

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Aplicação de amiloglucosidase purificada de *Aspergillus niger* para produção de mosto cervejeiro

Isadora Yano Correa Esselin

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia

Janeiro/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Aplicação de amiloglucosidase purificada de *Aspergillus niger* para produção de mosto cervejeiro

Isadora Yano Correa Esselin

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Prof. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia
Janeiro/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Aplicação de amiloglucosidase purificada de *Aspergillus niger* para produção de mosto cervejeiro

Isadora Yano Correa Esselin

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Instituto de Biotecnologia

Prof. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia
Janeiro/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Aplicação de amiloglucosidase purificada de *Aspergillus niger* para produção de mosto cervejeiro

Isadora Yano Correa Esselin

Aprovado pela Banca Examinadora em: 30/01/2023 Nota: 90

EDGAR SILVEIRA
CAMPOS:0358530
2459

Assinado de forma digital por
EDGAR SILVEIRA
CAMPOS:03585302459
Dados: 2023.03.06 07:52:54
-03'00'

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 30 de janeiro de 2023

Dedico aos meus familiares e, principalmente, aos meus pais, Candice Yano Correa e Jobson de Castro Silva. Por sempre apoiarem e viverem meus sonhos comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Edgar Silveira Campos, por todo auxílio, confiança e ensinamentos durante a execução deste trabalho. À Raquel Cristina Cavalcanti Dantas, pela coorientação, conselhos, dedicação e empenho em buscar soluções para resolver os problemas encontrados no caminho da minha pesquisa.

Agradeço à banca examinadora, Camila Souza Porto e Carla Cristina de Sousa, por aceitarem meu convite neste momento especial e, pelas contribuições e aprendizados valiosos.

Agradeço à equipe do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) e ao Laboratório de Bioquímica da Biodiversidade do Cerrado (LABBIO), por permitirem a realização dos experimentos necessários para a conclusão deste trabalho, com o apoio e a infraestrutura essenciais. Agradeço, principalmente, às minhas colegas de laboratório, Amanda Rocha e Larissa Bortoli, pelo amparo técnico e emocional, assistência, confiança e amizade.

Agradeço as técnicas e professores do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e da Faculdade de Engenharia Química (FEQUI), pelos ensinamentos e conhecimentos repassados, com tanta dedicação.

Agradeço a empresa Ceva da Boa – Brewshop, por conceder a matéria prima, a cevada moída, para a produção do mosto cervejeiro. Sem o seu fornecimento não seria possível a execução desta etapa.

Agradeço aos meus pais, Candice Yano Correa e Jobson de Castro Silva, por me ensinarem sobre o amor e por sempre priorizarem minha educação e minhas escolhas com relação a ela. Às minhas avós, Maria Yano e Silma de Castro, por sempre acreditarem em mim.

Agradeço as minhas colegas de apartamento e irmãs da vida, Carolina Neves e Lorena Fialho, por durante quatro anos serem meu refúgio em um estado fora de casa.

Agradeço ao João Victor Pereira, por ser meu companheiro em todos os momentos e por me incentivar a acreditar no meu melhor, principalmente, na escrita deste trabalho.

Agradeço aos amigos que ganhei na graduação, especialmente, ao topper, por serem minha família e conforto em Uberlândia e, por deixarem o curso mais leve e divertido.

RESUMO

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido, de modo a liberar como produto unidades de glicose e dextrinas. As amilases podem ser divididas em α -amilases, β -amilases e amiloglucosidases. Esta última tem papel importante na produção de mostos variados, já que ao ser adicionada no processo de mostura ajuda as enzimas intrínsecas da cevada a converter o malte moído em açúcares fermentáveis, passíveis de sofrerem fermentação alcoólica. Uma fonte de obtenção de amiloglucosidase é pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*, por meio de fermentações submersas (FS) e em estado sólido (FES). Dessa forma, este estudo tem como objetivo verificar a eficiência da suplementação de amiloglucosidase purificada no mosto moído, como simulação do procedimento cervejeiro. Para isso, as comparações do teor de açúcares fermentáveis nos mostos com e sem a suplementação da amiloglucosidase foram feitas. Obteve-se que o mosto com a amiloglucosidase continha um aumento de 7,58% do teor de açúcares redutores e um extrato fermentável de 9 °Brix. Indicando um satisfatório caminho no desenvolvimento de mostos com maior teores de açúcares fermentáveis pelo acréscimo enzimático, porém com necessidade de estudos futuros.

Palavras – chave: *Aspergillus niger*, amiloglucosidase, mosto cervejeiro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1. Cultivo e manutenção de <i>Aspergillus niger</i>	6
3.2. Produção de amiloglucosidase de <i>Aspergillus niger</i>	6
3.3. Atividade enzimática pelo teste de DNS	7
3.4. Purificação de amiloglucosidase por precipitação fracionada com etanol.....	9
3.5. Suplementação de amiloglucosidase purificada na mostura e verificação de eficiência	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
4.1. Construção da Curva analítica de açúcares redutores pelo método DNS	11
4.2. Determinação da atividade enzimática da amiloglucosidase.....	15
4.3. Suplementação da amiloglucosidase purificada na mostura e verificação de eficiência.....	18
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Preparo das diluições da solução padrão de glicose a 20 g/L.....	8
Tabela 2: Relação absorvância e concentração de glicose g/L em diferentes estudos	13
Tabela 3: Valores diferentes de recuperação de atividade enzimática, segundo diversos estudos	17
Tabela 4: Teor de açúcares fermentáveis com e sem a suplementação da amiloglucosidase, segundo três estudos	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos mecanismos de ação das amilases na molécula de amido.....	1
Figura 2: Crescimento do <i>Aspergillus niger</i> em meio de cultura BDA, visualização macroscópica e microscópica	3
Figura 3: Sistema fermentativo FES utilizando farelo de arroz como substrato para <i>Aspergillus</i>	4
Figura 4: Processo fermentativo para produção da amiloglucosidase e sua extração enzimática.....	7
Figura 5: Procedimento de purificação por precipitação fracionada com etanol para obtenção da amiloglucosidase purificada.....	10
Figura 6: Esquema de suplementação da amiloglucosidase purificada no mosto cervejeiro e comparação de eficiência.....	11
Figura 7. Curva analítica de açúcar redutor (AR) liberado por um reagente sintético glicose D-anidra em g/L.....	12
Figura 8: Curva analítica de açúcar redutor (AR) em g/L de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013).....	13
Figura 9: Reação entre o ácido 3,5-dinitrosalicílico e o açúcar redutor no teste de DNS.....	15
Figura 10: Conversão do amido presente no malte moído em açúcares redutores (g/L) no mosto sem e com a adição de amiloglucosidase nos tempos 0 e 60 min após o início do processo de maturação.....	18
Figura 11: Valores de Brix nos mostos com e sem adição de glucoamilase com 1h de mostura	21

LISTA DE ABREVIATURAS

NUCBIO:	Núcleo de Processos Biotecnológicos
LABBIO:	Laboratório de Bioquímica da Biodiversidade do Cerrado
BDA:	Batata Dextrose Ágar
FS:	Fermentação submersa
FES:	Fermentação em estado sólido
DNS:	Ácido 3,5 -dinitrosalicílico
R^2 :	Coefficiente de correlação
ml:	Mililitro
L:	Litro
kg:	Quilo
g:	Gramma
h:	Horas
min:	Minutos
nm:	Nanômetro
U:	Unidade internacional de atividade enzimática
R%:	Recuperação de atividade enzimática
°Bx:	Brix

1. INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas atuantes na hidrólise do amido, ao promoverem a decomposição da ligação glicosídica α -1,4 deste polissacarídeo, de modo a liberar como produtos dextrinas e, gradualmente polímeros constituídos de unidades de glicose. (SPIER, 2005). São usadas pelos animais na digestão de amido existente em alimentos; pelas plantas para a degradação do amido presente em excesso em raízes e, pelos microrganismos como mecanismo para quebrar o amido, utilizado como fonte de carbono (SILVA, 2009).

Ademais, as amilases podem ser caracterizadas em dois grupos, a partir do seu modo de ação. As endoamilases, as quais atuam nas ligações glicosídicas ao acaso, no interior da molécula de amido e, as exoamilases, que hidrolisam a molécula de amido, através da extremidade não redutora da molécula (SILVA, 2009). Além disso, elas podem também serem subdivididas em β -amilases, amiloglicosidases e α -amilases. Sendo as β -amilase e amiloglicosidase com mecanismo de atuação como exoamilases e, a α -amilase tendo ação como uma endoamilase (PEREIRA, 2015). A Figura 1 exibe uma representação dos diferentes mecanismos de ação das amilases na molécula de amido.

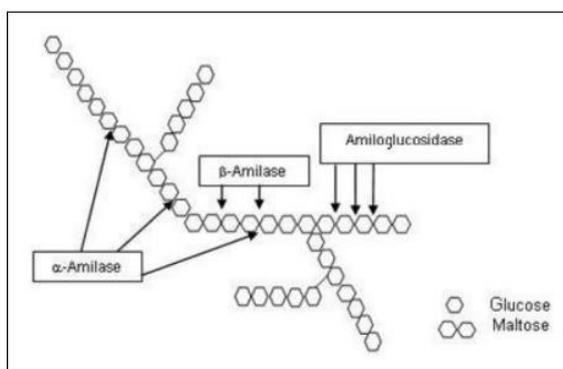


Figura 1: Representação dos mecanismos de ação das amilases na molécula de amido. Fonte: Spier, 2005

As amiloglicosidases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 de extremidades não-redutoras do amido, tendo como produtos unidades de β -D-glicose. Para mais, as glucoamilases, outro nome para as amiloglicosidases, são conhecidas como enzimas de sacarificação, uma vez que promovem a hidrólise completa do polissacarídeo citado,

quando incubadas por um período de tempo adequado (SILVA, 2009).

Neste contexto, as amilases em geral provocam bons resultados em diversos processos biotecnológicos. Podem ser utilizadas na indústria têxtil, ao serem aplicadas na quebra de goma de amido, uma camada protetora removível, que reveste os fios e linhas dos jeans. Elas são adicionadas as peças de roupas, a fim de evitar danificações nas fibras dos tecidos, durante o processo de tecelagem. Desta maneira, o amido ao ser hidrolisado pelas amilases, resultam em dextrinas e maltoses, que são solúveis em água e, conseqüentemente são removidas no processo simples de lavagem (SPIER, 2005).

Na indústria de panificação, as amilases são empregadas para melhorar as propriedades organolépticas e atrasar o processo de envelhecimento dos pães, deixando-os “novos”. Podem alterar positivamente a coloração e textura do miolo deste alimento e acentuar a quantidade de açúcares, de modo a aprimorar o sabor. Além disso, aceleram a fermentação dos pães e assim, a disponibilização de gás carbônico, um dos metabólitos resultantes da fermentação por leveduras (SPIER, 2005).

Uma fonte vantajosa de produção enzimática para aplicação industrial são os microrganismos. Eles apresentam uma vasta diversidade genética e funcional, desenvolvidas no decorrer de anos de evolução e adaptação a pressões seletivas (OHARA *et al.*, 2016). Os fungos, sobretudo, são capazes de gerar produtos benéficos para a indústria. São responsáveis por sintetizar, através de processos fermentativos, enzimas de alta produção, de grande variabilidade, custos inferiores e, com estabilidade ao armazenamento, a partir de circunstâncias ideais de pH e temperatura (CAMPOS *et al.*, 2017).

Os fungos filamentosos, como o gênero *Aspergillus*, são grandes sintetizadores de enzimas extracelulares (SIBEN *et al.*, 2007). Além de se constituírem como os maiores fornecedores das enzimas industriais, dado que utilizam substratos de carbono de baixo custo, como resíduos agrícolas, para a produção de seus metabólitos (CAMPOS *et al.*, 2017). Farinhas e farelos de vários grãos, como arroz, batata e cevada, subprodutos de procedimentos agrícolas, podem ser usados no meio de cultivo para elevar a produtividade (SIBEN *et al.*,

2007).

O *Aspergillus niger* é uma das espécies de *Aspergillus*, conhecido como “mofo negro”. Trata-se de um fungo filamentoso de fácil manipulação, aptidão em fermentar uma variedade de bioprodutos, sintetizando-os com elevado rendimento (SPIER, 2005). Possui a capacidade de desenvolver quarenta enzimas diferentes, sendo a glucoamilase uma delas (SIBEN *et al.*, 2007). A Figura 2 mostra o crescimento do *Aspergillus niger* em um meio de Batata Dextrose Ágar (BDA), ao olho nu e visto a partir de um microscópio óptico.



Figura 2: Crescimento do *Aspergillus niger* em meio de cultura BDA, visualização macroscópica e microscópica. Fonte: Abbas, Khudor e Alkhursan (2021)

A glucoamilase produzida por *Aspergillus niger* apresenta uma atividade maior em pH 3,5 a 4,5 e em temperatura ótima de 60°C (BLANCO *et al.*, 2014). Sendo sintetizada a partir de processos fermentativos (SPIER, 2005).

Um sistema fermentativo tem como maior intuito proporcionar um ambiente adequado para o crescimento celular de microrganismos e, assim, levar a produção de metabólitos de interesse, como enzimas microbianas (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). A produção delas é possível a partir do cultivo em substratos sólidos de resíduos agrícolas em fermentação em estado sólido (Figura 3) e do cultivo em substratos líquidos sintéticos em fermentação submersa. De modo que é fundamental que o substrato tenha uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio para, respectivamente, servir como recurso energético e meio de proliferação celular (SPIER, 2005).



Figura 3: Sistema fermentativo FES utilizando farelo de arroz como substrato para *Aspergillus*.
Fonte: Magalhães, 2021

Além das aplicações industriais das amilases descritas acima, há também a sua utilização no setor cervejeiro. A fabricação de cerveja é feita através da fermentação alcoólica do mosto de cevada maltada. O processo produtivo é dividido em fabricação do mosto, fermentação, maturação, filtração e engarrafamento (REINOLD, 1997).

Dentro do procedimento de preparação do mosto, há o processo de mostura, que também é chamado de brassagem ou maceração. Nela, o malte moído é inserido em água potável e os carboidratos presentes são hidrolisados em açúcares fermentáveis, isto é, em maltose e glicose e, em açúcares não fermentáveis, ou seja, em dextrinas (BLANCO *et al.*, 2014).

Nesta conjuntura, o mosto cervejeiro pode ser definido como a solução de carboidratos, sais minerais, proteínas e glicídios, em água, decorrentes da modificação enzimática da matéria prima do mosto, isto é, da cevada (OLIVEIRA; ARAÚJO; SERRANO, 2015). Este cereal maltado possui, já em sua constituição, enzimas responsáveis por converter os polissacarídeos em açúcares fermentáveis, passíveis de sofrerem fermentação alcoólica, por leveduras, de modo a produzir etanol e dióxido de carbono. Entretanto, caso estas enzimas tenham baixa atividade enzimática no mosto, podem resultar em efeitos desfavoráveis, como fermentação lenta, estabilidade e sabor da cerveja reduzidos e índice de filtração baixo (BLANCO *et al.*, 2014).

Sabendo disto, a suplementação de enzimas exógenas no mosto cervejeiro é uma solução para os problemas mencionados e servem também para a produção de outros tipos de cerveja, como a geração de cervejas low carb, pela adição de amiloglucosidase (BLANCO *et al.*, 2014).

Em vista disso, torna-se fundamental estudos da viabilidade da adição da amiloglucosidase no mosto de cevada maltada, como uma simulação do processo cervejeiro, para investigar os efeitos de sua suplementação e, assim, futuramente, ter aplicação industrial na produção de cervejas variadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a eficiência da suplementação da amiloglucosidase purificada, a partir da comparação entre a quantidade de açúcares fermentáveis no mosto com e sem a sua adição.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir a amiloglucosidase, através de fermentações em estado sólido;
- Quantificar a atividade enzimática da amiloglucosidase;
- Comparar metodologias de teste de DNS;
- Purificar a amiloglucosidase pela precipitação fracionada com etanol;
- Identificar a quantidade de açúcar redutor presente no mosto com e sem a adição da glucoamilase purificada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo e manutenção de *Aspergillus niger*

Uma colônia de fungo *Aspergillus niger* foi selecionada do banco do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e armazenada em um tubo de ensaio. O fungo foi inoculado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (batata 200 g/L, glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) e incubado em tubo de ensaio à temperatura ambiente durante 120 horas. Após isso, foi mantida em geladeira e subcultivada de 15 em 15 dias (GIMENES, 2018).

3.2. Produção de amiloglucosidase de *Aspergillus niger*

Assim que foram feitos o cultivo e a manutenção do *Aspergillus niger*, a produção da enzima foi realizada por meio da fermentação em estado sólido (FES). Previamente, o pré-inóculo do fungo foi fermentado em 100 mL de meio czapek (sacarose 30 g/L, nitrato de sódio 2 g/L, fosfato dipotássico 1 g/L, sulfato de magnésio 0,5 g/L, cloreto de potássio 0,5 g/L e sulfato ferroso 0,010 g/L), por um período de 48 horas em 100 rpm, à temperatura ambiente. Prontamente, a separação das células foi realizada utilizando um filtro tipo peneira. Em cada frasco Erlenmeyer (10 mL), as células ressuspensas em 100 mL de água pura foram distribuídas para a FES que utilizou 10g de substrato farelo de arroz no tempo de incubação de 72 horas, à temperatura ambiente (GIMENES, 2018).

Após a fermentação, foi realizada a extração da enzima acrescentando 50 mL de água destilada no extrato enzimático bruto. Com a adição da água destilada, os substratos fermentados foram homogenizados e colocados sob agitação a 110 rpm por 1 hora. Posteriormente, os extratos enzimáticos foram coletados, por meio do processo de filtração em peneira, centrifugados a 5000 rpm ao longo de 10 minutos e foram analisados (Figura 4) (GIMENES, 2018).



Figura 4: Processo fermentativo para produção da amiloglucosidase e sua extração enzimática. Fonte: Autoria própria

3.3. Atividade enzimática pelo teste de DNS

Neste próximo passo, ocorreu a avaliação da atividade enzimática, por meio do método de quantificação de glicose liberada (MILLER, 1959), sendo todos os açúcares redutores determinados por ele. Para isso, inicialmente preparou-se o reagente ácido 3,5 -dinitrosalicílico (DNS) (INFORSATO; PORTO, 2016).

Para a sua composição, foram feitas duas soluções 1 e 2, a partir da pesagem de 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, conhecido como Sal de Rochelle, e 10 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico. A solução 1 foi formada com a dissolução de 10 g de DNS em 200 mL de NaOH aquoso, obtendo uma concentração de 2 mol/L. Já a solução 2 foi preparada com a introdução dos 300 g de Sal de Rochelle em um bécker com 500 mL de água destilada, sob agitação e com aquecimento constante a 50 °C (INFORSATO; PORTO, 2016).

Após isso, as duas soluções 1 e 2 foram misturadas, solubilizadas e seu volume acrescentado para 1000 mL. Assim, o reagente DNS estava pronto e foi armazenado em um frasco âmber envolto em papel alumínio, já que é uma solução fotossensível e disposta na geladeira (INFORSATO; PORTO, 2016).

Em seguida, foi determinada a Curva analítica de açúcar redutor de uma solução mãe de glicose 20 g/L. Foram feitas diluições da solução padrão em concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,6; 2,8; 3,0; 3,2; 3,4 g/L, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Preparo das diluições da solução padrão de glicose a 20 g/L.

Concentração de glicose (g/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
0,0	0 mL	10 mL
0,2	0,1 mL	9,9 mL
0,4	0,2 mL	9,8 mL
0,6	0,3 mL	9,7 mL
0,8	0,4 mL	9,6 mL
1,0	0,5 mL	9,5 mL
1,2	0,6 mL	9,4 mL
1,4	0,7 mL	9,3 mL
1,6	0,8 mL	9,2 mL
1,8	0,9 mL	9,1 mL
2,0	1,0 mL	9,0 mL
2,2	1,1 mL	8,9 mL
2,4	1,2 mL	8,8 mL
2,6	1,3 mL	8,7 mL
2,8	1,4 mL	8,6 mL
3,0	1,5 mL	8,5 mL
3,2	1,6 mL	8,4 mL
3,4	1,7 mL	8,3 mL

Fonte: O Autor

Após as diluições, 0,5 mL de cada tubo foram incorporados à 1 mL de ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS) e aquecidos por 5 minutos à temperatura de 100°C. Após isso, passaram por resfriamento em banho de gelo por 5 minutos e foi adicionada água destilada até a marca de 12,5 mL. O tubo apenas com água destilada foi usado como controle negativo e as leituras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Com isso, foi adquirida a equação da reta, o coeficiente de correlação (R^2) e a curva analítica, através do software Excel (INFORSATO; PORTO, 2016).

Posteriormente, a quantidade de 0,5 mL de extrato enzimático, em triplicata, foi acrescentada em 1,5 mL de solução de amido (4% p/v) pH 4,2 a 60°C, pelo tempo de 60 minutos em banho maria. Em seguida, foram coletados 0,5 mL das amostras e adicionado 1 mL de DNS e submetidos a ebulição por 100°C, durante 5 min para imobilizar a reação do açúcar redutor das amostras com o DNS (AHMED, 2013).

Depois, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 min, completadas com água destilada, até a marca de 12,5 mL e lidas suas absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nm

(DE GOUVEIA; KILIKIAN, 2000). O controle negativo foi o tubo contendo água destilada, solução de amido tamponada e DNS, sem a presença da enzima. Assim, a atividade enzimática foi uma unidade equivalente a quantidade de enzima usada para liberar 1 μmol de glicose por minuto (MANERA *et al.*, 2008).

3.4. Purificação de amiloglicosidase por precipitação fracionada com etanol

O extrato enzimático bruto sofreu precipitação fracionada com etanol. Para a primeira fração, a cada 1 mL de solução proteica, foi adicionado 0,6 mL de etanol (pré resfriado a -20°C), gota a gota em agitação e todo procedimento foi realizado a 0°C (CUTLER, 2003). Depois que o etanol foi acrescentado totalmente, o extrato enzimático continuou sendo agitado por 10 minutos, com controle constante da temperatura. Posteriormente, foi separado o precipitado proteico por centrifugação em 5000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi guardado e, para a segunda fração, o sobrenadante passou pela adição gota a gota de 0,25 mL de etanol a cada 1 mL de solução proteica (CUTLER, 2003).

Após a adição total do etanol, continuou sobre agitação magnética por mais 10 minutos e depois passou por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos novamente. Os precipitados da primeira e segunda fração com a enzima de interesse foram ressuspensos em tampão fosfato citrato pH 4,2 e agitados em vortéx para as suas completas solubilizações no tampão. Os sobrenadantes e os precipitados ressuspensos das duas frações foram submetidos à determinação de atividade enzimática (Figura 5) (CUTLER, 2003).

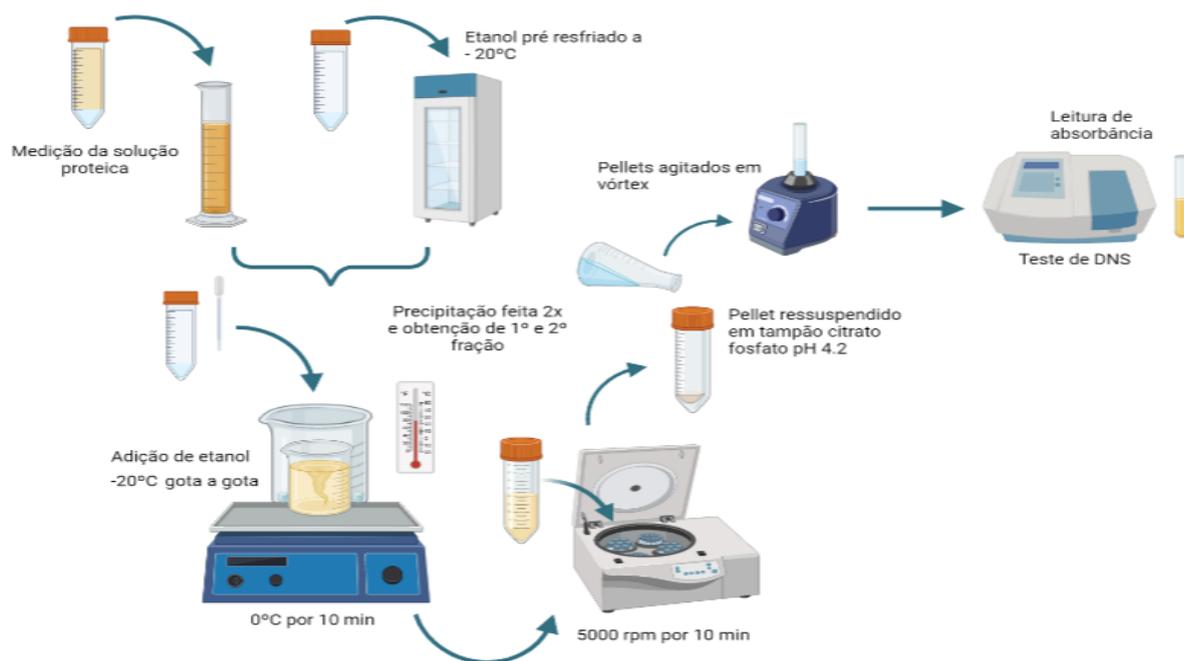


Figura 5: Procedimento de purificação por precipitação fracionada com etanol para obtenção da amiloglucosidase purificada. Fonte: Autoria própria.

Posterior ao processo de quantificação da atividade enzimática, a sua recuperação (R%) foi calculada. A recuperação da atividade enzimática compara a atividade enzimática da glucoamilase purificada com a atividade do extrato fúngico inicial (BIAZUS *et al.*, 2010). A determinação do R% é abordada no estudo de Manera, Meinhardt e Kalil (2011) e foi usada neste trabalho conforme a Equação 1.

$$R(\%) = \frac{\text{Atividade da enzima purificada}}{\text{Atividade do extrato enzimático}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

3.5. Suplementação de amiloglucosidase purificada na mostura e verificação de eficiência

Para a suplementação da amiloglucosidase purificada no processo de mostura, a metodologia adaptada de Mertens *et al.* (2021) foi seguida, em que dois mostos em proporção laboratorial foram preparados a partir de 1 kg de cevada moída fornecida pela Ceva da Boa – Brewshop. O primeiro mosto foi obtido pela adição de 180 mL de água destilada e 50 g de malte em um becker encamisado acoplado a um banho maria a 65°C. Esta solução foi mantida em aquecimento por 60 minutos sob agitação constante e o teor de açúcar redutor foi medido durante este período. Decorridos o tempo previsto, foi incrementado mais 45 mL de água

destilada no mosto cervejeiro e toda solução passou por filtração a vácuo com papel de filtro, sendo os primeiros 100 mL refiltrados (MERTENS *et al.*, 2021)

Após isso, o segundo mosto foi feito pelo mesmo procedimento do primeiro, porém com a diferença de ter ocorrido a suplementação da amiloglucosidase purificada ressuspendida em tampão fosfato citrato pH 4,2 dentro do mosto cervejeiro no início da maceração (MERTENS *et al.*, 2021).

Além do teste de DNS, foi feita a avaliação da quantidade de sólidos solúveis pelo teste de °Brix nos dois mostos filtrados com e sem a adição da amilase de interesse. O teste de °Brix ocorreu a partir do acréscimo de uma gota de cada mosto pelo contador de gotas no refratômetro digital e a leitura da escala em porcentagem do teor de sólidos solúveis na superfície do equipamento. De modo que os valores obtidos foram comparados (Figura 6) (BRUNELLI; VENTURINI FILHO, 2013).

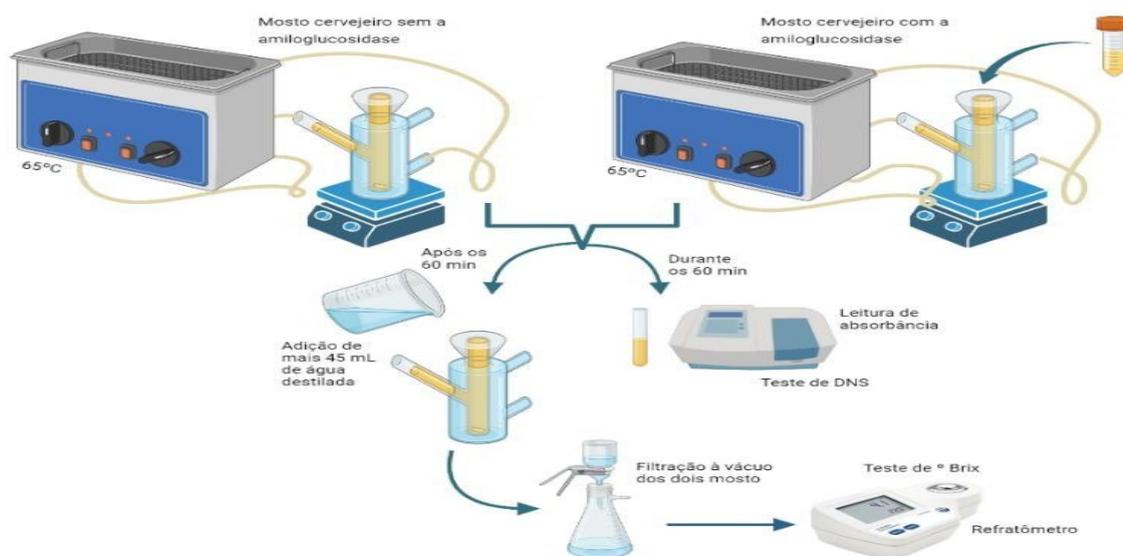


Figura 6: Esquema de suplementação da amiloglucosidase purificada no mosto cervejeiro e comparação de eficiência. Fonte: Autoria própria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Construção da Curva analítica de açúcares redutores pelo método DNS

A partir do método de DNS, obteve-se a Curva analítica de açúcar redutor liberado pela degradação do reagente sintético de glicose D-anidra, em diferentes concentrações resultantes de diluições, representada na Figura 7. Junto com a curva, foi possível adquirir a equação da

reta e o R^2 , que permitiram comparar a concentração de substância com a absorbância lida em espectrofotômetro e observar o grau de associação entre as duas variáveis, respectivamente (MARTINS, 2014).

Assim, a construção da equação, que representa o gráfico comparativo, foi feita considerando o y como a concentração de glicose (g/L) na solução padrão e o x como a absorbância em 540 nm, no teste de DNS (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013).

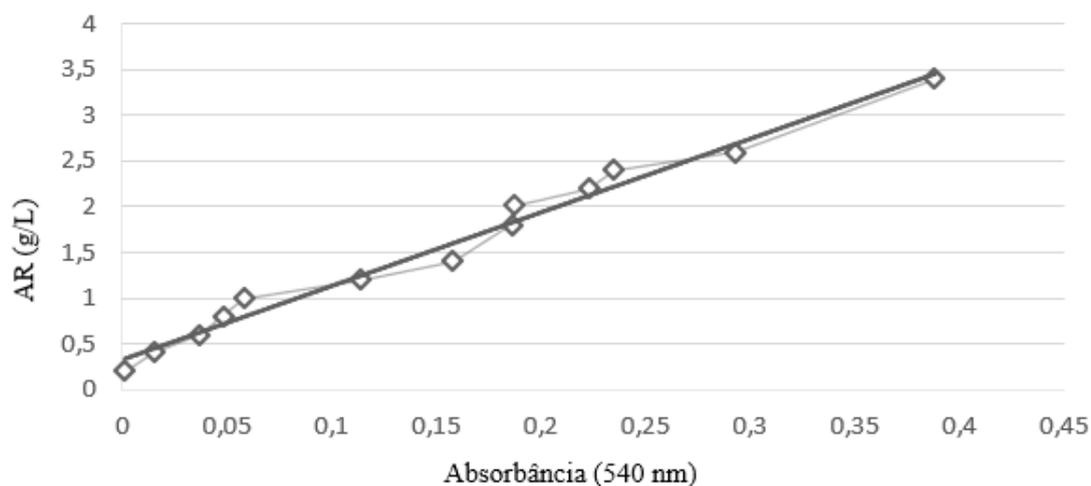


Figura 7: Curva analítica de açúcar redutor (AR) liberado por um reagente sintético glicose D – anidra em g/L. Fonte: Autoria própria.

Por meio do gráfico da Figura 7, atingiu-se a equação $y = 8,0722x + 0,3314$, ou melhor, $AR = 8,0722 * ABS + 0,3314$ e o $R^2 = 0,983$. A obtenção destes parâmetros é importante para a determinação da concentração de açúcar redutor presente no mosto cervejeiro, após a degradação da cevada com e sem o auxílio da amiloglucosidase, assim como para dosar a atividade enzimática da mesma enzima no extrato bruto e após a sua purificação (INFORSATO; PORTO, 2016).

Essa relação é possível, uma vez que as absorbâncias alcançadas pelo teste de DNS na quantificação da atividade enzimática e no processo de produção do mosto são substituídas na equação, de modo a conseguir a concentração final. A associação entre absorbância e teor de açúcar nas amostras, quando atingidas por raios luminosos paralelos, é baseada na Lei de Lambert - Beer. Ela fundamenta a espectrofotometria, uma vez que contemplou a ligação entre a transmissão da luz monocromática e a espessura do meio absorvente. Além de definir a

conexão entre a transmissão e a concentração do líquido analisado (COMPRI-NARDY; STELLA; OLIVEIRA, 2009).

Assim, quando raios luminosos penetram um meio líquido homogêneo, como a concentração de glicose, toda a parte deste líquido analisado absorve igualmente a luz que atravessa. Sendo essa absorção proporcional à concentração molecular de soluto do meio. Com isso, é possível inferir que quanto maior a concentração da solução, maior a absorção de luz pela solução e maior a sua absorbância (COMPRI-NARDY; STELLA; OLIVEIRA, 2009).

Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013), encontraram uma Curva analítica de açúcar redutor com valores de absorbância maiores das obtidas por este trabalho experimentalmente. A Figura 8 retrata a curva de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013).

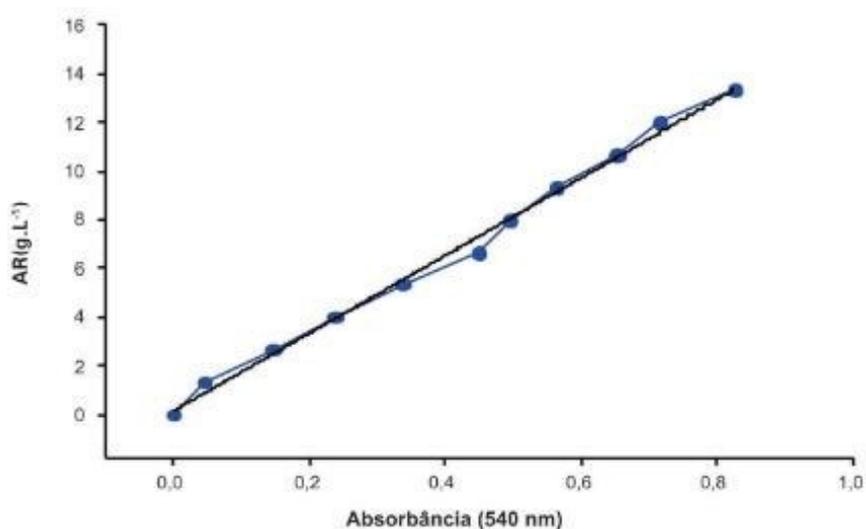


Figura 8: Curva analítica de açúcar redutor de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013).

Enquanto nesta pesquisa, as concentrações de glicose 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L corresponderam as absorbâncias 0,001; 0,015; 0,037; 0,048 e 0,058 g/L, no comunicado técnico de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013), as concentrações citadas obtiveram as absorbâncias 0,089; 0,233; 0,376; 0,520 e 0,664 g/L, a partir da equação de reta $AR (g/L) = 1,3894 * ABS + 0,0762$ e $R^2 = 0,9965$. A Tabela 2 representa a comparação entre os valores de absorbância obtidos nos dois estudos.

Tabela 2: Relação absorvância e concentração de glicose g/L em diferentes estudos

Concentração de glicose g/L	Absorvância em 540 nm	
	Neste trabalho	Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013) ¹
0,2	0,001	0,089
0,4	0,015	0,233
0,6	0,037	0,376
0,8	0,048	0,520
1,0	0,058	0,664

Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013)¹.

Fonte: Autoria própria

Neste contexto, os valores de absorvância podem ter sido menores do que o estudo de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013), devido a ocorrência de erros experimentais de diluições ou o armazenamento inadequado do reagente DNS na geladeira. Erros na prática de diluição é bastante comum e foi abordada por Machado *et al.* (2015) em seu estudo, ao relatar a perda de eficiência dos tratamentos de vinhedos por causa de erros de diluição, mostrando ser um problema que afeta diversas áreas, até a agricultura.

Já com relação ao DNS, há uma certa divergência nas metodologias propostas na literatura para o seu armazenamento. Isso porque segundo Inforsato e Porto (2016), após o preparo do ácido 3,5-dinitrosalicílico, ele deve ser armazenado na geladeira por um período de até 2 dias. Entretanto, Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013) informam em seu comunicado técnico que o DNS pode ser armazenado em refrigerador por até 30 dias.

Este trabalho seguiu as orientações de Maldonate *et al.* (2013) e, por isso, é pressuposto que como o ácido estava gelado ao sair da geladeira, ele poderia ter dificuldade em reagir com os açúcares redutores no aquecimento por 5 minutos para imobilizar a reação. De modo que a quantidade de glicose liberada total presente na solução pode não ter sido completamente expressa nos valores de absorvância.

Ao observar o coeficiente de correlação 0,9965 do estudo de Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013), pode-se afirmar que a associação entre as duas variáveis é um pouco mais alta do que a deste presente estudo, uma vez que segundo Martins (2014), um R^2 bom é o mais

próximo de 1. Entretanto, o coeficiente de correlação de 0,983 não foi tão distante de 1 e pode ser ainda considerado um resultado aceitável, visto que de acordo com Callegari-Jacques (2003), um coeficiente de correlação no intervalo de 0,90 a 1 é correspondente a uma assimilação forte entre as duas variáveis.

4.2. Determinação da atividade enzimática da amiloglucosidase

Os açúcares redutores são carboidratos com carbono carbonila livre, isto é, não estão incluídos em uma ligação glicosídica, portanto podem sofrer oxidação. Estes açúcares são monossacarídeos como glicose, frutose e galactose e, na presença de DNS, em solução alcalina, são oxidados em açúcares com grupo carboxil, como o ácido D-glucônico (AHMED, 2013).

Enquanto o açúcar redutor é oxidado, o DNS funciona como um agente oxidante, de modo que ao reagir com o carbono carbonílico, se reduz a um composto nitroamido análogo, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Esta transformação pode ser vista pela mudança de coloração amarelada do DNS para a cor avermelhada do nitroamido. Assim, a partir da radiação absorvida a 540 nm pelo ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, é possível determinar a quantidade de açúcar redutor na amostra analisada (AHMED, 2013). A representação da reação entre o DNS e os açúcares redutores é descrita na Figura 9 a seguir.

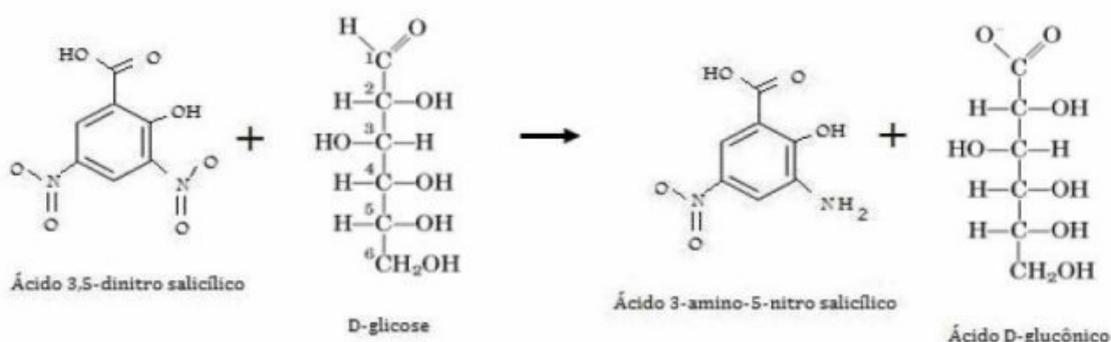


Figura 9: Reação entre o ácido 3,5-dinitrosalicílico e o açúcar redutor no teste de DNS. Fonte: AHMED, 2013

A quantificação da amiloglucosidase, a partir da atividade enzimática é importante, pois avalia a ação desta enzima na hidrólise de substratos como amido, liberando monômeros de glicose. A atividade enzimática é calculada como uma unidade enzimática (U), tendo um caráter internacional e sendo designada como unidade equivalente a quantidade de enzima

usada para liberar 1 μmol de glicose por minuto (MANERA *et al.*, 2008).

Sabendo disso, a unidade enzimática alcançada foi 8,5554 $\mu\text{mol/mL}$ em 60 minutos. Para a obtenção da quantia de enzima necessária por minuto, como a definição de Manera (2008) defende, o dado foi dividido por 60, alcançando o valor de 0,1425 $\mu\text{mol/mL}$ para a amostra. Assim, a amostra passou pelo processo de purificação e depois pelo teste de DNS para a realização da determinação da recuperação da atividade enzimática (R%).

O método de purificação escolhido neste trabalho foi a precipitação fracionada com etanol. Esta técnica consiste na precipitação da enzima de interesse, a partir do seu fracionamento de uma solução enzimática. No processo, a solução enzimática recebe adição de um solvente orgânico, o etanol, que ao entrar em contato com a proteína solúvel em água, diminui a sua solubilidade até fazer com que ela perca sua agregação, por forças eletrostáticas e dipolares, e precipite em dois momentos de fracionamento (CORTEZ, 1998).

A precipitação fracionada com etanol tem importância na purificação de enzimas, tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial. Isso porque apresenta vantagens relevantes como: alto grau de pureza, boa recuperação da atividade enzimática da proteína na forma precipitada, execução menos complexa, divergência de solubilidade entre a proteína de interesse e as proteínas totais existentes na solução, equipamentos simples e agentes precipitantes de baixo custo, de grande abundância e que necessitam de baixa concentração para a realização do experimento (CORTEZ, 1998).

Sabendo disso, diferente do que é proposto por Cortez (1998), em que a autora em sua dissertação expõe que apenas uma pequena porção da enzima se precipita na primeira fração e a maioria se precipita na segunda fração, neste trabalho a absorvância lida referente ao precipitado da primeira fração foi maior que o valor de absorvância do precipitado da segunda fração. De modo que obteve uma absorvância de 0,0086 para a primeira fração e 0,0006 para a segunda fração, indicando que havia maior concentração da enzima no precipitado da primeira fração.

Por causa disso, foi preferível calcular a atividade enzimática do precipitado da primeira

fração. Assim, encontrou-se a unidade enzimática da amiloglucosidase purificada no valor de 0,0743 $\mu\text{mol/mL}$ por minuto. Dessa forma, é possível observar que o precipitado citado teve uma recuperação da atividade enzimática de 52,1%, indicando a porcentagem de enzima recuperada com relação ao extrato enzimático (MANERA; MEINHARDT; KALIL, 2011).

Silva *et al.* (2009) estudou a purificação por cromatografia de troca iônica da amiloglucosidase proveniente do fungo *Aspergillus niveus*, obtendo 52% de recuperação de atividade enzimática. Manera, Meinhardt e Kalil (2011), por sua vez, acompanharam o processo de purificação, também por cromatografia de troca iônica, da mesma enzima, mas oriunda do *Aspergillus niger*, encontrando uma porcentagem de recuperação de 47,6%. A Tabela 3 ilustra as três recuperações da atividade enzimática da amiluglocosidase descritas.

Tabela 3: Valores diferentes de recuperação de atividade enzimática, segundo diversos estudos

Estudos	Recuperação(%)	Método adotado
Neste trabalho	52,1%	Precipitação fracionada
Silva <i>et al.</i> (2009) ¹	52%	Cromatografia de troca iônica
Manera, Meinhardt e Kalil (2011) ²	47,6%	Cromatografia de troca iônica

Silva *et al.* (2009) ¹ Manera, Meinhardt e Kalil (2011)²

Assim, pode-se afirmar que as recuperações de Silva *et al.* e Manera, Meinhardt e Kalil foram menores do que a alcançada neste trabalho. Em ambos os artigos da literatura comparados, a metodologia adotado foi a de cromatografia de troca iônica, um método classificado como cromatografia de líquida de alta eficiência, que tem como desvantagens alto custo de instrumentação, alto custo de operação e demanda de experiência do analista (SOUZA, 2013). Portanto, a recuperação de 52,1% comporta-se como um valor formidável, quando comparada com as literaturas de Silva *et al.* (2009) e Manera, Meinhardt e Kalil (2011), pois além de ser superior, foi obtido a partir de uma metodologia de purificação, a precipitação fracionada, mais fácil de manipular e mais viável economicamente (CORTEZ, 1998).

4.3. Suplementação da amiloglicosidase purificada na mostura e verificação de eficiência

A partir do teste de DNS, as concentrações em g/L de açúcares redutores liberados da degradação da cevada nos mostos cervejeiros com e sem a suplementação da amiloglicosidase purificada foram calculadas no tempo inicial e com 1 h decorrida da maceração. Os valores encontrados para o mosto sem a adição da enzima exógena foram 2,39 g/L e 3,56 no tempo zero e depois de 60 min, respectivamente. Já em relação ao mosto com a adição da glucoamilase, em zero minutos obtive-se 3,17 g/L e em 60 min relatou-se 3,83 g/L de açúcares redutores presentes (Figura 10).

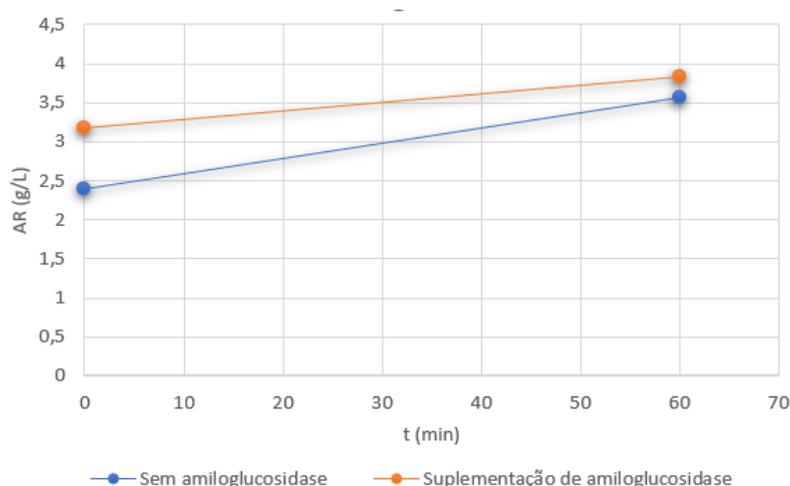


Figura 10: Conversão do amido presente no malte moído em açúcares redutores (g/L) no mosto sem e com a adição de amiloglicosidase nos tempos 0 e 60 min após o início do processo de maturação

Ao analisar o gráfico e os valores de concentração alcançados neste trabalho, é possível inferir que a suplementação da amiloglicosidase no mosto cervejeiro provocou o incremento do conteúdo de açúcares fermentáveis no mosto em 7,58% após 1 hora da mostura. Este aumento da quantidade de glicose está em conformidade com o que é defendido pelos autores Espinosa-Ramírez, Perez-Carrillo e Serna-Saldívar (2014) e Pozo-Insfran *et al.* (2004), pois ambos os estudos defendem que a adição da glucoamilase no tratamento do malte moído provoca um aumento dos açúcares fermentáveis mais simples, a partir da degradação das dextrinas.

obtiveram um aumento de 20% e 23% do teor de açúcar redutor, respectivamente. Com isso, observa-se que o incremento encontrado neste trabalho está abaixo do esperado na literatura. Sendo representada esta conjuntura na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 Teor de açúcares fermentáveis com e sem a suplementação da amiloglucosidase, segundo três estudos

Tratamentos	Neste estudo	Espinosa – Ramírez,¹ Perez – Carrillo e Serna – Saldívar	Pozo – Insfran²
Malte de cevada	3,56 g/L	91,2 g/L	59,2 g/L
Malte de cevada + AMG	3,83 g/L	108,3 g/L	72,6 g/L
Aumento(%)	7,58%	20%	23%

Espinosa – Ramírez, Perez – Carrillo e Serna – Saldívar (2014) ¹

Pozo – Insfran *et al.* (2004)²

Fonte: Autoria própria

Ao analisar a Tabela 4, neste trabalho houve um aumento inferior aos encontrados nos estudos de Espinosa-Ramírez, Perez-Carrillo e Serna-Saldívar (2014) e Pozo- Insfran *et al.* (2004), os dados das concentrações de açúcares redutores (g/L) nos tratamentos sem e com o suplemento enzimático foram também menores dos alcançados pelos dois estudos em questão.

Enquanto os valores dos autores Espinosa-Ramírez, Perez-Carrillo e Serna-Saldívar (2014) foram 91,2 g/L de teor de açúcar redutor para o mosto sem a adição da enzima exógena e 108,3 g/L no mosto com a sua suplementação, na pesquisa de Pozo- Insfran *et al.* (2004) a concentração de açúcar redutor total foi de 59,2 g/L no mosto sem a amiloglucosidase e 72,6 g/L no mosto com a sua presença.

Os valores de concentração de açúcar redutor nos mostos com e sem a adição da glucoamilase e o aumento do teor do mesmo tipo de açúcar podem ser justificados por vários motivos. A primeira causa poderia ser a não realização de diluições das amostras antes do teste de DNS. Isso porque as diluições iriam garantir que as absorbâncias lidas estariam localizadas dentro da curva de calibração (AHMED, 2013). O valor máximo de absorbância dentro da curva de calibração neste trabalho é 0,388. Como, no tempo de sessenta minutos, tanto no tratamento sem (0,4) e com a enzima (0,43) as absorbâncias foram maiores que o máximo da

curva, os valores de concentração de açúcares redutores não foram precisos.

Outra justificativa, já citada antes, seria o armazenamento inapropriado do DNS na geladeira por mais de dois dias, já que no estudo de Inforsato e Porto (2016), há a orientação de preservar este ácido apenas durante 48h refrigerado. Além disso, Moura, Pinto e Rodrigues (2007) em seu documento da Embrapa aconselharam o armazenamento do DNS em temperatura ambiente.

Outra pressunção seria que o DNS estaria gelado quando foi colocado em contato com as amostras a serem analisadas, e portanto não conseguiram reagir de forma adequada com os açúcares redutores em 100°C por 5 minutos. Isso porque o DNS não dissolve bem na solução alcalina e necessita de altas temperaturas com agitação para sua solubilização e, conseqüentemente, não ter formação de pelotas no fundo. Portanto, a baixa temperatura da geladeira poderia diminuir a dissolução (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Em contrapartida, ao analisar os artigos de Inforsato e Porto (2016) e Espinosa-Ramírez, Perez-Carrillo e Serna-Saldívar (2014), ambos utilizaram adjuntos junto com a cevada como substratos. Os adjuntos são agentes cervejeiros que funcionam como fonte de carbono substitutivo ou complementativo do malte de cevada e ao serem usados no mosto podem fornecer açúcares fermentáveis para fermentações secundárias. Os adjuntos de xarope de açúcar, por exemplo, aumentam o extrato fermentável no mosto (BOULTON; QUAIN, 2001). Por isso, é concebível que a presença de adjuntos nos experimentos destes estudos podem ter ajudado no aumento dos teores de açúcares, sobretudo quando pensado que enzimas também foram suplementadas, aumentando ainda mais a conversão do amido da cevada.

Além disso, após 1 h da iniciação do processo de mostura, o teste de Brix foi realizado no mosto com e sem a suplementação de amiloglicosidase, através de um refratômetro digital. No mosto sem a glucoamilase, obteve-se um valor médio de triplicatas de 7,18 °Brix. Já no mosto com a enzima de interesse, encontrou-se 9 °Brix, resultante de uma média em triplicatas também (Figura 11).

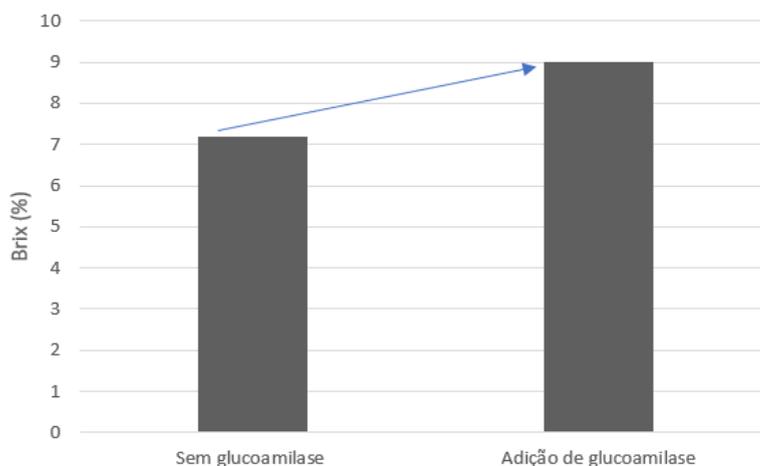


Figura 11: Valores de Brix nos mostos com e sem adição de glucoamilase com 1h de mostura.

Fonte: Autopria própria.

A Escala Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) trata-se da escala em porcentagem da quantidade de sólidos solúveis em uma solução de sacarose (FILHO; BEZERRA, 2016). Ela pode ser utilizada para medir o máximo de açúcares que a degradação da cevada foi capaz de liberar. Portanto os valores de 7,18 $^{\circ}\text{Brix}$ e 9 $^{\circ}\text{Brix}$ indicam que o mosto sem a suplementação enzimática apresentava 7,18 g de açúcar por 100 g de solução e o mosto com a amiloglicosidase continha 9 g de açúcar por 100 g de solução. Com isso, é possível inferir que a adição da enzima de interesse no mosto cervejeiro provocou um aumento do teor de açúcares.

Dentro do contexto cervejeiro, até o período de junho de 2019, o Decreto N $^{\circ}$ 6.871 de 2009 regulamentava a Lei n $^{\circ}$ 8918, também denominada Lei de Bebidas. Esta lei dispunha sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização das bebidas no Brasil. Uma de suas deliberações eram as quantidades de açúcares necessários em Brix no mosto para serem classificadas em cervejas tradicional e leve. Enquanto o valor entre 10,5 $^{\circ}\text{Brix}$ a 12 $^{\circ}\text{Brix}$ era considerado uma cerveja tradicional, a leve, também chamada de light, era conceituada de 5 $^{\circ}\text{Brix}$ a 10,5 $^{\circ}\text{Brix}$ (BRASIL, 2009).

Como o $^{\circ}\text{Bx}$ neste trabalho deu um valor de 9 $^{\circ}\text{Brix}$, o mosto produzido estaria dentro da classificação de cerveja leve. Porém, as duas deliberações mencionadas do Decreto N $^{\circ}$ 6.871 de 2009 foram revogadas pelo Decreto N $^{\circ}$ 9.902 de 2019 (BRASIL, 2019), por isso não podem ser consideradas referências. Além disso, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estes decretos revogados, que regulamentam a Lei N $^{\circ}$ 8.918 de Bebidas, estão

sujeito à consulta pública neste momento, não havendo ainda uma nova classificação das cervejas por lei.

Sabendo disso, enzimas exógenas, como a amiloglucosidase, podem ser usadas para a produção de mostos com maiores valores de °Brix, ou seja, maior teor de açúcares solúveis com menores quantidades de cevada como substrato. Sem a adição de enzima, para aumentar o extrato (°Bx), seria necessária a utilização de mais malte (SANTOS, 2018). Por causa disso, a suplementação enzimática é uma alternativa potencial para a economia dos processos cervejeiros e o aumento da lucratividade, já que o malte de cevada contribui para os custos de produção (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

5. CONCLUSÃO

A suplementação da amiloglucosidase no mosto cervejeiro para atuação da degradação do malte moído em açúcares fermentáveis, junto com as enzimas intrínsecas da cevada, mostrou ser um procedimento formidável no aumento do teor de açúcares simples, passíveis de sofrerem fermentação alcoólica, com a utilização de menos quantidade de cevada como substrato. De modo que se expõe ser uma alternativa potencial para redução de custos de produção, já que a cevada é um produto caro no mercado.

Assim, a simulação do processo cervejeiro, focando no preparo do mosto cervejeiro neste trabalho provou que o acréscimo de enzimas exógenas é um caminho possível para a produção de mostos variados. Porém mais estudos devem ser necessários para confirmar os resultados levantados, ver a viabilidade da produção em cervejas em contexto industrial e as consequências no teor alcoólico nas mesmas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, B.A; KHUDOR, M.H; ALKHURSAN, R.N. **Poultry feed fungi: a practical guide.** A practical guide. 2021.

AHMED, R.C.M. **Quantificação de açúcares redutores da casca de arroz após diferentes tipos de pré tratamento seguido da hidrólise enzimática.** 2013. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Energias Renováveis e Ambiente, Agroenergia, Universidade Federal

do Pampa, Bagé, 2013.

BIAZUS, J.P.M *et al.* Purificação de amilases de malte de Zea mays. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, p. 218-223. mar. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000100032>

BLANCO, C.A. *et al.* Innovations in the brewing industry: light beer. **International Journal Of Food Sciences And Nutrition**. Palencia, p. 655-660. 6 mar. 2014. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.893285>

BOULTON, C; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto no 6.871, de 08. Regulamenta da Lei no 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de junho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto no 9.902, de 04. Regulamenta da Lei no 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de julho de 2019.

BRUNELLI, L.T; VENTURINI FILHO, W. G. Análise energética de cerveja elaborada com mel. **Revista Energia na Agricultura**. Botucatu, p. 122-128. jun. 2013. <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2013v28n2p122-128>

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.

CAMPOS, C.F.A *et al.* Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. **Revista Desafios**, Araguaína, v. 04, n. 02, p. 35-53, set. 2017. <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n2p35>

COMPRI-NARDY, M.B.; STELLA, M.B; OLIVEIRA, C. **Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2009. 212 p.

CORTEZ, E.V. **Recuperação de enzimas xilanolíticas por precipitação**. 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1998.

CUTLER, P. **Protein Purification Protocols: methods in molecular biology**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2003. 244 v. <https://doi.org/10.1385/159259655X>

ESPINOSA-RAMÍREZ, J; PEREZ-CARRILLO, E; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by b-amylase or amyloglucosidase addition. **Journal Of Cereal Science**. Monterrey, p. 602-609. 16 ago 2014.

FILHO, B. A .S; BEZERRA, E. R. M. Determinação De Compostos Solúveis Em Uma Solução De Sacarose. (Brix). vol. 23, no. 3, p. 52–52, 2016.

GOUVEIA, T.D; KILIKIAN, B.V. Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand. **Journal Of Chromatography B: B: Biomedical Sciences and Applications** São Paulo, p. 241-246. jun. 2000. <https://doi.org/10.1016/S0378->

[4347\(00\)00031-1](#)

GIMENES, N.C. **Purificação e caracterização de proteases de *Aspergillus terreus* VSP-22**. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

INFORSATO, F.J; PORTO, A.L.M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 444-465, out. 2016. <https://doi.org/10.5380/rber.v5i4.44339>

MACHADO, O.D.D.C *et al.* Erros de diluição e de taxa de aplicação por atomizadores na cultura da videira. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Porto Alegre, v. 7, n. 7, p. 20-26, jan. 2015.

MAGALHÃES, S.L.B. Recuperação de protease de *Aspergillus terreus* VSP-22 por Sistema Bifásico Aquoso peg/fosfato de sódio. 2021. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

MALDONADE, I.R; CARVALHO, P.G.B.; FERREIRA, Nathalie A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. 85. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 4 p.

MANERA, A.P *et al.* Adsorption of Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 Using Ion Exchange Resin. **Brazilian Archives Of Biology And Technology: An international journal**. Pirassununga, p. 1015-1024. out. 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500019>

MANERA, A.P; MEINHARDT, S; KALIL, S.J. Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p651>

MARTINS, M.E.G. Coeficiente de correlação amostral. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 2, n. 02, p. 1-4, jun. 2014. 042. <https://doi.org/10.24927/rce2014.262>

MERTENS, T *et al.* Complexation of transition metals by chelators added during mashing and impact on beer stability. **Wiley Online Library**. p. 345-357. set. 2021. <https://doi.org/10.1002/jib.673>

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, no. 3, p. 426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MOURA, C.L.A; PINTO, G.A.S; RODRIGUES,S. **Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos**. Fortaleza:Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 18 p.

OHARA, A.; BENJAMIM DA SILVA, E.; DE PAULA MENEZES BARBOSA, P.; ATTILI DE ANGELIS, D.; MACEDO, G. Yeasts Bioproducts Prospection from Different Brazilian Biomes. *BAOJ Microbiology*, 2016.

OLIVEIRA, C.J.A; ARAËJO, F.C; SERRANO, H.L. **Estudo do uso de adjuntos em mosto cervejeiro**. 2015. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química de Petróleo, Universidade FederalFluminense, Niterói, 2015.

PEREIRA, C.R. **Produção de amilases por *Aspergillus niger*: Potencial de aplicação na hidrólise do amido granular da batata doce**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2015.

POZO-INSFRAN, D del *et al.* Effect of Amyloglucosidase on Wort Composition and Fermentable Carbohydrate Depletion in Sorghum Lager Beers. **Journal Of The Institute Of Brewing**. Gainesville, p. 124-132. maio 2004. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00191.x>

REINOLD, M.R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden Editora e Comunicações Ltda., 1997. 149 p.

SANTOS, C.R.B. Caracterização do mosto para a produção de cerveja. In: SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA 2018, 22., 2018, Novo Horizonte. **Anais [...]** . Novo Horizonte: Anais dos Seminários de Iniciação Científica, 2019. p. 1-4.

SILVA, T.M *et al.* Properties of a puriWed thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**. São Paulo, p. 1439-1446. ago. 2009. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0630-z>

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 216 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Área: Biologia Comparada, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 2009.

SOUZA, J.S. **Estudo da viabilidade da cromatografia iônica frente a outros métodos para determinação de cianeto em água potável**. 2013. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação em estado sólido**. 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SIBEN, M.Z *et al.* Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus niger*. In: V SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 5., 2007, Passo Fundo. **Anais [...]** . Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2007. p. 1-4.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A; HALL, S.J. **Principles of Fermentation Technology**. 2. ed. Oxônia: Butterworth Heinemann, 1995. 367 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-036131-4.50017-1>

VASCONCELOS, N.M; PINTO, G.A.S; ARAGÃO, F.A.S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5- dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. 22 p.