomassa vegetal como principal fonte de carbono e 67% realizavam o cultivo em estado sólido, com a análise desses dados foi possível formular a composição inicial do meio com torta de café, extrato de levedura, tampão fosfato de potássio,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , gerando uma atividade enzimática de mananases de 20 UI/mL no sétimo dia de cultivo. Após a realizado do planejamento estatístico experimental empregando sequencialmente o Plackett-Burman e o delineamento do composto central rotacional foi obtido o meio otimizado contendo apenas torta de café, extrato de levedura e tampão fosfato de potássio, fornecendo uma atividade de 23,1 UI/mL. A prospecção científica sistemática foi crucial na determinação dos parâmetros iniciais de cultivo e formulação do meio proposto, resultando em uma marcha analítica assertiva. A torta de café se revelou uma potencial biomassa para produção de mananases, apresentando atividade enzimática superior em 15,5% ao meio de Breccia et al. (1995) descrito por Nunes et al., (2019). As condições otimizadas proporcionaram um aumento de 42,9% na produtividade enzimática, destacando a transição do dia ótimo de cultivo do sétimo para o terceiro, reduzindo custos de controle de processo. Análises adicionais são necessárias para a formulação do extrato enzimático bruto, visando ampliar a atividade enzimática e estabilizar as enzimas para facilitar sua aplicação industrial.

## ABSTRACT

Agricultural activities and the food industry produce agro-industrial biomass waste, which can be used as a nutritional source for cultivating microorganisms. Agro-industrial residues such as açaí seeds, soybean straw and coffee cake are rich in mannans that can be hydrolyzed into fermentable sugars and even used to produce enzymes such as mannanases (EC 3.2.1.78). These enzymes are hydrolases that catalyze the hydrolysis of the internal glycosidic bonds of the main chain of linear mannans, generating short-chain mannan oligosaccharides. There are many microorganisms capable of producing mannanases, but fungi are advantageous because they secrete the enzymes, facilitating their recovery, and are adaptable to variable conditions of temperature, pH and humidity. This work is based on a systematic scientific prospectation aimed at academic research involving the production of mannanases, followed by the use of statistical methodologies to optimize their experimental production from *Aspergillus niger* 1234 in liquid state cultivation using coffee biomass as a carbon source. Scientific research was carried out on the Web of Science and Scopus platforms and analyzed according to an adaptation of the methodology suggested by BAHRUTH et al. (2006). It was restricted to the main parameters of the fungal mannanase production process, such as cultivation duration, medium composition, temperature and pH. The results were analyzed, enabling the development of a cultivation medium and the planning of mannanase production experiments. By analyzing the articles found, it was possible to see that 90% of them used plant biomass as the main carbon source and 67% used solid-state cultivation. By analyzing this data, it was possible to formulate the initial composition of the medium with coffee cake, yeast extract, potassium phosphate buffer,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , generating a mannanase enzyme activity of 20 UI/mL on the seventh day of cultivation. After carrying out the statistical experimental design using Plackett-Burman sequentially and the central composite rotational design, the optimized medium containing only coffee cake, yeast extract and potassium phosphate buffer was obtained, providing an activity of 23.1 IU/mL. Systematic scientific research was crucial in determining the initial cultivation parameters and formulation of the proposed medium, resulting in an assertive analytical approach. Coffee cake proved to be a potential biomass for the production of mannanases, showing an enzymatic activity 15.5% higher than the Breccia et al. (1995) medium described by Nunes et al. (2019). The optimized conditions provided a 42.9% increase in enzyme productivity, highlighting the transition of the optimal cultivation day from the seventh to the third, reducing process control costs. Additional analyses are required for the formulation of the crude enzyme extract, with the aim of amplifying the enzymatic activity and stabilizing the enzymes to facilitate their industrial application.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e enzimas necessárias para sua hidrólise. Estruturas típicas de (A) manana linear, (C) galactomanana ramificada, (D) glucomanana linear e (F) galactoglucomanana ramificada. A espinha dorsal da manana é hidrolisada pela  $\beta$ -mananase, enquanto a  $\alpha$ -galactosidase e acetilmananesterase liberam grupos galactose e acetil respectivamente. Os produtos gerados por  $\beta$ -mananase, (B) manose e (E) oligossacarídeos de glucomanose, são posteriormente hidrolisados pela  $\beta$ -manosidase e  $\beta$ -glucosidase para finalmente produzir os monossacarídeos manose, glicose e galactose. Adaptado (Van Zyl et al., 2010). ..... 16
- Figura 2:** Distribuição temporal dos artigos publicados, onde a linha verde corresponde a distribuição simples e a vermelha a distribuição acumulada. ..... 27
- Figura 3:** (A) apresenta os fungos utilizados nos trabalhos analisados; (B) apresenta a distribuição dos trabalhos pelos estados sólido e líquido de cultivo. ..... 29
- Figura 4:** (A) corresponde ao pH inicial do cultivo, (B) corresponde a temperatura do cultivo e (C) corresponde a duração do cultivo. ..... 30
- Figura 5:** Análise dos métodos de otimização empregados nos artigos, onde outros corresponde as metodologias Design Expert, Delineamento Plackett-Burman e Delineamento Composto Central. ..... 31
- Figura 6:** (A) metodologia empregada para dosagem da atividade enzimática; (B) o substrato utilizado para a dosagem da atividade enzimática; (C) a concentração do LBG. ..... 32
- Figura 7:** (A) pH da reação enzimática; (B) temperatura da reação enzimática em  $^{\circ}\text{C}$ ; (C) a duração da reação enzimática. ..... 33
- Figura 8:** Diagrama ilustrativo da cadeia principal de atividades do presente projeto de pesquisa. Onde a “Validação Experimental” segue a mesma marcha experimental representada em “Ensaios Preliminares”. ..... 35
- Figura 9:** (A) sistema de peneiras utilizado para o ajuste granulométrico da torta de café; (B) partículas -20 mesh; (C) partículas -80 mesh; (D) partículas +80 mesh. .... 36
- Figura 10:** Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio exploratório, a partir das alíquotas tiradas nos dias 3, 5 e 7 do cultivo. .... 37

<b>Figura 11:</b> Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio 2, a partir das alíquotas tiradas nos dias 3, 5 e 7 do cultivo, onde A, B e C correspondem as réplicas do meio de cultivo. ....	38
<b>Figura 12:</b> Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio 4, a partir das alíquotas tiradas ao longo dos 12 dias cultivo, onde A, B e C correspondem as réplicas do meio de cultivo. ....	40
<b>Figura 13:</b> Gráfico de Pareto dos efeitos para atividade enzimática de mananases; MS Residual = 3.06987. ....	42
<b>Figura 14:</b> Gráfico de Pareto dos efeitos para atividade enzimática de mananases no delineamento do composto central rotacional; MS Erro Puro 0,7968657. ....	45
<b>Figura 15:</b> Gráfico de resposta de superfície para produção de mananases do delineamento do composto central rotacional. ....	46
<b>Figura 16:</b> Curvas de contorno para produção de mananases do delineamento do composto central rotacional. ....	46
<b>Figura 17:</b> Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio de validação do meio otimizado, a partir das alíquotas tiradas ao longo dos 7 dias cultivo. ....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores codificados e descodificados dos fatores independentes do delineamento Plackett-Burman.....	22
<b>Tabela 2:</b> Intervalos e níveis dos fatores do delineamento do composto central rotacional (DCCR).....	23
<b>Tabela 3:</b> Exposição dos critérios de escolha do chaveamento inicial utilizado com a data da submissão do chaveando na base de dados, as palavras-chave utilizadas, a especificação da base de dados e o número de resultados obtido.....	24
<b>Tabela 4:</b> Chaveamentos empregados para a coleta de artigos da prospecção científica, expondo o número de resultados obtidos, os resultados repetidos, e o valor do universo amostral da análise macro.....	25
<b>Tabela 5:</b> Quantidade de artigos publicados pelos principais países publicadores, onde “Outros” corresponde a um total de 28 países que publicaram menos de 8 artigos cada. Fonte: AUTORAL, 2022.....	26
<b>Tabela 6:</b> Resultados da imposição dos fatores de inclusão e exclusão aos artigos coletados.....	28
<b>Tabela 7:</b> Meios de cultivo iniciais formulados a partir da prospecção científica realizada.....	34
<b>Tabela 8:</b> Meios de cultivo empregados no ensaio exploratório. * corresponde solvente empregado na preparação do meio de cultivo.....	36
<b>Tabela 9:</b> Composição do meio de cultivo adaptado de Breccia et al. (1995) por Nunes et al. (2019). Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2019.....	39
<b>Tabela 10:</b> Resultados do delineamento Plackett Burman para produção de mananases. As colunas VI1 - VI5 representam as variáveis de preenchimento da metodologia.....	41
<b>Tabela 11:</b> Efeitos estimados do delineamento Plackett-Burman para otimização da produção de mananases.....	42
<b>Tabela 12:</b> Resultados do delineamento do composto central rotacional para produção de mananases.....	44
<b>Tabela 13:</b> Efeitos estimados do delineamento do composto central rotacional para otimização da produção de mananases.....	44
<b>Tabela 14:</b> Comparação dos resultados experimentais do ensaio de validação com o resultado teórico da otimização do modelo completo.....	47

<b>Tabela 15:</b> Comparação dos resultados experimentais do ensaio de validação com o resultado teórico da otimização do modelo simplificado. ....	48
<b>Tabela 16:</b> Comparação nutricional entre o meio de cultivo inicialmente proposto e o meio de cultivo otimizado após a aplicação das metodologias estatísticas. ....	49
<b>Tabela 17:</b> Valores de atividade enzimática de mananases após a otimização do meio de cultivo dos artigos científicos coletados na prospecção científica que realizaram o cultivo em fase líquida, com diferentes biomassas. ....	50

## **LISTA DE EQUAÇÕES**

<b>Equação 1:</b> Cálculo para determinação da atividade enzimática de mananases.....	21
<b>Equação 2:</b> Modelo matemático completo expressando a atividade enzimática de mananases em UI/mL em função das variáveis torta de café ( $Z_1$ ) e extrato de levedura ( $Z_2$ ). .....	45
<b>Equação 3:</b> Modelo matemático simplificado expressando a atividade enzimática de mananases em UI/mL em função da variável torta de café ( $Z_1$ ).....	47

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	JUSTIFICATIVA .....	17
3	OBJETIVOS .....	18
3.1	OBJETIVO GERAL .....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
4	METODOLOGIA .....	19
4.1	PROSPECÇÃO CIENTÍFICA .....	19
4.2	CULTIVO DO FUNGO .....	19
4.3	BIOMASSA DE CAFÉ .....	20
4.3.1	Origem do grão de café verde .....	20
4.3.2	Torta de café verde .....	20
4.3.3	Moagem da biomassa .....	20
4.3.4	Ajuste granulométrico do café .....	20
4.3.5	Extrato da torta de café .....	20
4.4	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA .....	21
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	21
4.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO .....	22
4.6.1	Delineamento Plackett-Burman (PB) .....	22
4.6.2	Delineamento do composto central rotacional (DCCR) .....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1	PROSPECÇÃO CIENTÍFICA .....	23
5.1.1	Coleta de artigos .....	23
5.1.2	Análise macro .....	25
5.1.3	Análise meso .....	27
5.1.4	Análise micro .....	31
5.2	DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	35
5.2.1	Ensaios preliminares .....	35
5.2.1.1	Influência da disposição da fonte de carbono .....	35
5.2.1.2	Influência do tempo de cultivo .....	39
5.2.2	Planejamento experimental estatístico .....	40
5.2.2.1	Delineamento Plackett Burman (PB) .....	41
5.2.2.2	Delineamento do composto central rotacional (DCCR) .....	43
6	CONCLUSÕES .....	50

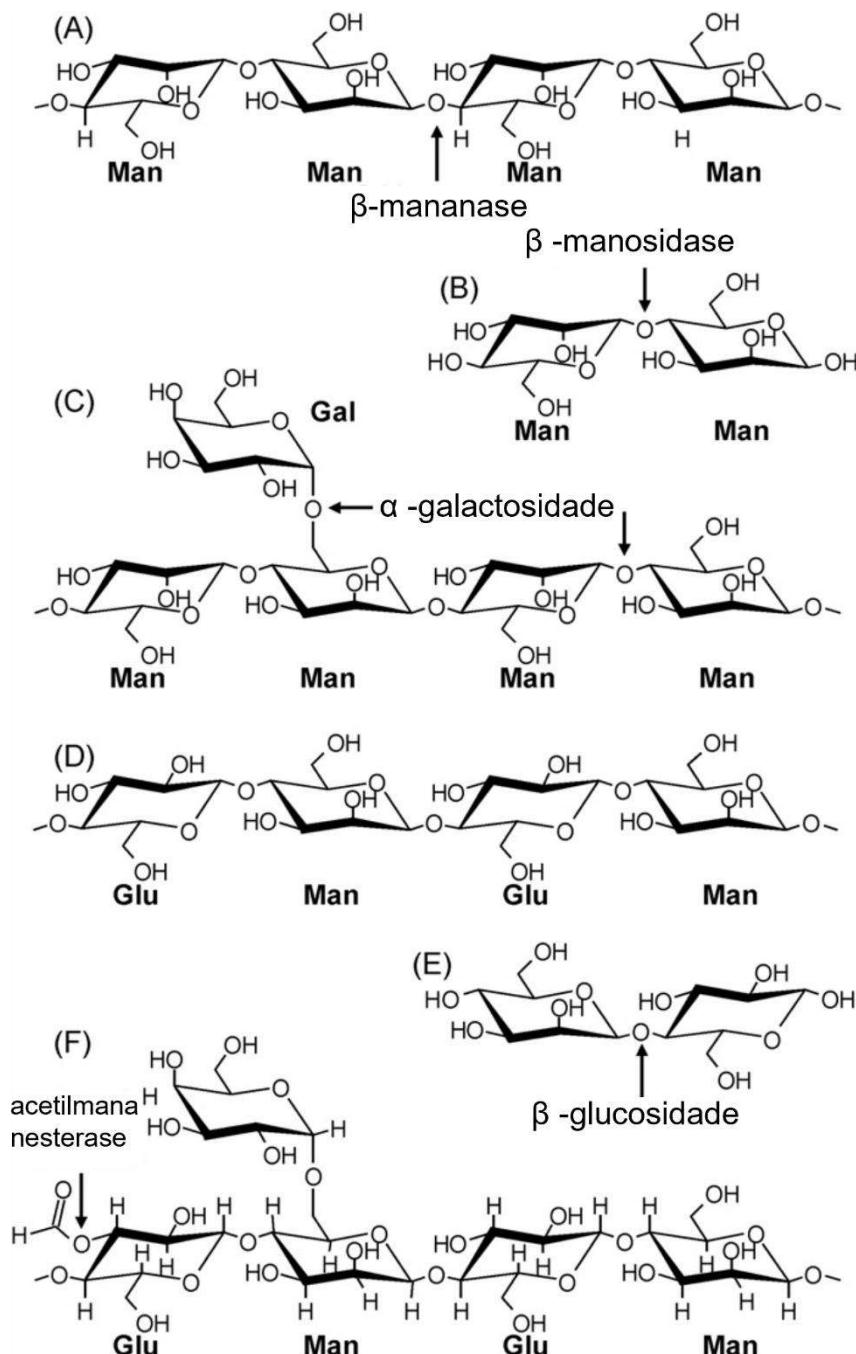
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o desenvolvimento humano causou impactos ambientais direta e indiretamente, seja através da exploração de recursos naturais, de seu processamento ou das atividades industriais (LUCIA et al., 2021). Com o aumento da população global associado a escassez de recursos é necessário obter produtos de fontes renováveis ao invés das convencionais fontes fósseis (ANASTAS; WARNER, 1998; CHRISTENSEN; OLHOFF, 2019; HÖHNE et al., 2019), devendo-se aproveitar ao máximo toda matéria natural, bem como os resíduos industriais.

Atividades agrícolas, processamento de alimentos pela indústria alimentícia e processamento de biomassas pelo setor de cosméticos, geram resíduos que são classificados como agroindustriais. A agroindústria tem sido fundamental para a economia brasileira. Por consequência, o país é um dos principais geradores de resíduos vegetais do mundo (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010; ANDREAUS et al., 2016). Esses resíduos apresentam, em sua maioria, substâncias orgânicas em sua composição, como carboidratos, lipídeos e proteínas que podem ter inúmeros destinos dentro do contexto da Bioeconomia.

Resíduos agroindustriais como a semente do açaí, casca de soja, torta de café e torta de palmiste vêm sendo subaproveitados ou descartados inapropriadamente causando desequilíbrio e danos ao meio ambiente (LIMA et al., 2019). Essas fontes de carbono, que são ricas no polissacarídeo conhecido como manana, podem ser processadas e seus polissacarídeos podem ser hidrolisados enzimaticamente em açúcares fermentescíveis que podem servir de plataforma para inúmeros bioproductos (MOREIRA & FILHO, 2008). Além disso, essas biomassas podem ser utilizadas diretamente como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos visando a produção de enzimas como as mananases (EC 3.2.1.78). Essas enzimas são hidrolases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas internas da cadeia principal de mananas lineares, gerando mananoligosacarídeos de cadeia curta (MOREIRA; FILHO, 2008). A atuação de algumas enzimas da família das mananases pode ser constatada na Figura 1.



**Figura 1:** Estruturas ilustrativas de diferentes formas de mananas e enzimas necessárias para sua hidrólise. Estruturas típicas de (A) manana linear, (C) galactomanana ramificada, (D) glucomanana linear e (F) galactoglucomanana ramificada. A espinha dorsal da manana é hidrolisada pela  $\beta$ -mananase, enquanto a  $\alpha$ -galactosidase e acetilmananesterase liberam grupos galactose e acetil respectivamente. Os produtos gerados por  $\beta$ -mananase, (B) manose e (E) oligossacarídeos de glucomanose, são posteriormente hidrolisados pela  $\beta$ -manosidase e  $\beta$ -glucosidase para finalmente produzir os monossacarídeos manose, glicose e galactose. Adaptado (Van Zyl et al., 2010).

Em termos gerais, as enzimas são proteínas que atuam como biocatalisadores, acelerando e promovendo inúmeras reações do metabolismo dos seres vivos. Elas podem ser exploradas comercialmente e sua aplicação industrial para a obtenção de

bioprodutos é de grande interesse, em especial devido às vantagens dessas em relação aos catalisadores químicos (CHAPMAN et al., 2018). Elas podem ser obtidas de animais e vegetais, porém, sua principal fonte de obtenção comercial são os micro-organismos (SILVA et al., 2018).

Existem muitos microrganismos capazes de produzir mananases, porém, os fungos filamentosos são vantajosos por secretarem as enzimas, facilitando sua recuperação (YATMAZ et al., 2020). Eles são adaptáveis a condições variáveis de temperatura, pH e umidade (TAKAHASHI et al., 2017), facilitando o controle das operações de processo tanto em âmbito experimental quanto industrial. Processos biotecnológicos são muito sensíveis. Por se fundamentarem na utilização de seres vivos, modificações de parâmetros simples como temperatura, pH e fonte de carbono disponível promovem alterações significativas no crescimento do micro-organismo e na produção de enzimas (OZTURK et al., 2010).

Devido a abundância de biomassas residuais ricas em manana, é essencial buscar rotas sustentáveis para a produção das mananases para que se possa encontrar alternativas de converter os resíduos agroindustriais brasileiros, anteriormente citados, em bioprodutos com maior valor agregado.

## 2 JUSTIFICATIVA

Dentre os resíduos agroindustriais ricos em manana, se destacam a casa de soja, a torta de café e a semente de açaí, devido ao volume de sua produção em território brasileiro. Todas essas biomassas apresentam potencial para a produção de mananases, entretanto, em função de uma parceria estabelecida entre o Laboratório Bioetanol e o Laboratório de Análises de Aromas (LAROMA) ambos do IQ/UFRJ, optou-se por realizar os experimentos empregando a biomassa de café.

O café tem grande disponibilidade no Brasil, sendo este país o maior produtor e exportador mundial (VOLSI et al., 2019). Sendo utilizada no presente projeto a espécie *C. arabica* (café arábica), uma das mais produzidas no mundo (SILVA et al., 2020). A maior parte dos grãos de café apresentam 50-63% do peso seco em polissacarídeos, a saber: mananas e galactomananas (REDG WELL, FISCHER., 2006) e 7-17% em lipídios (SILVA et al., 2020). O grão de café arábica possui em torno de 70% de triglicerídeos. Adicionalmente, o óleo dos grãos de café possui uma rica fração de insaponificáveis, que está sendo explorada pelo LAROMA.

Os grãos de café podem ser classificados de acordo com sua qualidade e, no Brasil, os grãos defeitos são comercializados em conjunto com os grãos íntegros (KALSCHNE et al., 2018; SILVA et al., 2022). Há uma movimentação voltada para o aumento da qualidade dos grãos de café voltados para o setor alimentício.

Em resposta houve a publicação da Portaria nº 570 de 9 de maio de 2022, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para evitar que grãos defeituosos sejam comercializados juntamente com os grãos íntegros no setor alimentício, com prazo de cumprimento até junho de 2024.

Consequentemente espera-se que haja um aumento significativo na geração de resíduos agroindustriais neste setor e como resposta a esta tendência do mercado brasileiro o presente trabalho visa construir um conceito de biorrefinaria com o desenvolvido pelo LAROMA, uma vez que essa integração possibilitará um aproveitamento total da biomassa, produzindo enzimas que conseguirão atuar diretamente sobre esses resíduos podendo gerar bioproductos de maior valor agregado.

A literatura é escassa no que diz respeito a produção das mananases. Em uma pesquisa realizada durante o trabalho, na base Scopus, em 2021 foram encontrados 1263, 627 e 83 artigos usando os chaveamentos “Cellulase AND Production AND Otimization”, “Xylanase AND Production AND Otimization” e “Mannanase AND Production AND Otimization”, respectivamente. Assim, a carência de informação sobre a produção de mananases já pode ser apontada como um gargalo tecnológico para a utilização das biomassas ricas em mananas em um contexto de Bioeconomia.

Esse baixo volume de artigos publicados a respeito do estudo da otimização da produção de mananases quando comparadas as celulases e xilanases expõe uma oportunidade significativa para explorar a obtenção das mananases empregando como fonte de carbono principal do meio de cultivo a biomassa de café.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Promover e otimizar a produção de mananases (EC 3.2.1.78) em cultivo submerso empregando o *Aspergillus niger* 1234 através de metodologias de planejamento experimental estatísticas ao utilizar como fonte de carbono principal a biomassa de café verde.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção científica para definição do meio e dos parâmetros iniciais de cultivo.
- Avaliar diferentes disposições do café como indutores da produção de mananases, dentre elas: grão de café verde moído e torta de café verde.
- Realizar a definição dos parâmetros significativos do cultivo pelo delineamento de Plackett-Burman (PB).
- Maximizar a produção de mananases através do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os componentes significativos obtidos pelo PB.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PROSPECÇÃO CIENTÍFICA

A prospecção científica sistemática foi realizada a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Bahruth et al. (2006). Para a coleta dos artigos foi utilizado majoritariamente as plataformas *Scopus* e *Web of Science*, aplicando protocolos de análise em 3 níveis aos artigos. O primeiro nível, chamado de análise macro, visou as distribuições geográfica e temporal dos artigos bem como seus respectivos objetivos. O segundo nível, a análise meso, se restringiu somente aos artigos que abordam a produção de  $\beta$ -mananases por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo este o fator de inclusão da análise bibliográfica. O terceiro nível, a análise micro, abrangeu todas as variáveis otimizadas envolvidas na produção enzimática bem como todos os parâmetros associados a determinação da atividade enzimática de mananases.

### 4.2 CULTIVO DO FUNGO

A cepa utilizada consistiu no *Aspergillus niger* 1234, originado da Coleção de Cultivo da Amazônia (CFAM) e mantida na coleção do Laboratório Bioetanol. Sua propagação ocorreu em placas de Petri contendo o meio *potato agar dextrose* (PDA Sigma-Aldrich) a 27°C por 7 dias em uma incubadora (Incucell 111 – MMM Group). Os esporos foram suspensos em solução salina (NaCl 0,9%) e ultra centrifugados a 9000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, os esporos decantados foram ressuspensos em solução de glicerol 20% e armazenados em frascos criogênicos a -18°C (TEIXEIRA et al., 2012).

#### 4.3 BIOMASSA DE CAFÉ

##### 4.3.1 Origem do grão de café verde

Os grãos de café arábica cru, utilizados neste trabalho, foram provenientes de um lote da safra 2018, oriundos de uma fazenda no estado do Rio de Janeiro. Os cafés foram do cultivar Catuaí Amarelo, classificados como bebida dura, obtidos pelos processos de colheita por derriça e pós-colheita por via seca, com secagem em terreiro.

##### 4.3.2 Torta de café verde

A torta de café consistiu na biomassa obtida após o processo de extração de lipídios do grão de café verde, através do esmagamento em prensa contínua de parafuso sem fim tipo expeller, marca IBG Monforts, modelo CA59O. Utilizou-se as condições de pré-aquecimento desligado, tamanho de partícula de 1 mm, diâmetro de saída da matriz da prensa de 5 mm e velocidade do parafuso 18 rpm (SILVA et al., 2023).

##### 4.3.3 Moagem da biomassa

Tanto os grãos de café quanto a torta foram moídos em um moinho de facas (Retsch SM 300) equipado com uma malha de 18 mesh (1 mm de diâmetro) conforme descrito por Hames (2008), antes da sua utilização nos meios de cultivo.

##### 4.3.4 Ajuste granulométrico do café

Uma fração da torta de café que foi submetida ao moinho de facas, passou por etapa de ajuste granulométrico em um sistema de peneiramento (Analysette 3 spartan - Fritsch), com peneiras de 80 e 20 mesh, amplitude de 2,0 mm e duração de 15 minutos.

##### 4.3.5 Extrato da torta de café

O extrato foi preparado a partir da concentração de 30g/L da torta de café verde moída em meio aquoso sob agitação constante de 300 RPM a 80°C por 2h, seguido de filtração. A fase líquida foi utilizada como fonte nutricional do meio de cultivo.

#### 4.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

O cultivo submerso ocorreu em frascos tipo Erlenmeyer utilizando rolhas de algodão apolar. Os frascos foram acondicionados em uma incubadora tipo *shaker* (Innova 44R - New Brunswick) ajustada em 200 RPM, 30°C e o tempo de cultivo variou de acordo com objetivo do ensaio. O cultivo utilizou pré-inóculo que foi submetido as condições anteriormente citadas por 48h, apresentando um volume de 10% do meio do cultivo, além disso, ele foi inoculado com 1% do seu volume com a solução estoque de esporos.

A composição do meio de cultivo é abordada no tópico 4.6 uma vez que a composição nutricional é o parâmetro de estudo da otimização estatística.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi empregada a metodologia do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para quantificação de açúcares redutores, adaptada de Miller (1959). O substrato utilizado consistiu no *locust bean gum* (Sigma-Aldrich) preparado a uma concentração de 0,5% em tampão citrato de sódio 50 mM com pH de 4,8 (STALBRAND et al., 1993). O sistema reacional consistiu no extrato enzimático, diluído em tampão, com volume de 0,25 mL adicionado de 0,25 mL de substrato; a reação ocorreu por 10 minutos a temperatura de 50°C. Decorrido o tempo foi introduzido 0,50 mL de DNS e o sistema foi aquecido a 100°C por 5 minutos. Após, 6,5 mL de água destilada foram adicionados e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu). Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de manose através de curvas analíticas específicas (TEIXEIRA et al., 2012). Uma unidade de atividade enzimática (UI) é descrita como a quantidade de enzima capaz de liberar a quantidade de 1 µM de D-manose por minuto a 50°C. A equação para sua determinação pode ser contemplada abaixo.

**Equação 1:** Cálculo para determinação da atividade enzimática de mananases.

$$\text{Atividade Enzimática (UI/mL)} = \frac{X \cdot R \cdot D}{t}$$

Onde: “X” corresponde a concentração de manose determinada a partir da curva analítica; D corresponde ao fator de diluição; t ao tempo de reação enzimática

em minutos; e R corresponde a razão entre a soma do volume de enzima com o volume de substrato sobre o volume de enzima.

#### 4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO

Visando realizar a otimização da produção enzimática de mananases, foram utilizadas metodologias de planejamento experimental estatístico visando modificar a composição nutricional do meio de cultivo para obter o maior valor possível de atividade enzimática em um menor tempo de processo.

##### 4.6.1 Delineamento Plackett-Burman (PB)

O PB avaliou a significância de seis fatores independentes, nos níveis de -1 a 1, conforme exposto na Tabela 1. Todas as análises vinculadas ao tratamento de dados deste delineamento foram performadas no software Statistica 12.0 empregando um erro de 10%.

**Tabela 1:** Valores codificados e descodificados dos fatores independentes do delineamento Plackett-Burman.

Variável	Fator Independente (g/L)	Nível		
		-1	0	1
X <sub>1</sub>	Torta de Café	20	30	40
X <sub>2</sub>	Extrato de Levedura	2	4	6
X <sub>3</sub>	Tampão Fosfato pH 5,5	0,25	0,5	0,75
X <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0	0,05	0,1
X <sub>5</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0	0,5	1
X <sub>6</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0	1	2

##### 4.6.2 Delineamento do composto central rotacional (DCCR)

Somente os fatores significativos do PB foram encaminhados para o DCCR, sendo analisados nos níveis de -1,41 a 1,41, conforme exposto na Tabela 2. Todas as análises vinculadas ao tratamento de dados deste delineamento foram performadas no software Statistica 12.0 empregando um erro de 10%.

**Tabela 2:** Intervalos e níveis dos fatores do delineamento do composto central rotacional (DCCR).

Variável	Fator Independente (g/L)	Nível				
		-1.41	-1	0	1	1.41
Z <sub>1</sub>	Torta de Café	25	30,82	45	59,18	65
Z <sub>2</sub>	Extrato de Levedura	4	5,16	8	10,84	12

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PROSPECÇÃO CIENTÍFICA

#### 5.1.1 Coleta de artigos

O primeiro aspecto associado a busca de artigos científicos nas bases de dados consistiu na definição das palavras-chave de pesquisa, quanto mais genérico for o chaveamento empregado menor será a assertividade dos assuntos abordados pelos artigos que serão encontrados (BEARMAN et al., 2012). Portanto, para facilitar a análise de artigos de interesse é imprescindível elaborar um bom chaveamento com termos que estejam alinhados com a temática em estudo (BAHRUTH et al., 2006). A Tabela 3 apresenta o processo para a escolha do chaveamento inicial utilizado para a coleta de artigos.

**Tabela 3:** Exposição dos critérios de escolha do chaveamento inicial utilizado com a data da submissão do chaveando na base de dados, as palavras-chave utilizadas, a especificação da base de dados e o número de resultados obtido.

Data	Palavras-Chave	Base de Dados	Nº de Resultados
08/11/2020	Mannanase AND Production	Scopus	495
		Web of Science	484
08/11/2020	Mannanase AND Production AND Optimization	Scopus	74
		Web of Science	97
08/11/2020	Fungi AND Mannanase AND Production	Scopus	96
		Web of Science	82
08/11/2020	Fungi AND Mannanase AND Production AND Optimization	Scopus	16
		Web of Science	16
08/11/2020	Aspergillus AND Mannanase AND Production AND Optimization	Scopus	16
		Web of Science	26

O primeiro chaveamento utilizado foi consideravelmente amplo de modo que o retorno englobou um volume elevado de artigos, outros termos foram inseridos para tornar o chaveamento alinhado com o objetivo de coletar o maior número possível de artigos que abordassem a otimização da produção da mananase por fungos do gênero *Aspergillus*. Dessa forma, o chaveamento inicial empregado foi “*Aspergillus AND Mannanase AND Production AND Optimization*”. O montante de artigos coletados através do primeiro chaveamento foi satisfatório, entretanto, com a finalidade de encontrar novos artigos o termo “*Optimization*” foi trocado para “*Increase*”, essa estratégia se mostrou válida porque conseguiu ampliar o universo amostral real em cerca de 15%. A Tabela 4 apresenta tanto os chaveamentos quanto as bases de dados empregadas para coleta dos artigos.

**Tabela 4:** Chaveamentos empregados para a coleta de artigos da prospecção científica, expondo o número de resultados obtidos, os resultados repetidos, e o valor do universo amostral da análise macro.

Chaveamento	Base de dados	Nº resultados	Nº resultados repetidos
Aspergillus AND Mannanase AND Production AND Optimization	Scopus	14	0
	Web of Science	22	9
	Springer	137	2
Aspergillus AND Mannanase AND Production AND Increase	Scopus	14	6
	Web of Science	37	17
<b>TOTAL</b>		<b>224</b>	<b>34</b>

A coluna “Nº resultados repetidos” quantifica resultados repetidos, ou seja, artigos que já foram encontrados em outra base de dados e/ou com outro chaveamento. Desse modo, o universo amostral real para o nível de análise macro contemplou 190 artigos.

### 5.1.2 Análise macro

A análise macro consiste em um tratamento de dados superficial, visando compreender um pouco das características do universo amostral em estudo, podendo por exemplo, tangar aspectos de distribuição e temporal e geográfica dos artigos coletados (BAHRUTH et al., 2006). Na grande maioria das vezes, o desenvolvimento científico está associado as principais necessidades da sociedade, buscando sempre desenvolver estratégias e tecnologias para melhorar a qualidade de vida das pessoas direta ou indiretamente (GRUNWALD, 2004).

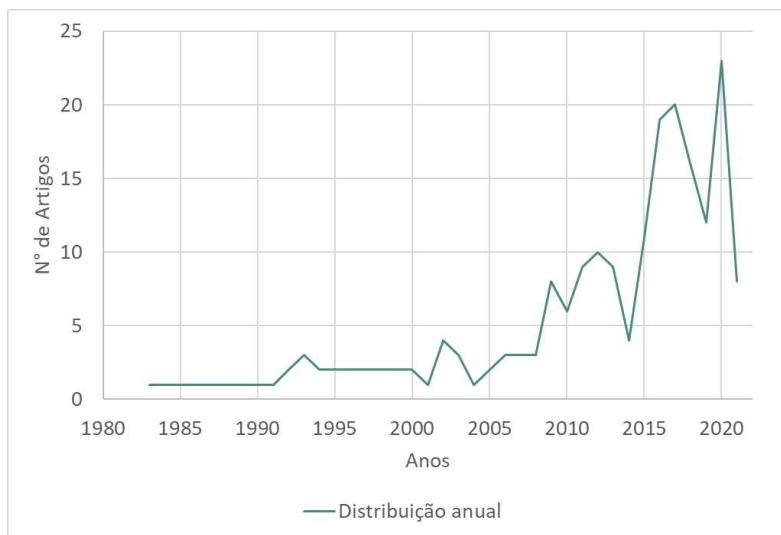
A localização geográfica dos trabalhos foi determinada de acordo com a instituição associada ao autor principal do artigo publicado, sendo encontrado publicações em 36 países, conforme Tabela 5.

**Tabela 5:** Quantidade de artigos publicados pelos principais países publicadores, onde “Outros” corresponde a um total de 28 países que publicaram menos de 8 artigos cada. Fonte: AUTORAL, 2022.

País	Nº artigos
China	42
Índia	33
Turquia	14
Brasil	12
Malásia	11
África do Sul	8
EUA	8
Tailândia	8
Outros	54

Os 5 países que mais publicaram apresentam um aspecto em comum: a participação significativa do setor agrícola em suas respectivas economias (FAO, 2022; EUROSTAT, 2022). Este setor costuma produzir resíduos que não podem ser direcionados para alimentação humana, entretanto, essas biomassas vegetais apresentam um valor nutricional significativo que, em alguns casos, pode ser aproveitado para alimentação animal (ACEVEDO et al., 2020). Em contrapartida, os principais artigos buscavam estratégias para empregar esses resíduos como fonte de carbono principal do meio de cultivo para a produção de enzimas, que são bioproductos com maior valor agregado (YILMAZER et al., 2020; KOTE et al., 2008; ABDESHAHIAN et al., 2009; OZTURK et al., 2010; RASHID et al., 2011; RASHID et al., 2012; Yin et al., 2012; YIN et al., 2013; SORNLAKE et al., 2013; CHEN et al., 2013; SONI et al., 2015; SONI et al., 2016; YATMAZ et al., 2016; CHUGH et al., 2016; GERMEC et al., 2017; JANA et al., 2018; KARAHALIL et al., 2019; KARAHALIL et al., 2019; FAVARO et al., 2020).

Com relação aos aspectos temporais, a análise mostrou que desde o ano de 1983 a temática vem sendo estudada, entretanto, com um baixo volume de publicações. Houve um aumento significativo no ano de 2005 e uma constância relativa no volume de publicações a partir de 2015. A Figura 2 apresenta a distribuição temporal dos artigos publicados.



**Figura 2:** Distribuição temporal dos artigos publicados, onde a linha verde corresponde a distribuição simples e a vermelha a distribuição acumulada.

É possível constatar uma queda aparente das publicações no ano de 2021, fato este que pode ser reflexo de toda a contextualização mundial da pandemia do vírus Covid-19 (HARPER et al., 2020), visto que muitos trabalhos experimentais tiveram que ser interrompidos por questões de biossegurança. A projeção é que nos próximos anos um volume maior artigos sejam publicados nessa área.

### 5.1.3 Análise meso

Antes de se dar início as análises, se faz necessário realizar uma triagem para evidenciar os artigos pertinentes ao estudo. Para tal, são definidos fatores de inclusão e exclusão para tornar a análise extremamente alinhada com o propósito da prospecção científica (BAHRUTH et al., 2006). Optou-se por incluir todo artigo que abordasse a produção de mananases por fungos do gênero *Aspergillus* e excluir todo artigo que abordasse a produção de outras enzimas e/ou se baseassem em técnicas de modificação genética e/ou utilizassem microrganismos que não são fungos do gênero *Aspergillus*. Os resultados desta ação podem ser contemplados através da Tabela 6.

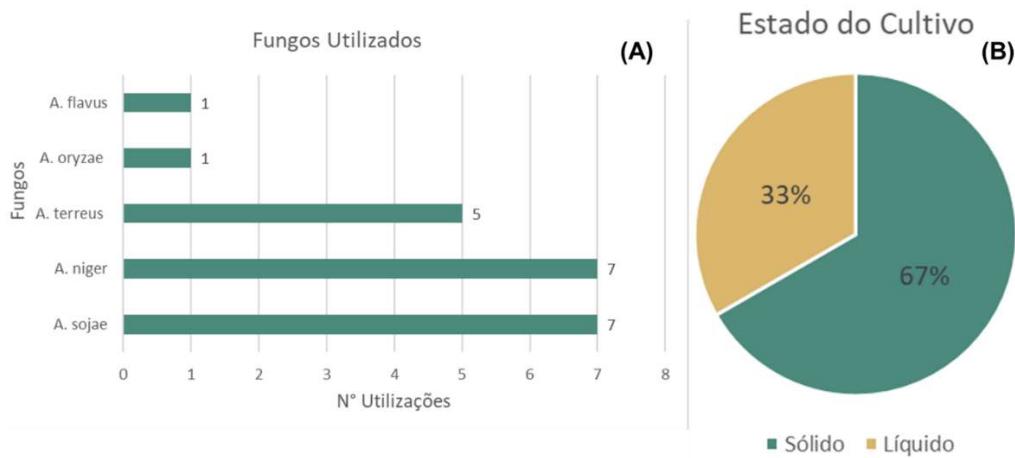
**Tabela 6:** Resultados da imposição dos fatores de inclusão e exclusão aos artigos coletados.

<b>Seleção de artigos para Análise Meso</b>	
Total	190
Excluir	167
Incluir	21

Mesmo utilizando chaveamentos complexos, com termos extremamente alinhados com a pesquisa bibliográfica e empregando fatores de inclusão e exclusão demasiadamente restritivos, ainda foi possível incluir um total de 21 artigos para as análises subsequentes, promovendo uma redução de 89% no universo amostral.

Este nível de análise almeja mapear alguns parâmetros como o estado do cultivo, as cepas utilizadas para produção enzimática, as condições de cultivo (pH, temperatura, agitação e duração) e o método de otimização utilizado nos trabalhos.

Como resultado, as cepas mais empregadas foram o *Aspergillus niger* (ABDESHAHIAN et al., 2009; MOHAMAD et al., 2011; YIN et al., 2012; YIN et al., 2013; SORNLAKE et al., 2013; CHUGH et al., 2016; FAVARO et al., 2020) e o *Aspergillus sojae* (OZTURK et al., 2010; YATMAZ et al, 2016; GERMEC et al., 2017; KARAHALIL et al ,2019; KARAHALIL et al, 2019; YILMAZER et al., 2020; YATMAZ et al., 2020), sendo ambos empregados 7 vezes. O estado de cultivo majoritário dos trabalhos foi o sólido, representando 67% do universo amostral. Os resultados podem ser contemplados na Figura 3.

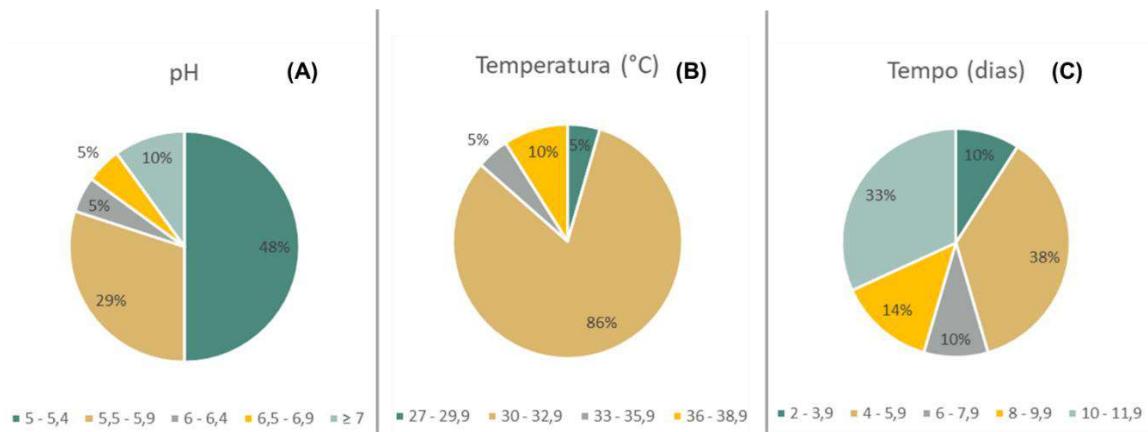


**Figura 3:** (A) apresenta os fungos utilizados nos trabalhos analisados; (B) apresenta a distribuição dos trabalhos pelos estados sólido e líquido de cultivo.

A preferência na utilização de um cultivo em estado sólido com cepa de fungos filamentosos é esperada porque esses organismos crescem naturalmente no solo e em vegetações, secretando suas enzimas para adquirir os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (QUIROZ et al., 2014). A maioria dos pesquisadores preferiu aproveitar deste aspecto natural, além disso, ainda é possível obter uma maior concentração da enzima ao final do processo (JANA et al., 2018).

Em contrapartida, os cultivos em fase líquida são vantajosos em parâmetros associados ao controle de processo e para trabalhar em grande escala (YILMAZER et al., 2020) uma vez que administrar grandes volumes de líquido é mais simples do que toneladas de sólidos e não é necessária uma etapa para promover a recuperação das enzimas, uma vez que os fungos filamentos secretam suas enzimas, estando dispersas na fase líquida do sistema (KARAHALIL et al., 2019).

Os principais parâmetros de processo (pH, temperatura e duração do cultivo) foram analisados conforme exposto pela Figura 4.



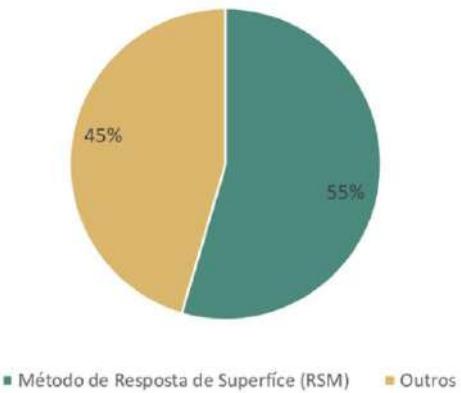
**Figura 4:** (A) corresponde ao pH inicial do cultivo, (B) corresponde a temperatura do cultivo e (C) corresponde a duração do cultivo.

O pH foi consideravelmente variável, entretanto, é possível notar que 90% dos trabalhos ajustaram esse parâmetro na faixa levemente ácida, com uma tendência notável de 48% na faixa de 5 a 5,4. Essa faixa de trabalho cria uma barreira para contaminação do meio por microrganismos oportunistas já que nem todos os organismos se desenvolvem bem neste nível de acidez (SADIQ et al., 2017; WHEELER et al., 1991; HOLMQUIST et al., 1983).

A temperatura de trabalho também apresentou variações, porém com uma concentração de 86% na faixa de 30 – 32,9°C, o que está de acordo com a temperatura ótima de trabalho para fungos do gênero *Aspergillus* (HOLMQUIST et al., 1983). Já a duração do cultivo, por sua vez, foi variada, tendo tendências nas faixas de 4 – 5,9 e 10 – 11,9 dias; essa variação é esperada uma vez que a duração do cultivo costuma estar associada ao pico de atividade enzimática, ou seja, no dia em que a atividade enzimática atinge seu valor máximo, o cultivo é interrompido para a recuperação das enzimas e esse tempo varia de acordo com a composição do meio de cultivo e as características biológicas da cepa empregada.

O último fator estudado nesse nível de análise foi com relação aos métodos utilizados pelos pesquisadores para promover a otimização da produção enzimática. Basicamente existem dois caminhos para realizar a otimização de processos: o primeiro consiste na metodologia clássica baseada na tentativa e erro, onde parâmetros são modificados aleatoriamente e o impacto causado por essa alteração é verificado no foco da otimização, esse processo é realizado inúmeras vezes até que se encontre uma lógica ou se promova uma melhoria significativa aleatoriamente; o segundo é baseado em análises estatísticas que relacionam os inúmeros parâmetros

do processo através de modelagens matemáticas e geram como resultado uma previsão com potencial significativo de sucesso (BIEGLER et al., 2002; RAISSI et al., 2009). A Figura 5 apresenta o resultado da análise deste último fator.



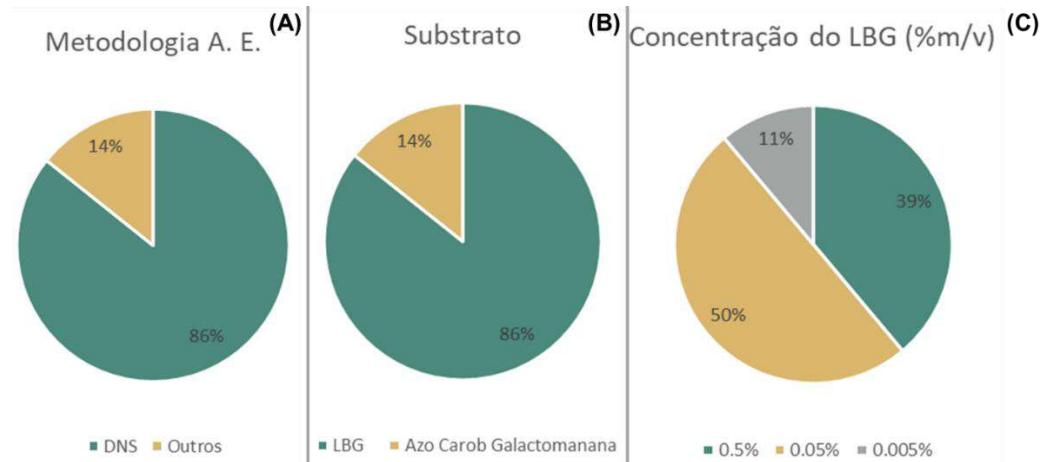
**Figura 5:** Análise dos métodos de otimização empregados nos artigos, onde outros corresponde as metodologias Design Expert, Delineamento Plackett-Burman e Delineamento Composto Central.

Todos os estudos utilizaram ferramentas estatísticas, deixando de lado o método clássico anteriormente citado. É possível notar que o teste estatístico mais utilizado foi o de resposta de superfície, em comparação as demais testes utilizados, como o Plackett Burman e análise monotética.

As análises estatísticas além de promoverem uma maior assertividade dos resultados também são interessantes porque diminuem a quantidade de ensaios desnecessários, poupando recursos e diminuindo a duração dessa etapa da pesquisa (HAN et al., 2012). Todos os artigos apurados conseguiram promover a otimização da produção enzimática ao aplicar essas ferramentas.

#### 5.1.4 Análise micro

Esse é o último nível de análise da metodologia de prospecção empregada, apurando todos os fatores associados a dosagem da atividade enzimática, as condições otimizadas e as metodologias de inóculo e pré-inóculo utilizadas. A Figura 6 apresenta os principais aspectos associados a metodologia da dosagem da atividade enzimática.



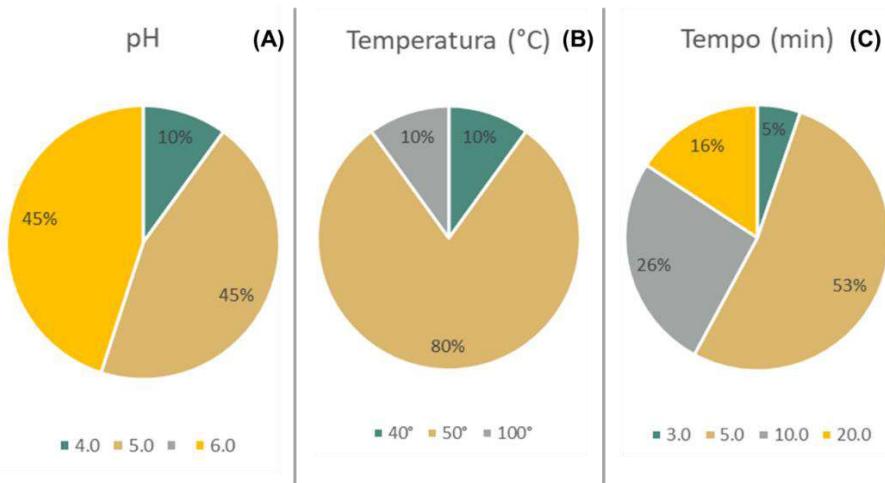
**Figura 6:** (A) metodologia empregada para dosagem da atividade enzimática; (B) o substrato utilizado para a dosagem da atividade enzimática; (C) a concentração do LBG.

Houve uma tendência majoritária de 86% a respeito da aplicação da metodologia do DNS para a quantificação da atividade enzimática. Esse método consiste em uma medição indireta para este fator onde, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reage com açúcares redutores, alterando sua coloração, respeitando a lei de Lambert-Beer (MILLER, 1959); os açúcares redutores são liberados através da interação da enzima com o substrato (MOREIRA; FILHO, 2008).

Partindo para este ponto, o substrato mais utilizado (86%) foi o *locust bean gum* (LBG), que consiste em uma galactomanana purificada comercial obtida do endosperma da semente da alfarrobeira (BARAK et al., 2014), este polissacarídeo é compatível com as mananases que por sua vez hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia liberando mananoligossacarídeos de cadeia mais curta no sistema (BIBLECH et al., 2011), açúcares estes que possuem um caráter redutor e consequentemente reagem com o DNS (MILLER, 1959).

Apesar do LBG ser o substrato mais empregado nos trabalhos, ainda houve uma variação considerável em sua concentração com tendências notáveis nas concentrações de 0,05% e 0,5% representando respectivamente 50 e 39% do universo amostral.

Em adição, é fundamental definir bem as condições da reação enzimática, ou seja, o pH, a temperatura e o tempo em que a enzima estará em contato com substrato para hidrolisá-lo. Esses fatores de processo podem ser observados na Figura 7.



**Figura 7:** (A) pH da reação enzimática; (B) temperatura da reação enzimática em °C; (C) a duração da reação enzimática.

O pH apresentou duas frequências equivalentes a 45% dos artigos, nos valores de 5,0 e 6,0; já a temperatura ficou concentrada em 50°C com um total de 80% dos artigos e a duração da reação foi consideravelmente variável, entretanto com uma concentração aparente de 53% em 5 minutos. Essa variação é esperada porque esses parâmetros devem ser ajustados de acordo com as particularidades da enzima (AMIT et al., 2018; BATISTTA et al., 2018). Apesar de todos os métodos serem direcionadas para mananases, foram empregadas cepas distintas bem como a composição do meio de cultivo, o que reflete nas propriedades da enzima produzida (NARASIMHA et al., 2016).

Um significativo aspecto a ser evidenciado é que devido a estas variações metodológicas os valores de atividade enzimática não podem ser comparados, o que dificulta a comparação de dados obtidos entre os trabalhos produzidos pelos pesquisadores ao redor do mundo. Com o aumento dessa necessidade, há uma projeção de que uma metodologia consolidada venha a ser desenvolvida nos próximos anos, acompanhada do aumento da quantidade de publicações na área.

Além destes fatores, também foi possível constatar que em todos os trabalhos, os fungos foram propagados em meio PDA (*Potato Agar Dextrose*) a 27°C por 5 – 7 dias e foram armazenados a 4°C. Nenhum trabalho utilizou pré-inóculo como etapa preparativa para o cultivo e somente Mohamad et al. (2011) e Yatmaz et al. (2020) utilizaram reagentes comerciais como fonte de carbono, sendo goma guar e glicose, respectivamente.

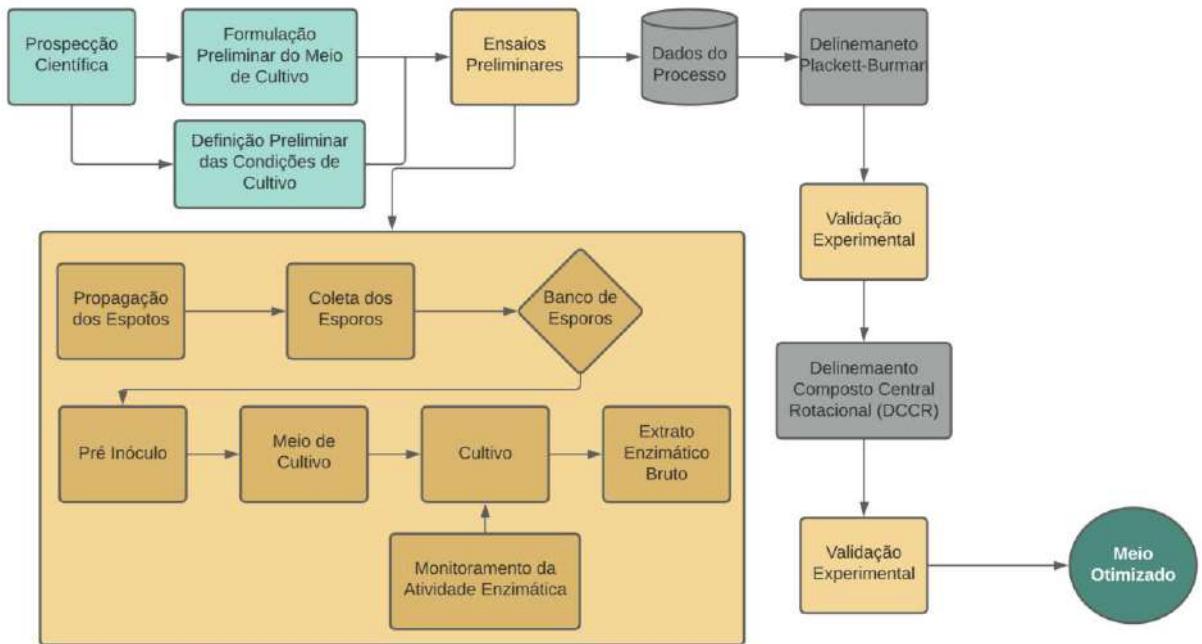
Associando todos os dados apurados ao longo dos 3 níveis de análise, foi possível propor a formulação de meios de cultivo iniciais para a produção de mananases, conforme exposto pela Tabela 7.

**Tabela 7:** Meios de cultivo iniciais formulados a partir da prospecção científica realizada.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	
	<b>Meio 1</b>	<b>Meio 2</b>
Biomassa	30	0
LBG	0	30
Extrato de Levedura	4	
Tampão Fosfato de Potássio (pH 5,5)	0,5	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	

O “Meio 1” foi o meio principal a ser desenvolvido ao longo das atividades experimentais, sendo empregado o café, uma biomassa rica em manana para atuar como fonte de carbono principal, enquanto o “Meio 2” foi empregado como controle, uma vez que o LBG é uma fonte de manana com elevado teor de pureza. Da mesma forma, foi possível definir os parâmetros iniciais de processo ajustados em 200 RPM, 30°C e uma duração de 7 dias.

Sintetizando os dados apurados ao longo de toda a prospecção, concebeu-se o planejamento experimental que foi empregado ao longo do desenvolvimento do presente trabalho. O fluxo experimental pode ser contemplado através da Figura 8.



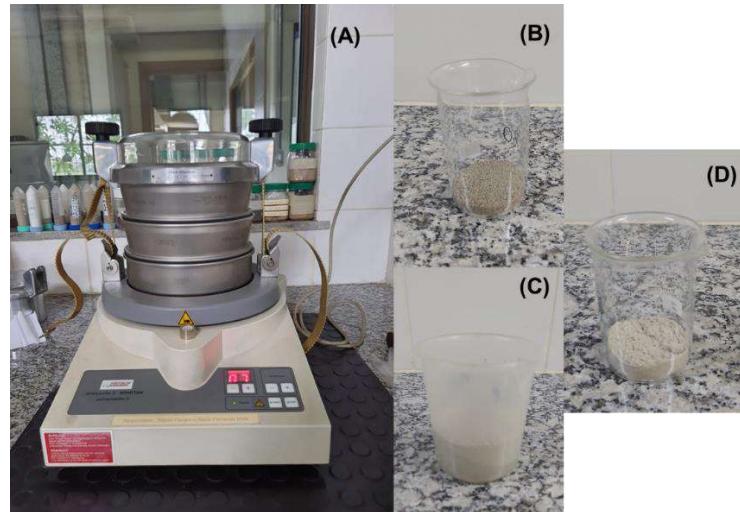
**Figura 8:** Diagrama ilustrativo da cadeia principal de atividades do presente projeto de pesquisa. Onde a “Validação Experimental” segue a mesma marcha experimental representada em “Ensaios Preliminares”.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.2.1 Ensaios preliminares

#### 5.2.1.1 Influência da disposição da fonte de carbono

O primeiro ensaio realizado possuía a finalidade de explorar as diferentes formas em que a biomassa de café poderia ser empregada no meio de cultivo. A Figura 9 apresenta o sistema de peneiramento utilizado na torta de café e o aspecto do material após o processo de separação.



**Figura 9:** (A) sistema de peneiras utilizado para o ajuste granulométrico da torta de café; (B) partículas -20 mesh; (C) partículas -80 mesh; (D) partículas +80 mesh.

A torta de café, suas duas primeiras frações granulométricas do processo de separação e o extrato da torta de café foram escolhidas para averiguar se a disponibilidade da fonte de carbono e a granulometria do material afetam a produção de mananases pela cepa de trabalho.

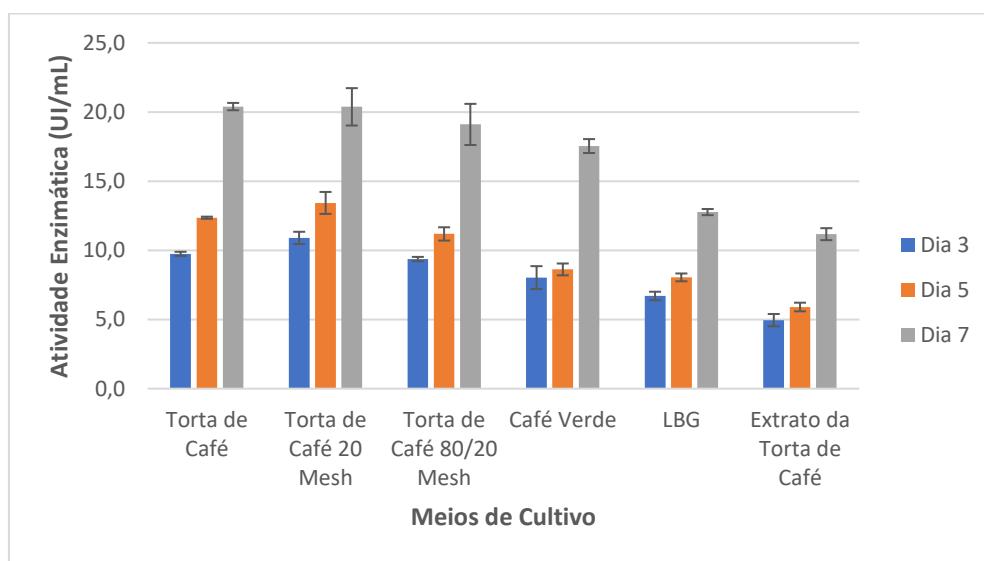
Também foi empregado o grão de café verde moído para verificar a influência dos lipídios na produção enzimática e o LBG como meio de controle. Com isso, este ensaio exploratório contou com um total de seis meios de cultivo distintos, conforme exposto pela Tabela 8.

**Tabela 8:** Meios de cultivo empregados no ensaio exploratório. \* corresponde solvente empregado na preparação do meio de cultivo.

Composto	Concentração (g/L)					
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6
Extrato da Torta de Café	30	--	--	--	--	--
Torta de Café	--	30	--	--	--	--
Torta de Café 80/20	--	--	30	--	--	--
Torta de Café 20	--	--	--	30	--	--
Grão verde de Café Moído	--	--	--	--	30	--
LBG	--	--	--	--	--	30
Extrato de Levedura				4		

Tampão Fosfato de Potássio (pH 5,5)	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1

Como resultado do cultivo de 7 dias em temperatura de 30°C e agitação de 200 RPM, foi possível construir a Figura 10, expondo o perfil da atividade enzimática.



**Figura 10:** Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio exploratório, a partir das alíquotas tiradas nos dias 3, 5 e 7 do cultivo.

Ficou evidente que o pico da atividade de mananases ocorreu no sétimo dia do cultivo para todos os sistemas, os meios com menor atividade foram respectivamente o extrato da torta de café (Meio 1) e o LBG (Meio 6) mostrando que o processo utilizado para extração de nutrientes da torta de café não foi eficiente e que o meio contendo apenas o LBG não tinha os nutrientes necessários para que a cepa produzisse mananases.

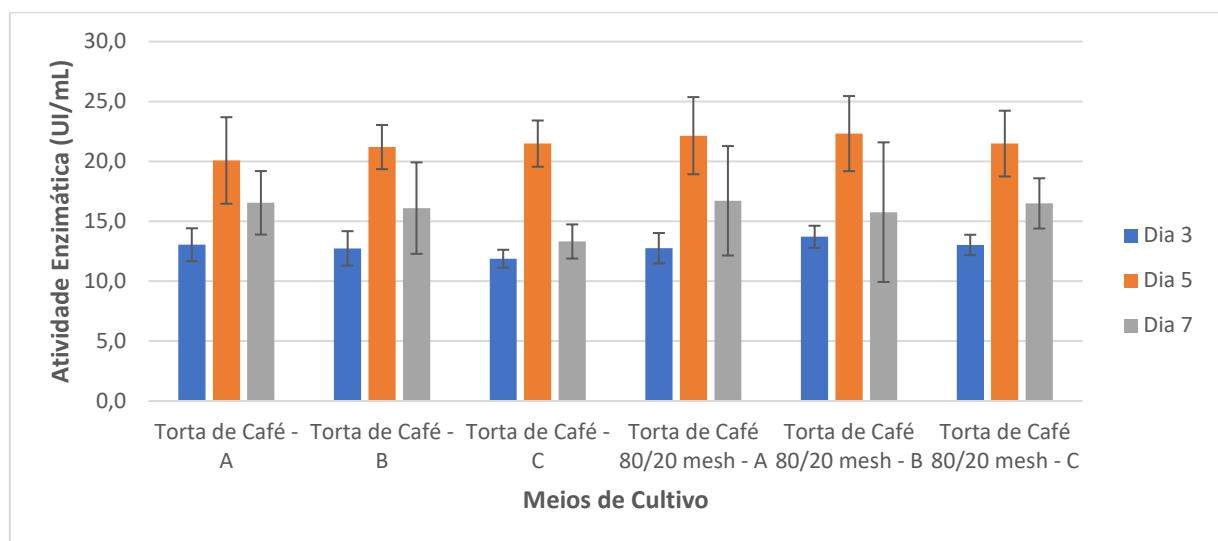
Os lipídeos presentes no café tiveram um efeito inibidor quando comparado ao valor de atividade enzimática dos sistemas com o café sem lipídeos (torta), fator este justificado pelo potencial microbicida do óleo de café verde (KHALID et al., 2020).

Os maiores valores atingidos foram para os meios com torta de café (Meio 2) e torta de café 20 Mesh (Meio 4) com respectivamente  $20,39 \pm 1,50$  e  $20,38 \pm 0,50$  UI/mL, que são estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de

Tukey, que também são com o resultado obtido pelo meio com torta de café 80/20 Mesh (Meio 3) com atividade de  $19,1 \pm 1,49$  UI/mL.

Devido a compatibilidade dos resultados obtidos, optou-se por seguir o desenvolvimento experimental com o meio 2, uma vez que a etapa de ajuste granulométrico apresentou uma perda de massa de 3%.

Para validar a influência das fontes de carbono na produção de mananases foi realizado um novo ensaio com os Meios 2 e 3 porque apresentaram respectivamente, o maior valor de atividade enzimática e por ter atingido um valor estatisticamente igual ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey com o Meio 2. Os resultados do experimento podem ser visualizados na Figura 11.



**Figura 11:** Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio 2, a partir das alíquotas tiradas nos dias 3, 5 e 7 do cultivo, onde A, B e C correspondem as réplicas do meio de cultivo.

Neste experimento, o pico da atividade enzimática para mananases ocorreu no dia 5 do cultivo, destoando do comportamento apresentado no ensaio exploratório. Esse aspecto precisa ser validado através de um novo cultivo com uma duração maior para melhor compreensão da variação da atividade de mananases ao longo do tempo.

É comum que processos biotecnológicos como este apresentem variação no tempo ótimo, porque tudo depende do desenvolvimento da cepa nas condições do cultivo (LEE et al., 2006). Portanto, se faz necessário estimar experimentalmente uma faixa de duração e o valor máximo de atividade que pode ser atingido.

Os valores de atividade de mananases obtidos foram estatisticamente iguais dentro do mesmo meio ao nível de 10% de significância pelo teste de Tukey, apesar

do meio contento torta de café 80/20 mesh ter apresentado uma atividade superior ao da torta de café.

#### 5.2.1.2 Influência do tempo de cultivo

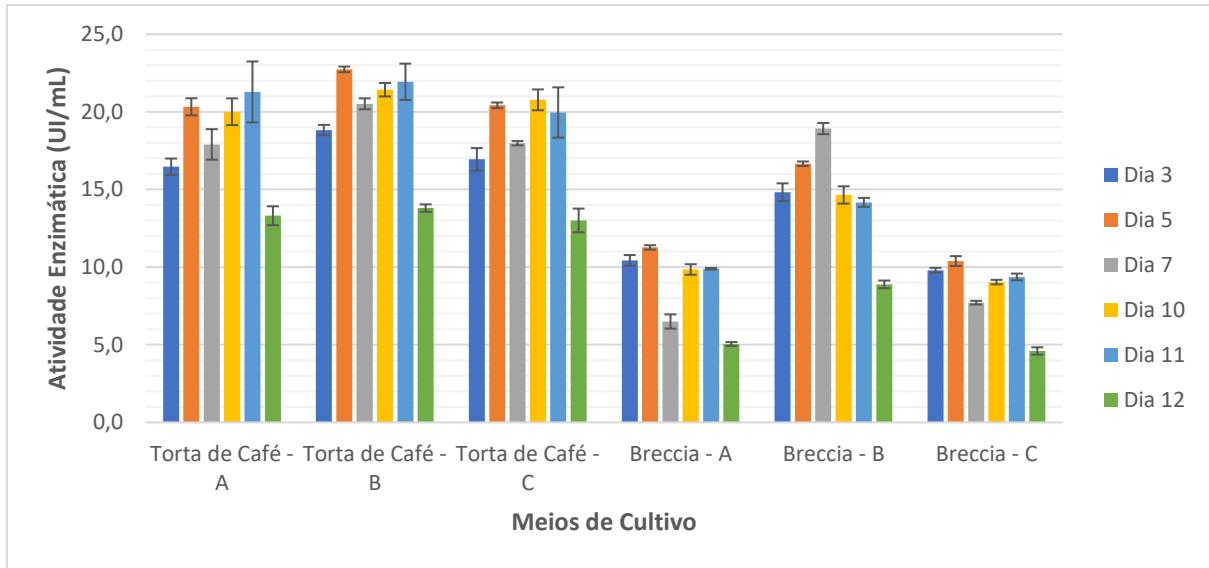
Uma vez que já foi realizada a determinação da melhor disposição da fonte de carbono e houve uma flutuação no dia de pico da atividade enzimática de mananases, se fez necessário realizar um novo ensaio com duração de cultivo maior para compreender a variação da atividade enzimática e determinar se os valores máximos encontrados nos experimentos 1 e 2 realmente são vereditos para o meio de cultivo proposto.

Neste novo ensaio, também foi realizado o cultivo com o meio adaptado de Breccia et al. (1995) por Nunes et al. (2019) para a produção de mananases, conforme exposto na Tabela 9.

**Tabela 9:** Composição do meio de cultivo adaptado de Breccia et al. (1995) por Nunes et al. (2019).  
Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2019.

Composto	Concentração (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,002
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,016
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,005
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0014
Extrato de levedura	10,0
<i>Locust bean gum (LBG)</i>	20,0

O meio adaptado possuiu uma maior quantidade de substâncias na formulação do meio de cultivo e vem sendo empregado em experimentos recentes desenvolvidos no Laboratório Bioetanol; em função disso, ele será empregado como um parâmetro comparativo para o meio autoral desenvolvido. A Figura 12, apresenta os resultados desse ensaio.



**Figura 12:** Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio 4, a partir das alíquotas tiradas ao longo dos 12 dias cultivo, onde A, B e C correspondem as réplicas do meio de cultivo.

Os perfis encontrados para o meio empregando torta de café são semelhantes e os resultados para cada um desses pontos são estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Neste ensaio, o pico da atividade enzimática de mananases é dado no quinto dia de cultivo e este será considerado como dia ótimo para produção da enzima em estudo.

Já as réplicas do meio Breccia não foram uniformes, experimentos recentes desenvolvidos no Laboratório Bioetanol vêm apresentando uma atividade enzimática média de 18 UI/mL no sétimo dia de cultivo, é possível que tenha ocorrido uma contaminação microbiológica nas réplicas A e C por terem apresentado um valor de atividade enzimática inferior ao esperado.

### 5.2.2 Planejamento experimental estatístico

Os dados coletados para o meio com torta de café ao longo dos ensaios preliminares foram suficientes para a realização do planejamento experimental estatístico.

A estratégia consistiu em utilizar o delineamento Plackett-Burmann de 12 ensaios para definir os compostos mais significativos para o meio de cultivo, uma vez que atualmente ele apresenta 6 fatores independentes. Posteriormente foi realizado o delineamento do composto central rotacional (DCCR) para atingir o meio otimizado final, voltado a produzir mananases.

### 5.2.2.1 Delineamento Plackett Burman (PB)

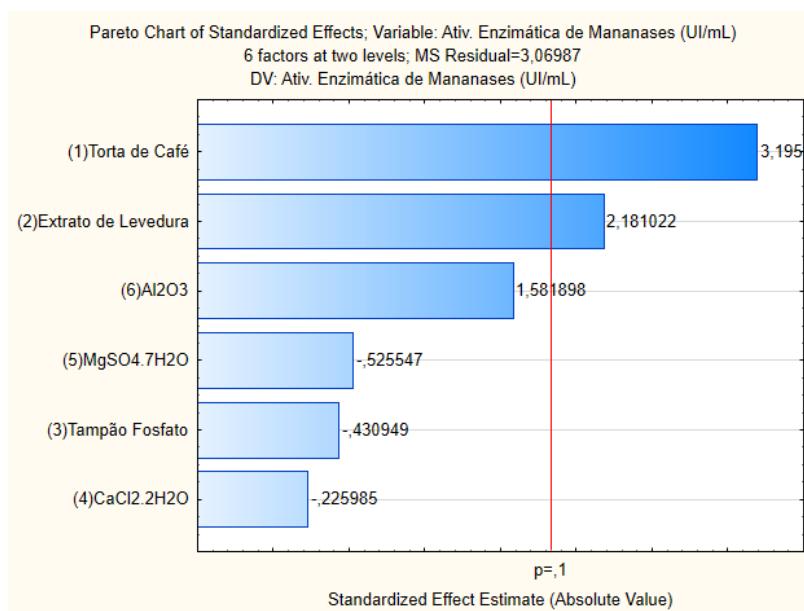
Para este delineamento foi considerado somente os compostos que constituem o meio de cultivo proposto, estando setadas as variáveis: pH, temperatura e agitação.

Neste ensaio foram utilizados quatro pontos centrais, totalizando 16 sistemas, para maior confiabilidade dos resultados. A Tabela 10 apresenta as características de cada um dos ensaios, bem como o resultado da variável dependente estudada.

**Tabela 10:** Resultados do delineamento Plackett Burman para produção de mananases. As colunas VI1 - VI5 representam as variáveis de preenchimento da metodologia.

ID	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	Atividade de mananases (UI/mL)					
							VI <sub>1</sub>	VI <sub>2</sub>	VI <sub>3</sub>	VI <sub>4</sub>	VI <sub>5</sub>	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	$21,9 \pm 1,6$
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	$21,5 \pm 0,2$
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	$19,4 \pm 0,6$
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	$20,4 \pm 0,4$
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	$21,7 \pm 0,8$
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	$20,8 \pm 0,9$
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	$20,0 \pm 0,8$
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	$13,6 \pm 0,8$
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	$19,5 \pm 1,3$
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	$20,8 \pm 0,4$
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	$20,6 \pm 0,3$
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	$14,5 \pm 0,2$
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$20,7 \pm 0,1$
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$20,6 \pm 0,1$
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$20,2 \pm 0,2$
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$20,5 \pm 0,1$

Ao submeter os resultados obtidos no software de análise, foi possível mesclar as informações relacionadas a cada um dos sistemas e gerar tanto o gráfico de Pareto (Figura 13) quanto a tabela de estimativas e efeitos (Tabela 11) que possibilitaram a interpretação estatística da significância de cada uma das variáveis estudadas.



**Figura 13:** Gráfico de Pareto dos efeitos para atividade enzimática de mananases; MS Residual = 3.06987.

**Tabela 11:** Efeitos estimados do delineamento Plackett-Burman para otimização da produção de mananases.

Fator	Efeito	Erro	t(9)	p - valor
Média	19,794	0,438	45,188	< 0,00005
Torta de Café	3,232	1,012	3,195	0,010913
Extrato de Levedura	2,206	1,012	2,181	0,057079
Tampão Fosfato pH 5,5	-0,436	1,012	-0,431	0,676643
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-0,229	1,012	-0,226	0,826261
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0,532	1,012	-0,526	0,611904
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,600	1,012	1,582	0,148132

Ao analisar os dados gerados, é possível notar que somente duas variáveis foram estatisticamente significativas: a torta de café (fonte de carbono) e o extrato de levedura (fonte de nitrogênio), apresentando os efeitos 3,232 e 2,0206, respectivamente.

Todo parâmetro que não apresentou como significativo no ensaio foi excluído da composição do meio de cultivo, uma vez que por estratégia foram utilizadas concentrações nulas no nível -1, entretanto, o tampão fosfato não pode seguir por esse caminho já que foi utilizado a concentração de 0,25 g/L. Além disso, o tampão é

extremamente importante para o meio de cultivo porque ele possibilita a manutenção do pH do meio.

Como os ensaios ocorrem em sistemas simples, empregando Erlenmeyer, o pH não é controlado pela adição de base e/ou ácido ao sistema, como ocorre em biorreatores. O tampão é o único composto que faz com que o pH seja mantido em um nível adequado enquanto ocorre o crescimento da cepa de trabalho.

Com base nesses dados, todos os fatores independentes estudados que apresentam um efeito negativo e estaticamente insignificativo, com exceção ao tampão fosfato, foram excluídos do meio uma vez que os níveis mais baixos utilizados são iguais a zero. Dentre os demais fatores estudados, somente as fontes de carbono e nitrogênio foram estudadas no DCCR.

O tampão fosfato por ter apresentado um efeito negativo, foi mantido na concentração mínima estudada, nível (-1), que correspondeu a concentração de 0,25 g/L expressa em fosfato.

#### *5.2.2.2 Delineamento do composto central rotacional (DCCR)*

Além dos 8 sistemas do fatorial completo, também foi realizado quatro pontos centrais, fazendo com que o estudo englobasse 12 sistemas. A Tabela 12, apresenta as características de cada um dos ensaios, bem como o resultado da variável dependente estudada.

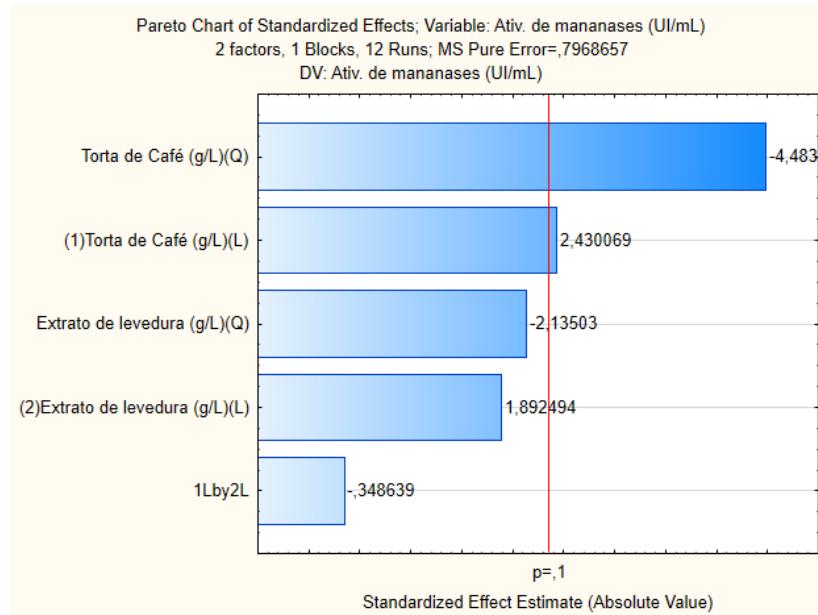
**Tabela 12:** Resultados do delineamento do composto central rotacional para produção de mananases.

<b>ID</b>	<b>Z<sub>1</sub></b>	<b>Z<sub>2</sub></b>	<b>Atividade de mananases (UI/mL)</b>
1	-1	-1	21,0 ± 0,3
2	1	-1	23,0 ± 0,4
3	-1	1	21,3 ± 0,2
4	1	1	22,6 ± 0,3
5	-1,41	0	21,1 ± 0,6
6	1,41	0	23,1 ± 0,4
7	0	-1,41	22,0 ± 0,6
8	0	1,41	25,4 ± 0,8
9	0	0	25,6 ± 0,5
10	0	0	25,3 ± 0,3
11	0	0	23,6 ± 0,3
12	0	0	24,5 ± 0,5

Ao submeter os resultados obtidos no software de análise, foi possível mesclar as informações relacionadas a cada um dos sistemas e gerar os gráficos de Pareto (Figura 14), a tabela de estimativas e efeitos (Tabela 13).

**Tabela 13:** Efeitos estimados do delineamento do composto central rotacional para otimização da produção de mananases.

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro</b>	<b>t(3)</b>	<b>p - valor</b>	<b>Coeficiente</b>
Média	24,777	0,446	55,513	0,000013	24,77747
Torta de Café (L)	1,536	0,632	2,430	0,093324	0,76809
Torta de Café (Q)	-3,177	0,709	-4,483	0,020694	-1,58866
Extrato de Levedura (L)	1,196	0,632	1,892	0,154773	0,59818
Extrato de Levedura (Q)	-1,513	0,709	-2,135	0,122427	-0,75652



**Figura 14:** Gráfico de Pareto dos efeitos para atividade enzimática de mananases no delineamento do composto central rotacional; MS Erro Puro 0,7968657.

Analizando-o é possível notar que tanto o parâmetro linear quanto o quadrático para a torta de café, apresentaram efeitos estaticamente significativos, porém, o parâmetro linear expressa um efeito positivo enquanto o quadrático um efeito negativo, isso indica que a concentração da fonte de carbono do ponto central tem que ser cuidadosamente aumentada, em concentração próxima a estudada.

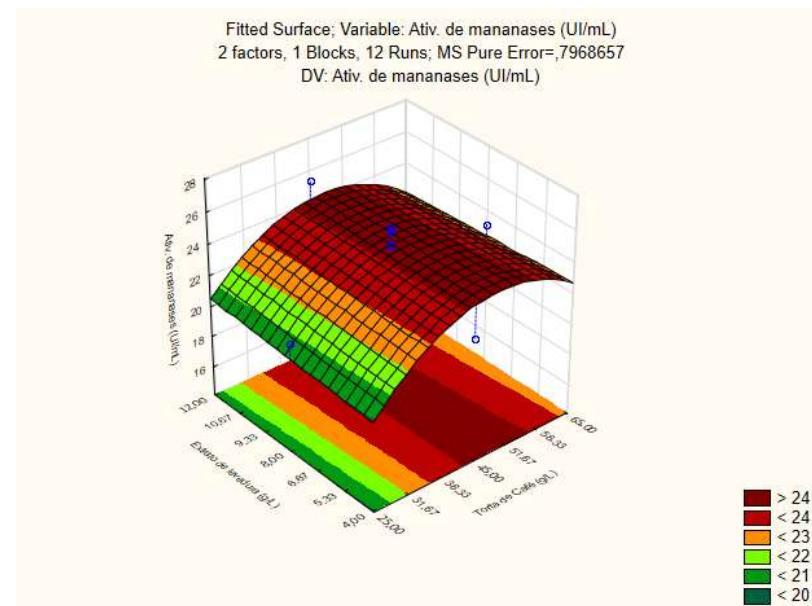
Tanto o parâmetro linear quanto o quadrático para o extrato de levedura, apresentaram efeitos estatisticamente insignificativos. Porém, o parâmetro linear expressa um efeito positivo enquanto o quadrático, um efeito negativo, isso indica que a concentração da fonte de nitrogênio do ponto central também pode ser cuidadosamente aumentada. Desse modo, o modelo matemático que expressa a atividade enzimática de mananases foi dado pela Equação 2.

**Equação 2:** Modelo matemático completo expressando a atividade enzimática de mananases em UI/mL em função das variáveis torta de café ( $Z_1$ ) e extrato de levedura ( $Z_2$ ).

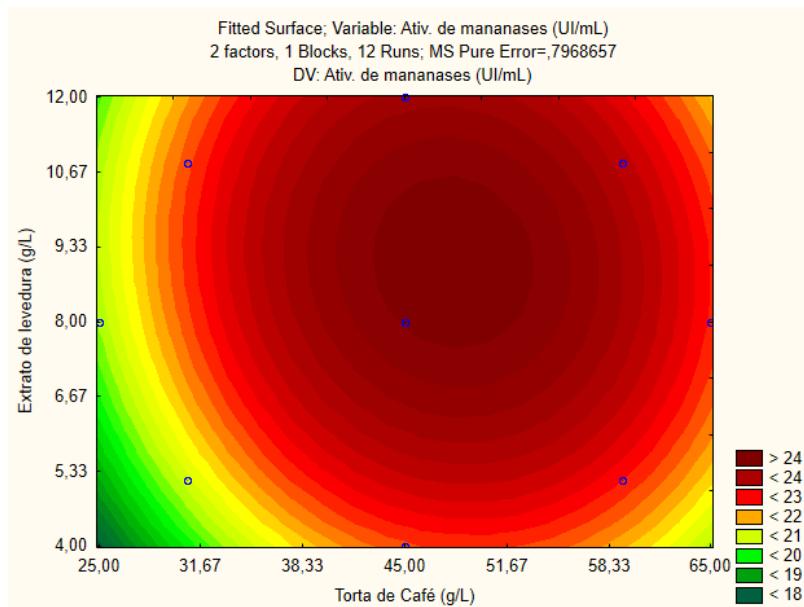
$$\text{Ativ. Enz. Man. (UI/mL)} = -1,58866Z_1^2 - 0,75652Z_2^2 + 0,76809Z_1 + 0,59818Z_2 + 24,77747$$

Utilizando o modelo criado, é possível determinar que o ponto crítico, ou seja, aquele que maximiza a produção da enzima de interesse é localizado em 0,223506 ( $Z_1$ ) e 0,372363 ( $Z_2$ ) que corresponde a concentração de torta de café de 45,32 g/L e

de 9,06 g/L de extrato de levedura. Esse valor apresenta uma estimativa de produção enzimática de 25,0 UI/mL. Além disso, o modelo possibilitou a criação dos gráficos de resposta de superfície e curva de contorno, que facilitam sua compreensão. Estes podem ser observados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.



**Figura 15:** Gráfico de resposta de superfície para produção de mananases do delineamento do composto central rotacional.



**Figura 16:** Curvas de contorno para produção de mananases do delineamento do composto central rotacional.

O resultado do ensaio de validação para o modelo completo pode ser visualizado na Tabela 14.

**Tabela 14:** Comparação dos resultados experimentais do ensaio de validação com o resultado teórico da otimização do modelo completo.

Meio de Cultivo	Valor Teórico	Valor Experimental	Desvio	Erro
Otimizado Completo	24,3	21,9 ± 0,1	2,43	9,95%

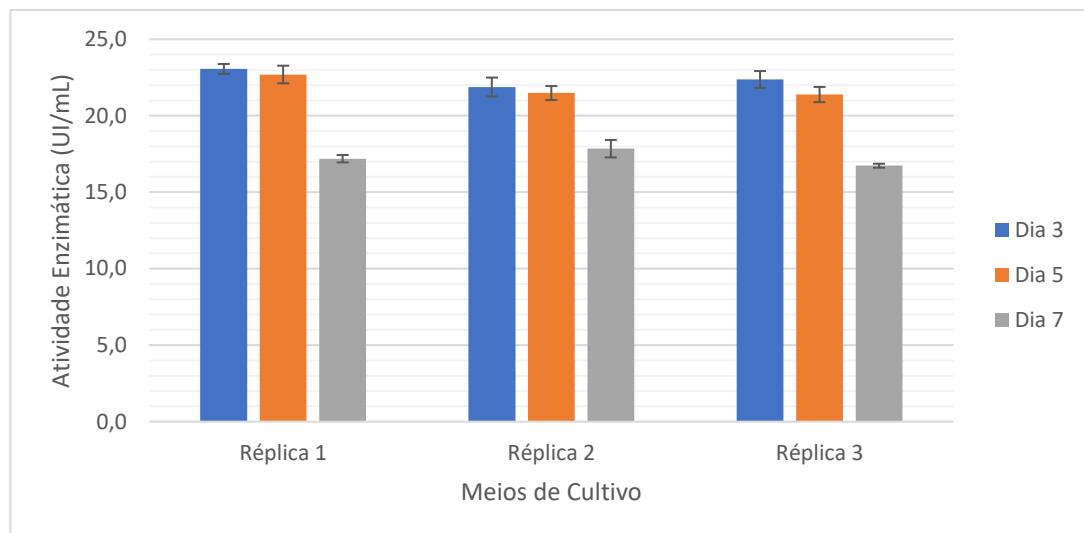
Apesar do modelo completo ter sido validado experimentalmente, o extrato de levedura foi estaticamente insignificativo, essa variável independente pode ser removida da análise. Desse modo, o modelo matemático que expressa a atividade enzimática de mananases é dado pela Equação 3, abaixo:

**Equação 3:** Modelo matemático simplificado expressando a atividade enzimática de mananases em UI/mL em função da variável torta de café (Z1).

$$\text{Ativ. Enz. de mananases (UI/mL)} = -1,43954Z_1^2 + 0,76809Z_1 + 24,27551$$

Que por sua vez, apresenta o ponto crítico de 0,266783 correspondendo a uma produção enzimática de 24,3 UI/mL. O modelo simplificado foi utilizado para validação do planejamento experimental estatístico. Nesta validação, a concentração do extrato levedura empregado foi de 4 g/L, que corresponde ao mínimo estudado, nível -1,41 ao longo do DCCR e a de torta de café corresponde ao valor de 48,78 g/L.

Os resultados do ensaio de validação podem ser visualizados na Figura 17, abaixo:



**Figura 17:** Perfil da atividade enzimática de mananases do ensaio de validação do meio otimizado, a partir das alíquotas tiradas ao longo dos 7 dias cultivo.

Neste ensaio, os valores de atividade enzimática nos dias 3 e 5 foram que são estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey de acordo com o teste de Tukey, expondo que o tempo de pico da atividade enzimática foi deslocado para o terceiro dia de cultivo. Os valores das triplicatas foram estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey e a comparação com o modelo do DCCR pode ser contemplada na Tabela 15.

**Tabela 15:** Comparação dos resultados experimentais do ensaio de validação com o resultado teórico da otimização do modelo simplificado.

Meio de Cultivo	Valor Teórico	Valor Experimental	Desvio	Erro
Otimizado Simplificado	24,3	22,4 ± 0,2	1,85	7,61%

O erro associado ao valor obtido de atividade enzimática de mananases quando comparado ao valor teórico do modelo criado foi de 7,61%. Ao longo de todas as análises estatísticas realizadas no estudo foi aceito um erro de 10% como convencional aos processos biotecnológicos, desse modo, o modelo estatístico foi validado por se enquadrar dentro da margem de erro aceita ao longo do presente trabalho.

O meio de cultivo otimizado possibilitou eliminar 3 compostos do meio inicialmente proposto e reduzir expressivamente a concentração do tampão fosfato de

potássio pH 5,5 utilizada, aumentando somente o valor da torta de café, conforme exposto na Tabela 16.

**Tabela 16:** Comparação nutricional entre o meio de cultivo inicialmente proposto e o meio de cultivo otimizado após a aplicação das metodologias estatísticas.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	
	<b>Meio inicial</b>	<b>Meio otimizado</b>
Torta de Café	30	48,78
Extrato de Levedura	4	4
Tampão Fosfato de Potássio (pH 5,5)	0,5	0,25
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	--
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	--
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	--

Outro aspecto que correspondeu a um ganho significativo desse processo foi a produtividade, em que inicialmente o valor de atividade enzimática máxima foi de 20 UI/mL no sétimo dia de cultivo e ao final deste trabalho o valor da atividade sofreu um aumento 15,5%, correspondendo a 23,1 UI/mL, apresentando seu valor máximo no terceiro dia de cultivo. Essa redução de tempo do sétimo para o terceiro dia cultivo correspondeu a um aumento de 42,9% na produtividade, reduzindo os custos de controle do processo.

A Tabela 17 apresenta o valor final da atividade enzimática de mananases obtida pelo meio otimizado dos artigos coletados na prospecção científica, que realizaram o cultivo em fase líquida. Pôde-se perceber que o valor ótimo para a atividade enzimática de mananases obtido neste trabalho (23,1UI/mL) foi significativamente inferior aos encontrados na literatura, entretanto, os valores não podem ser comparados, uma vez que as metodologias para determinação da atividade enzimática foram diferentes.

**Tabela 17:** Valores de atividade enzimática de mananases após a otimização do meio de cultivo dos artigos científicos coletados na prospecção científica que realizaram o cultivo em fase líquida, com diferentes biomassas.

Autores	Cepa	Biomassa	Tempo de cultivo (dias)	Atividade enzimática de mananases
Karahalil et al; 2019	A. sojae	Extrato de alfarroba	8	687,89 UI/mL
Karahalil et al; 2019	A. sojae	Extrato de alfarroba	8	331,83 UI/mL
Mohamad et al.; 2011	A. niger	Extrato de alfarroba	10	2063 nkat/mL
Ozturk et al.; 2010	A. sojae	Goma guar	11	482 UI/mL
Yatmaz et al; 2016	A. sojae	Melaço de Beterraba	9	568,7 UI/mL
Yatmaz et al; 2020	A. sojae	Glicose	10	52,55 UI/mL
Yilmazer et al.; 2020	A. sojae	Extrato de alfarroba	10	180 UI/mL

Analizando a literatura não foi encontrado uma uniformidade nos métodos utilizados entre os pesquisadores para determinação da atividade enzimática de mananases, tendo divergências claras em: pH, tipo e concentração de substrato, tempo de interação entre enzima e substrato e a modelagem matemática para converter os parâmetros experimentais em atividade enzimática de mananases.

Por conta deste gargalo, os trabalhos da literatura não puderam ser comparados diretamente a este trabalho, porém, o resultado encontrado neste estudo é satisfatório pois apresentou atividade de mananases superior ao meio adaptado de Breccia et al. (1995) descrito por Nunes et al. (2019) para a produção de mananases (7 UI/mL).

## 6 CONCLUSÕES

A prospecção científica sistemática foi fundamental para a determinação dos parâmetros iniciais do cultivo, bem como para a formulação do meio inicialmente proposto, os quais permitiram uma marcha analítica assertiva.

A torta de café se mostrou uma biomassa com enorme potencial para a produção de mananases, promovendo uma atividade enzimática média de  $23,1 \pm 0,33$  UI/mL. Essa atividade correspondeu a um aumento de 15,5% do meio inicialmente proposto, o qual foi superior ao meio adaptado de Breccia et al. (1995) descrito por Nunes et al. (2019) para a produção de mananases.

Além disso, as condições otimizadas promoveram um aumento de 42,9% na produtividade enzimática, uma vez que houve a transição do dia ótimo de cultivo, do sétimo para o terceiro, o que minimiza os custos de controle de processo bem como facilita o acompanhamento da produção.

Ainda se faz necessário realizar algumas análises para formulação do extrato enzimático bruto obtido para sua aplicação industrial, de modo a mapear compostos que amplifiquem a atividade enzimática de mananases e que estabilizem as enzimas do extrato, facilitando a sua conservação.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo bibliográfico realizado gerou dados tão significativos ao ponto de promover a apresentação desta etapa do projeto na 11<sup>a</sup> Semana de Integração Acadêmica (SIAC) da UFRJ no ano de 2022, sendo aclamado com uma Menção Honrosa.

O desenvolvimento experimental empregando a biomassa de café foi apresentado no congresso XXIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAVERM) & XIV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB) & Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), no ano de 2022. Os resultados do projeto experimental realizado foram apresentados na 12<sup>a</sup> Semana de Integração Academica da UFRJ no ano de 2023, também sendo aclamado com uma Menção Honrosa.

O resultado deste projeto gerou como produto direto enzimas produzidas a partir de uma tecnologia 100% brasileira que estão sendo aplicadas em alguns trabalhos voltados para a hidrólise enzimática de biomassas ricas em manana desenvolvidos pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT) e o Laboratório de Análises de Aromas (LAROMA - IQ/UFRJ).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDESHAHIAN, P.; SAMAT, N.; HAMID, A. A.; YUSOFF, W. M. W. Utilization of palm kernel cake for production of b-mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in

solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37. p. 109-109, 2009.

ACEVEDO, M. D.; UREÑA, L. J. B.; GARCÍA, F. J. C.; FERRE, F. C. Agricultural waste: review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. **Global Ecology and Conservation**, v. 22, p. 1-23, 2020.

AMIT, A.; NAKACHEW, M.; YILKAL, B.; MUKESH, Y. A Review of Factors affecting Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, p. 62-67, 2018.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. Green Chemistry: Theory and Practice, **Oxford University Press**: Oxford, 1998.

ANDREAS, J.; BON, E.P.S.; FERREIRA-LEITÃO, V. Sustainable technology supported by enzymes – prevention and valorization of agroindustrial residues. **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 34, p. 54-56, 2016.

ASMARI, K. M. A.; ZEID, I. M. A; ATTAR, A. M. A. Medicinal Properties of Arabica coffee (*Coffea arabica*) Oil: An Overview. **International Quarterly Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 20-29, 2020.

BAHRUTH, E. B.; ANTUNES, A. M. S.; BOMTEMPO, J. V. Prospecção tecnológica na priorização de atividades de CeT. In: **Gestão em Biotecnologia**. Editora E-papers. Rio de Janeiro. p. 300–324, 2006.

BARAK, S.; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 74-80, 2014.

BATTISTA, F.; BOLZONELLA, D. Some critical aspects of the enzymatic hydrolysis at high dry-matter content: a review. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 12, p. 711-723, 2018.

BEARMAN, M.; SMITH, C. D.; CARBONE, A.; SLADE, S.; BAIK, C.; WARRINGTON, M. H.; NEUMANN, D. L. Systematic review methodology in higher education. **Higher Education Research & Development**, v. 31, p. 625-640, 2012.

BIEGLER, L. T.; CERVANTES, A. M.; WACHTER, A. Advances in simultaneous strategies for dynamic process optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 575-593, 2002.

BILBECH, M.; CHAARI, F.; BHIRI, F.; DAMMAK, I.; GHORBEL, R. E.; CHAABOUNI, S. E. Production of manno-oligosaccharides from locust bean gum

using immobilized *Penicillium occitanis* mannanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, p. 111-115, 2011.

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGORI, M. D.; SIIERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**. n. 78, p. 469-472, 1995.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, p. 1-26, 2018.

CHEN, W. L.; LIANG, J. B.; JAHROMI, M. F.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. **BioResources**, v. 8, p. 3844-3857, 2013.

CHRISTENSEN, J.; OLHOFF, A. Lessons from a decade of emissions gap assessments. **United Nations Environment Programme**, Nairobi. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/emissions-gap-report-10-year-summary>, 2019. Acessado em: 07 de março de 2022.

CHUGH, P.; SONI, R.; SONI, S. K. Deoiled Rice Bran: A Substrate for Co-Production of a Consortium of Hydrolytic Enzymes by *Aspergillus niger* P-19. **Waste Biomass Valor**, v. 7, p. 513-525, 2016.

FAVARRO, C. P.; BARALDI, I. J.; CACCIATORI, F. P.; FARINAS, C. S.  $\beta$ -Mannanase Production Using Coffee Industry Waste for Application in Soluble Coffee Processing. **Biomolecules**, v. 10, p. 1-18, 2020.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI, H.B.C.; BON, E.P.S. Biomass residues in brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, n. 1, p. 65–76, 2010.

GERMEC, M.; YATMAZ, E.; KARAHALIL, R.; TURHAN, I. Effect of different fermentation strategies on  $\beta$ -mannanase production in fed-batch bioreactor system. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-12, 2017.

GRUNWALD, A. Strategic knowledge for sustainable development: the need for reflexivity and learning at the interface between science and society. **Int. J. Foresight and Innovation Policy**, v. 1, p. 150-167, 2004.

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; SLUITER, A. Preparation of Samples for Compositional Analysis. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) of NREL**. Technical Report NREL/TP-510-42620, 2008.

HAN, M. J.; BEHERA, S. K.; PARK, H. S. Anaerobic co-digestion of food waste leachate and piggery wastewater for methane production: statistical optimization of key

process parameters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1541-1550, 2012.

HARPER, L.; KALFA, N.; BECKERS, G. M. A.; HERBST, K. W.; BAGLI, D. The impact of COVID-19 on research. **Journal of Pediatric Urology**, v. 16, p. 715-718, 2020.

HÖHNE, N.; FRANSEN, T.; HANS, F.; BHARDWAJ, A.; BLANCO, G.; den ELZEN, M.; HAGEMANN, M.; HENDERSON, C.; KEESLER, D.; KEJUN, J.; KURIYAMA, A.; SHA, F.; SONG, R.; TAMURA, K.; WILLS, W. Bridging the Gap: Enhancing Mitigation Ambition and Action at G20 Level and Globally. An Advance Chapter of The Emissions Gap Report 2019. **United Nations Environment Programme**. Nairobi, 2019.

HOLMOUIST, G. U.; WALKER, H. W.; STAHR, H. M. Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents onGrowth of *Aspergillus* flaws and *A. parasiticus*. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 778-782, 1983.

JANA, U. K.; SURYAWANSHI, R. K.; PRAJAPATI, B. P.; SONI, H.; KANGO, N. Production optimization and characterization of mannooligosaccharide generating  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 308-314, 2018.

KARAHALIL, E.; GERMEC, M.; KARAOGLAN, M.; YATMAZ, E.; COBAN, H. B.; INAN, M.; TURHAN, I. Partial purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, p. 1189-1205, 2020.

KARAHALIL, R.; GERMEC, M.; TURHAN, I.  $\beta$ -Mannanase production and kinetic modeling from carob extract by using recombinant *Aspergillus sojae*. **Biotechnology Progress**, v. 35 (e2885), p. 1-12, 2019.

KOTE, N. V.; PATIL, A. G. G.; MULIMANI, V. H. Optimization of the Production of Thermostable endo- $\beta$ -1,4 Mannanases from a Newly Isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 152, p. 213-223, 2009.

LEE, K. M.; GILMORE, D. F. Statistical Experimental Design for Bioprocess Modeling and Optimization Analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, p. 101-115, 2006.

LIMA, A. C. P.; BASTOS, D. L. R.; CAMARENA, M. A.; BON, E. P. S.; CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, R. S. S.; GUTARRA, M. L. E. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açaí (*Euterpe oleracea*)

processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00551-w>

LUCIA, U., GRISOLIA, G. Biofuels Analysis Based on the THDI Indicator of Sustainability. **Frontiers in Energy Research**, 9: 794682, 2021.

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

MOHAMAD, S. N.; RAMANAN, R. N.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Improved mannan-degrading enzymes production by *Aspergillus niger* through medium optimization. **New Biotechnology**, v. 28, p.146-152, 2011.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, p. 165-178, 2008.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; VISWANATH, B.; CHANDRA, S.; REDDY, R. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p, 472-476, 2006.

NUNES, O. C.; TUPI, L. P. C.; TEIXEIRA, R. S. S. Prospecção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de mananases. TCC (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Grande Rio. Rio de Janeiro, p. 20, 2019.

OZTURK, B.; CEKMECELIOGLU, D.; OGEL, Z. B. Optimal conditions for enhanced B-mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 135-139, 2010.

QUIROZ, R. C.; ROUSSOS, S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C. N. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 1-8, 2014.

RAHSID, J. I. A.; SAMT, N.; YUSOFF, W. M. W. Optimization of temperature, moisture content and inoculum size in solid state fermentation to enhance mannanase production by *Aspergillus terreus* SUK-1 using RSM. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 533-539.

RAHSID, J. I. A.; SAMT, N.; YUSOFF, W. M. W. Screening and optimization of medium composition for mannanase production by *Aspergillus terreus* SUK-1 in solid state fermentation using statistical experimental methods. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, p. 242-255, 2012.

RAISSI, S.; FARSAJI, R. R. Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology. **International Journal of Mathematical, Computational, Physical, Electrical and Computer Engineering**, v. 3, p. 197-201, 2009.

REDGWELL, R., FISCHER, M. Coffee carbohydrates. **Braz. J. Plant Physiol**, p.165–174, 2006.

SADIQ, R. M. A.; AHMED, J. F.; ALAA, M. A. Effect of some physical factors on growth of five fungal species. **European Academic Research**, v. 5, p. 1069-1078, 2018.

SILVA, A. C. R.; SILVA, C. C.; GARRETT, R.; REZENDE, C. M. Comprehensive lipid analysis of green Arabica coffee beans by LC-HRMS/MS. **Food Research International**, 2020.

SILVA, B. C. R.; GOIS, I. M.; BISPO, D. F.; MARQUES, J. J.; SILVA, C. F. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**, v. 14, p. 1-10, 2018.

SILVA, R. M. V.; BRAND, A. L. M.; TINOCO, N. A. B.; FREITAS, S. P.; REZENDE, C. Bioactive Diterpenes and Serotonin Amides in Cold-Pressed Green Coffee Oil (*Coffea arabica* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 0(e-20230131), p. 1-8, 2023.

SONI, H.; GANAIE, M. A.; PRANAW, K.; KANGO, N. Design-of-experiment strategy for the production of mannanase Biocatalyst ususing plam karnel cake and its application to degrade locust bean and guar gum. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 229-234.

SONI, H.; RAWAT, H. K.; PLERSCHKE, B. I.; KANGO, N. Purification and characterization of b-mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-12.

SORNLAKE, W.; MATETAVIPAREE, P.; RATTANAPHAN, N.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L.  $\beta$ -Mannanase production by *Aspergillus niger* BCC4525 and its efficacy on broiler performance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3345-3351, 2013.

STALBRAND, S.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIIJARI, L. Purification and characterization of two B-mannanases from *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, p.229-242, 1993.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVA HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos Conhecidos, novos aliados. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TEIXEIRA, R. S.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BOM, E. P. S. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydr Res.**, 363, p. 33-37, 2012.

VAN ZYL, W. H.; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GORGENS, J. F. Mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203-1213, 2010.

YATMAZ, E.; GERMEC, M.; KARAHALIL, E.; TURHAN, I. Enhancing B-mannanase production by controlling fungal morphology in the bioreactor with microparticle addition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 121, p. 123-130, 2020.

YATMAZ, E.; KARAHALIL, R.; GERMEC, M.; ILGIN, M.; TURHAN, I. Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced b-mannanase production. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 39, p. 1391-1399, 2016.

YILMAZER, C.; GURLER, H. N.; ERKAN, S. B.; OZCAN, A.; YAVUZ, G. H.; GERMEC, M.; YATMAZ, E.; TURHAN, I. Optimization of mannooligosaccharides production from different hydrocolloids via response surface methodology using a recombinant *Aspergillus sojae*  $\beta$ -mannanase produced in the microparticle-enhanced large-scale stirred tank bioreactor. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 00(e14916), p. 1-12, 2020.

YIN, J. S.; LING, Q. L.; LI, D. M.; SUN, Z. T. Optimization of production conditions for  $\beta$ -mannanase using apple pomace as raw material in solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 101-108, 2013.