

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE SÃO PAULO  
CAMPUS AVARÉ  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LILIAM MIDORI OLIVEIRA OUTI**

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES  
PRODUZIDAS PELA FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS POR KEFIR DE ÁGUA**

**AVARÉ  
2018**

**LILIAM MIDORI OLIVEIRA OUTI**

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS PELA  
FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR KEFIR DE ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof(a).Dr(a). Marcela Pavan Bagagli

Co-Orientador(a): Prof(a).Dr(a). Adria de Sousa Bentes

**AVARÉ**

**2018**

Catálogo na fonte  
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré  
Biblioteca Campus Avaré  
Bibliotecária: Anna Karolina Gomes Dias - CRB-8/9563

663.1  
O93p

Outi, Liliam Midori Oliveira.

Prospecção de enzimas extracelulares produzidas pela fermentação de resíduos agroindustriais por kefir de água./ Liliam Midori Oliveira Outi. – Avaré, 2018. 28 il..

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marcela Pavan Bagagli.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adria de Sousa Bentes.

Monografia (Graduação – Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2018.

1. Kefir de água. 2. Fermentação. 3. Enzimas. 4. Amilase. 5. Celulase.  
I. Bagagli, Marcela Pavan. II. Bentes, Adria de Sousa. III. Título.

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS PELA  
FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR KEFIR DE ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tarsila Ferraz Frezza

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marcela Pavan Bagagli

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adria de Sousa Bentes

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré.

Avaré, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

ANEXO IV

	<b>INSTITUTO FEDERAL</b> São Paulo Campus Avaré	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo Campus Avaré
---	---	--

**FOLHA DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)**

Nome: <i>Litam Midori Oliveira Leite</i>
Título: <i>Trabalho de Engenharia de Alimentos produzidas pela fermentação.</i>
Curso: <i>Licenciatura em Ciências Biológicas</i>

**BANCA EXAMINADORA**

Nome: <i>Tamara Ferraz Frezza</i>	
Instituição/Departamento: <i>IFSP - Avaré / Div. Ciências Biológicas</i>	
Nota: <i>9,9</i>	Julgamento: <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado
Assinatura: <i>[assinatura]</i>	

Nome: <i>Marcela Fovam Bagagli</i>	
Instituição/Departamento: <i>IFSP / Eng. Biosistemas</i>	
Nota: <i>9,9</i>	Julgamento: <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado
Assinatura: <i>Marcela Fovam Bagagli</i>	

Nome: <i>Adrie de Sousa Bentes</i>	
Instituição/Departamento: <i>IFSP / Eng. Biosistemas</i>	
Nota: <i>9,9</i>	Julgamento: <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado
Assinatura: <i>Adrie de Sousa Bentes</i>	

**RESULTADO FINAL**

Como parte das exigências para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, o candidato(a)/aluno(a), em sessão pública, foi considerado *aprovado* pela Comissão Examinadora, com média final *9,9*.

Avaré, *14* de *dezembro* de 20*18*.

*Serei eternamente grata a Deus, por ser primordial em minha vida, aos meus pais Ataliba e Conceição e ao meu irmão Mitsuo, que lutaram ao meu lado para que este sonho fosse realizado: “A minha vitória será eternamente nossa!”.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente à Deus, que me abençoa todos os dias com o seu amor e cuidado infinitos.*

*Sou grata aos meus pais, Ataliba Miyuki Outi e Maria Conceição de Oliveira Outi que me apoiam e incentivam por toda a minha trajetória.*

*As minhas queridas Orientadora e Coorientadora Marcela Pavan Bagagli e Adria de Sousa Bentes, pela competência, empenho, apoio e dedicação voltados à elaboração deste trabalho.*

*Ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus Avaré, pelo apoio e incentivo financeiro (PIBIFSP) para o andamento da pesquisa.*

*E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação acadêmica, em especial aos meus professores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas e aos meus padrinhos, Celina e Geraldo o meu muito obrigada!*

*“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”. (John Dewey)*

## RESUMO

A aplicação de enzimas produzidas por micro-organismos apresenta grande importância para bioconversão de materiais diversos em produtos de interesse industrial, tais como moléculas bioativas a geração de energia.

Através do processo de fermentação de diferentes resíduos agroindustriais (melaço de cana, farinha de banana verde e farinha de semente de jaca verde) por grãos de kefir de água, o trabalho tem o intuito de prospectar a produção das enzimas amilase e celulase.

O pH e teor de sólidos solúveis (°Brix) do meio fermentado foram avaliados ao longo das fermentações. A percentagem de ganho de massa médio dos grãos de kefir de água foi avaliada após 96 horas de fermentação. Foi avaliada a melhor formulação de meio de cultivo para obtenção das atividades enzimáticas utilizando um planejamento simplex-centroide.

Foi observada a produção de celulase ( $1,5 \pm 0,1$  U/g) e amilase ( $1,3 \pm 0,1$ ) após 24 horas de processo para o meio composto de melaço e farinha de banana verde em proporções iguais (m:m).

**Palavras-chave:** kefir de água; fermentação; enzimas.

## ABSTRACT

The application of enzymes produced by microorganisms presents great importance for the bioconversion of diverse materials in products of industrial interest, such as bioactive molecules the generation of energy.

Through the process of fermentation of different agroindustrial residues (cane molasses, green banana flour and green jaca seed meal) by water kefir grains, the work is aimed at prospecting the production of the enzymes amylase and cellulase.

The pH and soluble solids content ( $^{\circ}$ Brix) of the fermented medium were evaluated throughout the fermentations. The percentage of average mass gain of water kefir grains was evaluated after 96 hours of fermentation. The best formulation of culture medium to obtain the enzymatic activities was evaluated using simplex-centroid planning.

The production of cellulase ( $1.5 \pm 0.1$  U / g) and amylase ( $1.3 \pm 0.1$ ) was observed after 24 hours of processing for the molasses and green banana flour medium in equal proportions (m : m).

**Key-words:** water kefir; fermentation; enzymes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Meios de cultivo utilizados para produção de enzimas por kefir de água.	19
Figura 2 – Imagem dos grãos após 96 horas de fermentação, após peneirados e lavados.....	21
Figura 3 – curvas de contorno para os modelos significativos para amilase (a) e celulase (b) obtida da fermentação de kefir de água após 24 horas de fermentação .....	24
Gráfico 1 –(a) pH; (b) teor de sólidos solúveis (°Brix) de cada ensaio do delineamento de mistura proposto.....	20
Gráfico 2 – Porcentagem de ganho de massa médio dos grãos de kefir nos diferentes ensaios realizados.....	21
Gráfico 3 – Atividade de Amilase e Celulase nos diferentes ensaios realizados .....	22
Gráfico 4 – Cinética da fermentação do ensaio 4.....	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz do delineamento experimental.....	18
Tabela 2 – Modelos significativos para descrever as atividades de amilase e celulase de acordo com a formulação do meio de cultivo utilizando melaço (M), farinha de banana verde (FBV) e farinha de semente de jaca verde (FSJV).....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>il</b>	Ilustrado
<b>M</b>	Melaço
<b>FBV</b>	Farinha de Banana Verde
<b>FSJV</b>	Farinha de Semente de Jaca Verde

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1.	Atividade Enzimática.....	16
2.1.	Amilase.....	17
2.2.	Celulase.....	17
3.	PROBLEMATIZAÇÃO .....	18
4.	OBJETIVOS .....	18
4.1.	Objetivo Geral .....	18
4.2.	Objetivos Específicos .....	18
5.	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	18
5.2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
5.2.1.	MEIOS DE CULTIVO E GRÃOS DE KEFIR .....	18
5.2.2.	FERMENTAÇÃO .....	19
5.2.3.	OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO DNS.....	20
5.2.4.	QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS NOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO.....	20
6.	ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	20
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	25
	REFERÊNCIAS.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

Os grãos de kefir de água apresentam estrutura pequena e rígida, formato irregular, coloração transparente-amarelada e são recobertos por uma matriz polissacarídica (MAGALHÃES et al., 2011; PRADO et al., 2015). A microbiota dos grãos de kefir é constituída por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, além de leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Os principais produtos finais da fermentação são ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (FIORDA 2017).

Diversas propriedades fisiológicas têm sido relacionadas ao kefir, tais como a modulação de respostas imunológicas, controle da pressão sanguínea e redução dos níveis de colesterol (MAEDA et al., 2004; DOAN, et al. 2017). RODRIGUES et al. (2016) verificaram que cervejas obtidas pela fermentação com kefir de água e cervejas adicionadas de kefir notadamente reduziram as respostas inflamatórias e ulcerogênicas em cobaias. Foi observado a presença de uma camada de cobertura no estômago dos animais tratados com amostras fermentadas por kefir.

Pouco é relatado na literatura quanto ao arsenal enzimático utilizado pelo kefir de água durante a fermentação dos meios de cultivo. No entanto, a sua capacidade de síntese de exopolissacarídeo (DOAN, et al. 2017) é um indicativo de que esses os micro-organismos são produtores de enzimas extracelulares de interesse comercial. Outro indicativo, é a presença de bactérias lácticas nos grãos de kefir, as quais são capazes de produzir enzimas exclusivas, capazes de biotransformar substâncias complexas em compostos com atividade biológica (NIEVES et al. , 2017).

Resíduos e subprodutos agroindustriais tem sido utilizados para reduzir os custos de produção de diversos metabólitos através do processo de fermentação microbiana. O melaço é um resíduo da indústria de açúcar e álcool que contém elevado teor de açúcares e vitaminas, sendo um ótimo meio de cultivo para leveduras e bactérias ácido lácticas (MAITI et al., 2011). A farinha de banana verde, um subproduto, apresenta elevado teor de amido resistente e de fibras solúveis (LIAO et al., 2015). A farinha de semente de jaca apresenta cerca de 13% de proteínas e 79% de carboidratos (SWAMI, S.B. et al., 2012). FIORDA et al. (2017) reportaram o uso de melaço como substrato para produção de bebida fermentada por grãos de kefir.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Atividade Enzimática

Enzimas apresentam um grande potencial mercadológico e, atualmente, há uma busca intensa por aquelas capazes de hidrolisar carboidratos complexos em açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustível (HASUNUMA et al., 2013), enzimas capazes de degradar lipídios, corantes e outros contaminantes presentes em efluentes (LIBARDI et al., 2017), enzimas de síntese e compostos bioativos, tais como lipídios, oligossacarídeos e peptídeos (CASTRO, 2012).

As enzimas são proteínas fundamentais para o sistema metabólico de todos os seres vivos, constituem a base catalítica do metabolismo biológico e por essa razão têm sido uma das moléculas biológicas mais extensivamente estudadas. Nas células vivas elas atuam como biocatalisadores e realizam reações bioquímicas específicas que integram os processos metabólicos das próprias células. Além disso, desempenham importante papel na degradação da matéria orgânica e, portanto, na ciclagem de nutrientes nos ambientes naturais (LEHNINGER et al., 2010).

As enzimas são catalisadores biológicos muito eficientes, pois atuam na transformação de moléculas orgânicas sem alterar a proporção entre os reagentes e produtos do processo e nem interferir na constituição destes (MARZZOCO e TORRES, 1999). Uma vez que as enzimas apresentam atividade catalítica fora dos sistemas vivos, com eficiência catalítica superior à de catalisadores químicos e inorgânicos, têm sido amplamente exploradas em biotecnologia, por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais e de interesse industrial (BEILEN & LI, 2002; NELSON & COX, 2005; SARAIVA, 2009).

As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na obtenção de muitos produtos (OLIVEIRA, 2006; SILVA-NEVES et al., 2006). O potencial de aplicação das enzimas nas indústrias é devido as diversas vantagens que possuem, como o seu alto grau de especificidade e enantiosseletividade das reações que catalisam, efetuação de conversões eficientes e econômicas pela sua capacidade de atuar em condições brandas de pH, temperatura e pressão atmosférica, não causando poluição ambiental, podendo ser rapidamente inativada nas reações, além de serem biodegradáveis (POROSKE, 1984; XU, 2000; VITOLLO, 2001; FELLOWS, 2006)

## 2.1. Amilase

Amilases são carboidrases e tem a função de hidrolisar as ligações glicosídicas, agindo sobre as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 que estão presentes no amido e no glicogênio (OBATA et al., 1977; KOBLITZ, 2008). Representam importantes enzimas industriais, de grande importância biotecnológica, tais como aplicações nas indústrias têxteis, de cervejas, bebidas destiladas, panificação, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA, et al., 2010), estando presente em uma ampla variedade de organismos. As amilases são divididas em duas categorias endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de maneira randômica no interior da molécula de amido, gerando oligossacarídeos de variados tamanhos. As exoamilases hidrolisam a partir da extremidade da cadeia, resultando em produtos finais sucessivamente menores. Atualmente é conhecido um grande número de enzimas que hidrolisam moléculas de amido a diferentes produtos, sendo as  $\alpha$ -amilases uma das mais populares e importantes do ponto de vista industrial, com largo emprego nas indústrias que têm o amido como base de seus produtos.

A habilidade das amilases em hidrolisar o amido in natura é uma propriedade tecnologicamente interessante, uma vez que tais enzimas podem ser usadas no processamento de amido para produção de energia limpa, principalmente a partir de resíduos agrícolas com conteúdo amiláceo.

## 2.2. Celulase

Celulases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades de glicose da celulose, liberando oligossacarídeos e glicose (VITOLLO, 2001). Efetivamente, é a celulose contida na biomassa vegetal que constitui o substrato orgânico mais abundante na natureza disponível para produção de glicose, um dos principais insumos utilizados em muitos segmentos industriais, inclusive na indústria alimentícia.

A completa degradação da celulose geralmente requer a atuação sinérgica de um conjunto de enzimas, que compreende endoglicosidases (celulases-carboximetilcelulose), exoglicanases (celobiohidrolases) e  $\beta$ -glicosidases. De acordo com TEUNISSEN e CAMP (1993) e LYND et al. (2002), as endoglicanases clivam randomicamente as ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4) gerando oligômeros de variados tamanhos e novas cadeias terminais. A subsequente ação das exoglicanases gera

glicose e celobiose como os principais produtos. A ação das  $\beta$ -glicosidases constitui a etapa final da degradação da celulose e envolve a hidrólise de dímeros e celooligosacarídeos resultando na produção final de glicose.

A degradação da celulose é realizada então através do concurso de um sistema multienzimático, constituído por esses três tipos citados anteriormente (PASCHOLATI e LEITE, 1994). São enzimas modulares, constituídas de unidades distintas, denominadas de domínio ou módulos (HENRISSAT et al., 1998).

### **3. PROBLEMATIZAÇÃO**

Do ponto de vista industrial, a utilização de enzimas extracelulares é preferencial e conveniente, dado que ao serem excretadas para o meio de fermentação, o processo de recuperação e purificação destas enzimas é mais simples e permite uma redução dos custos do processo industrial (BEILEN & LI, 2002; R. GUPTA et al., 2002).

Desta forma, o projeto é importante pois visa explorar a produção de enzimas extracelulares, como as celulasas e amilases, pela fermentação de resíduos e subprodutos agrícolas por grãos de kefir de água.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar a produção de enzimas extracelulares pela fermentação de diferentes substratos por kefir de água.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a capacidade dos grãos de kefir de água fermentarem melaço, farinha de banana verde e farinha de semente de jaca verde, bem como a mistura desses subprodutos agroindustriais.
- Avaliar a presença das enzimas amilase e celulase no meio de fermentação.

### **5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **5.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **5.2.1. MEIOS DE CULTIVO E GRÃOS DE KEFIR**

Melaço de cana (M), Farinha de Banana Verde (FBV) e Farinha de Semente de Jaca Verde (FSJV) foram utilizados como meio de cultivo, sendo adquiridos no comércio local. Os Grãos de kefir de água foram gentilmente doados pelo laboratório de Bioprocessos/FZEA/USP sendo mantidos a 5°C em solução de açúcar mascavo (8%).

### 5.2.2. FERMENTAÇÃO

Foram inoculados 5g de grãos de kefir de água em 100mL de meio de cultivo em condições estéreis. A incubação foi feita por 5 dias a 27°C. O pH e o teor de sólidos solúveis foram avaliados a cada 24 horas. A Tabela 1 apresenta os ensaios realizados, compondo um delineamento de misturas centroide com 3 componentes.

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental.

Ensaio	M		FBV		FSJV	
	Codificada	Real (g/L)	Codificada	Real (g/L)	Codificada	Real (g/L)
1	1	60	0	0	0	0
2	0	0	1	60	0	0
3	0	0	0	0	1	60
4	½	30	½	30	0	0
5	½	30	0	0	½	30
6	0	0	½	30	½	30
7	1/3	20	1/3	20	1/3	20

Fonte: a autora, 2018.

Os ensaios foram realizados em duplicata, com exceção do sétimo, que foi realizado em quadruplicata.

A figura 1 apresenta a imagem dos meios preparados para a fermentação com os grãos de kefir.

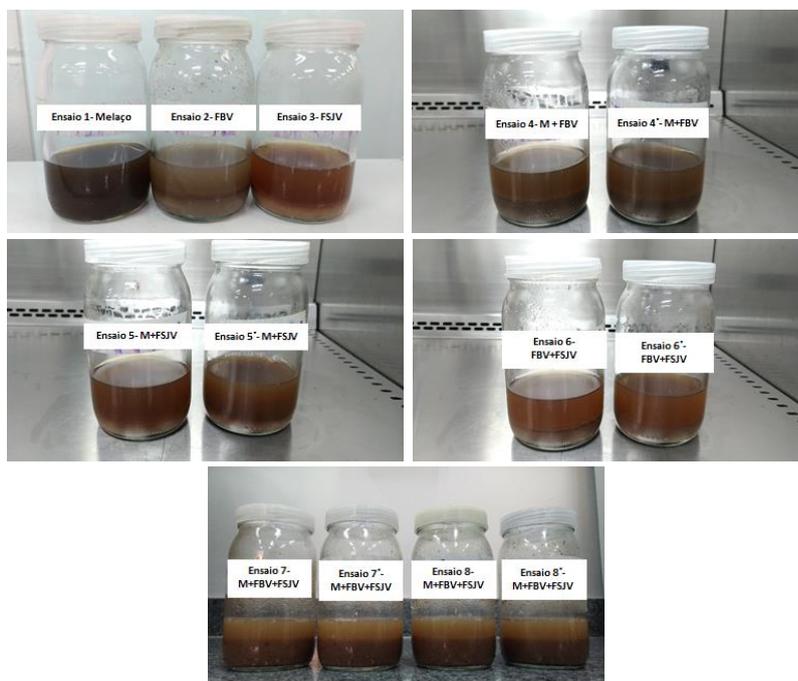


Figura 1 – Meios de cultivo utilizados para produção de enzimas por kefir de água.

Fonte: a autora, 2018.

### 5.2.3. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO DNS.

Inicialmente foi preparada uma solução mãe de glicose 1g/L para a realização da curva padrão de açúcares redutores (reações em triplicata) pelo método do DNS (MILLER, 1959), para assim, seguir com a metodologia quantitativa para as enzimas.

### 5.2.4. QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS NOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Foi realizada determinação da concentração de açúcares redutores formados pela reação dos extratos enzimáticos (meio de fermentação centrifugado a 4°C, 8600 rpm por 10 minutos) com substrato específico para amilase (amido solúvel) e celulase (CMC). Foram preparadas soluções 0,5% dos substratos CMC e amido solúvel, os quais foram ambientados por 5 minutos no banho a 50° C e, então, incubados por 30 minutos com o extrato enzimático diluído adequadamente em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Posteriormente as amostras foram submetidas à análise de DNS (MILLER, 1959) com leitura da absorbância a 540 nm.

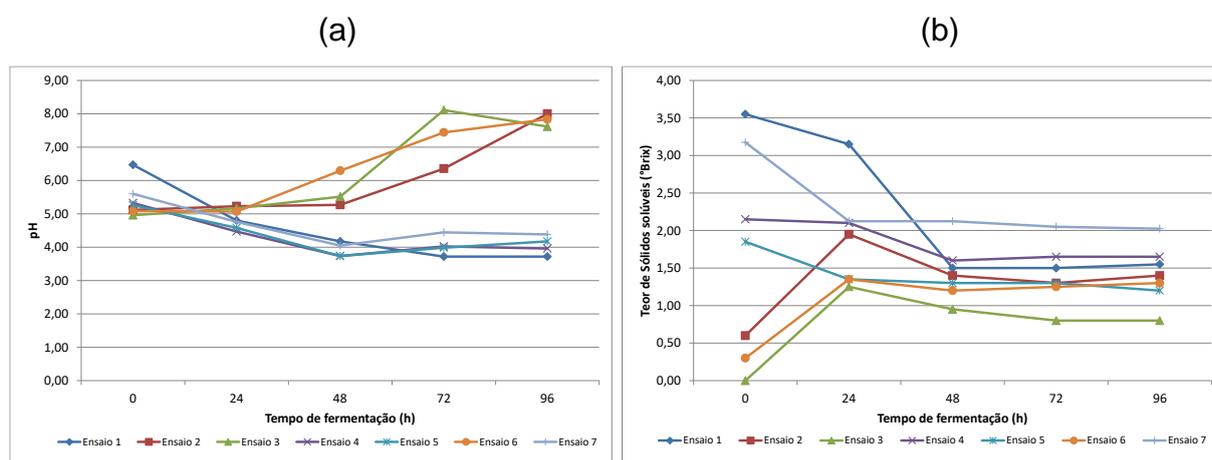
## 6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Observou-se que os meios compostos por farinha de banana verde e farinha de

semente de jaca verde apresentaram uma fração precipitada após a autoclavagem, sendo necessário agitar os meios para homogeneização antes da coleta de amostras.

O gráfico 1 apresenta o comportamento do pH e teor de sólidos solúveis (°Brix) do meio fermentado ao longo do processo.

Gráfico 1– (a) pH; (b) teor de sólidos solúveis (°Brix) de cada ensaio do delineamento de mistura proposto.



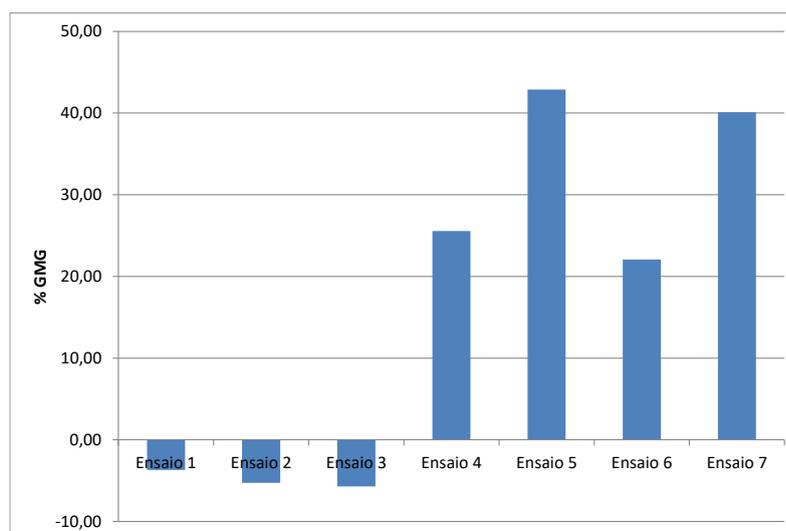
Fonte: a autora, 2018.

Observou-se que o valor do pH baixou para os ensaios 1, 5 e 7 e aumentou nos demais. O abaixamento do pH é natural em fermentações envolvendo micro-organismos que realizam fermentação ácido láctica ou acética, como é o caso do kefir (FIORDA 2017).

O teor de sólidos solúveis apresentou queda para os meios que continham elevado teor de melaço, uma vez que este é composto por mono e dissacarídeos, que são consumidos pelos micro-organismos presentes no meio. Os meios de cultivo compostos majoritariamente por farinha de semente de jaca e farinha de banana verde (2, 3 e 6) apresentaram teor de sólidos inicial baixo, uma vez que são compostos por polissacarídeos como o amido, celulose e pectina, e este valor aumentou após 24 horas de fermentação, sofrendo uma queda após 48 horas.

O Gráfico 2 apresenta os resultados obtidos para a percentagem de ganho de massa médio dos grãos de kefir de água após 96 horas de fermentação para cada ensaio realizado.

Gráfico 2 – Porcentagem de ganho de massa médio dos grãos de kefir nos diferentes ensaios realizados.



Fonte: a autora, 2018.

Observou-se que os ensaios 1, 2 e 3 apresentaram perda de massa enquanto os demais ensaios apresentaram ganho significativo de massa. A perda nos ensaios iniciais pode ter ocorrido devido a malha da peneira (muito aberta) utilizada, fazendo com que pequenos grãos a permeassem. Os demais ensaios, conforme observado na figura 2, apresentaram partículas dos substratos, em especial da farinha de semente de jaca verde junto aos grãos e esses foram quantificados.



Figura 2 – Imagem dos grãos após 96 horas de fermentação, peneirados e lavados.

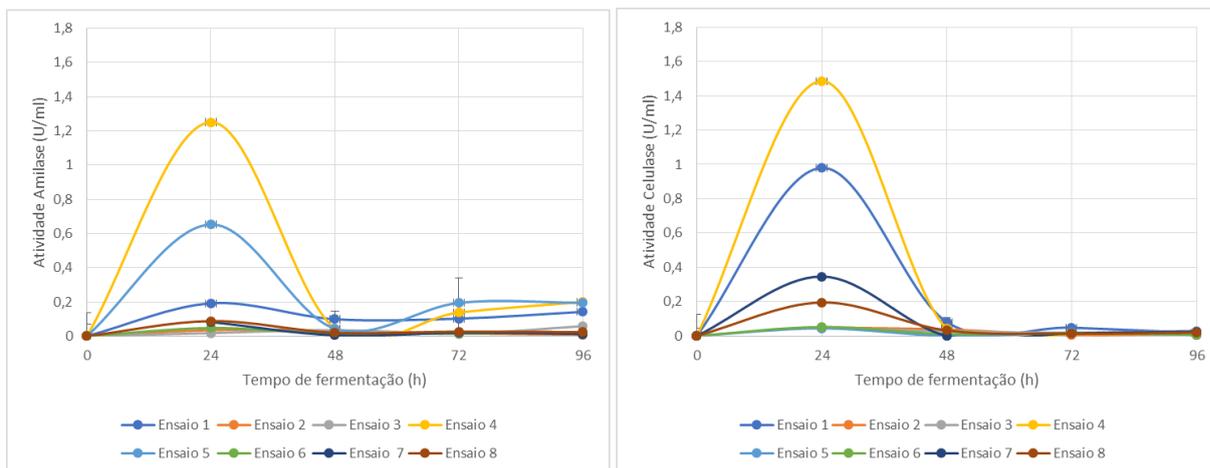
Fonte: a autora, 2018.

Através do acompanhamento das fermentações, observou-se que os grãos de

kefir de água foram capazes de se desenvolver nos meios de cultivo propostos sendo observadas modificações no pH e teor de sólidos solúveis.

O gráfico 3 representa as atividades de amilase e celulase detectada nos extratos enzimáticos retirados do meio de fermentação a cada 24 horas de fermentação.

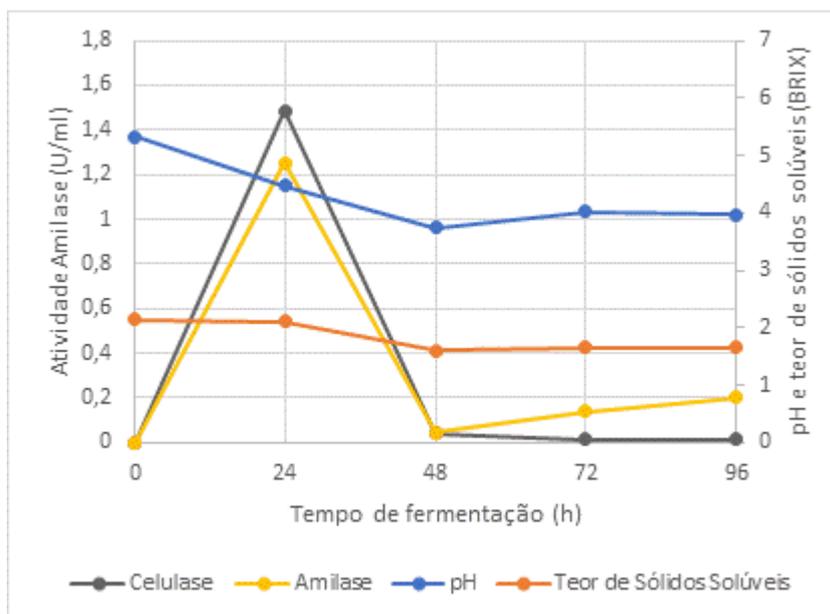
Gráfico 3 – Atividades de Amilase e Celulase nos diferentes ensaios realizados.



Fonte: a autora, 2018.

Observou-se que tanto para a amilase quanto para a celulase, as maiores atividades enzimáticas obtidas ocorreram após 24 horas de fermentação. Os valores quantificados foram similares aos obtidos na fase inicial da fermentação de fungos filamentosos (GOUVÊA, 2013). O meio formulados nos ensaios 4 ( $\frac{1}{2}$  M;  $\frac{1}{2}$  FBV) foi o que apresentou as maiores atividades para ambas enzimas. O gráfico 4 apresenta a cinética de produção das enzimas, pH e teor de sólidos solúveis no meio ao longo do processo fermentativo.

Gráfico 4 - Cinética da fermentação do ensaio 4.



Fonte: a autora, 2018.

Desta forma, as atividades obtidas para as duas enzimas após 24 horas de inoculação foram submetidas à análise do delineamento de misturas simplex-centroide, com 95% de confiança. A tabela 2 apresenta o resultado da análise do delineamento.

Tabela 2 – Modelos significativos para descrever as atividades de amilase e celulase de acordo com a formulação do meio de cultivo utilizando melaço (M), farinha de banana verde (FBV) e farinha de semente de jaca verde (FSJV).

<b>Modelo</b>	<b>Atividade de Amilase (U/ml)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Cúbico especial	$0,192*M+0,04*FBV+0,03*FSJV+4,54*M*FBV+2,18*M*FSJV-20,17*M*FBV*FSJV$	0,95
<b>Modelo</b>	<b>Atividade Celulase (U/ml)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Quadrático	$1,02*M+0,02*FBV+0,02*FSJV+3,23*M*FBV-2,54*M*FSJV$	0,67

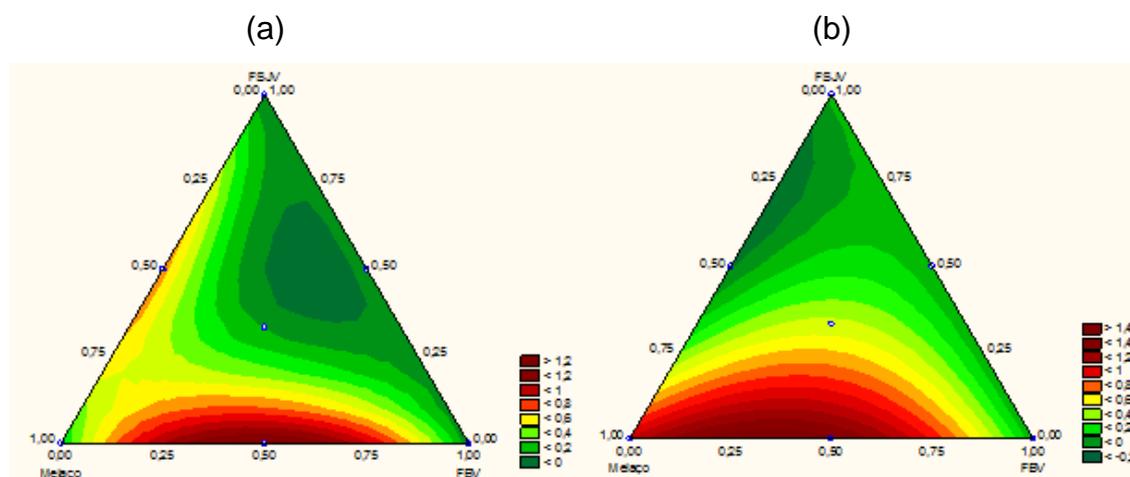
Fonte: a autora, 2018.

Para atividade de amilase o modelo cúbico especial foi significativo, apresentando coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) de 0,95. Desta forma, o modelo é capaz de explicar 95% da variação experimental. Para a atividade de celulase o modelo quadrático foi significativo, no entanto o  $R^2$  foi de 0,67. Embora inferior ao obtido para amilase, considerando esse um processo biológico utilizando meios não homogêneos e grãos de kefir, o resultado foi satisfatório.

A figura 5 apresenta as curvas de contorno para os modelos propostos para a obtenção de amilase e celulase de kefir de água utilizando melaço, farinha de banana

verde e farinha de semente de jaca verde.

Figura 3 – curvas de contorno para os modelos significativos para amilase (a) e celulase (b) obtida da fermentação de kefir de água após 24 horas de fermentação.



Fonte: a autora, 2018.

Desta forma, observa-se que a melhor formulação de meio de cultivo para obtenção tanto da amilase quanto da celulase de kefir de água é aquela composta por melação a 30g/l e farinha de banana verde a 30g/l.

Outras enzimas, tais como as proteases serão avaliadas por outros membros do grupo de pesquisa CIABIO, dando continuidade a este trabalho.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos ensaios realizados e dos parâmetros quantificados, observou-se que os grãos de kefir de água foram capazes de se desenvolver nos meios de cultivo propostos. A produção de amilase e celulase ocorreu no início da fermentação, atingindo resultados interessantes. O meio de cultivo que favoreceu a produção das enzimas foi composto por melação (30g/L) e farinha de banana verde (30g/L).

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.C.A. **Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de

Janeiro, 2012.

BEILEN, J. B. VA., & LI, Z. **Enzyme technology: an overview**. Current Opinion in Biotechnology, v.13 (4), p. 338–344, 2002.

BLANDÓN, L.M., ISLAN, G.A., CASTRO, R.G., NOSEDA, M.D., SOCCOL, V.T., SOCCOL, C.R. **kefir-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 145, p. 706 – 715, 2016.

BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. 2nd ed. Lund: Tetra Pak, 2015.

CASTRO, R.J.S. **Produção, caracterização bioquímica de proteases de *Aspergillus oryzae* e aplicação na hidrólise de proteínas para obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2012.

DOAN, H.V., HOSEINIFAR, S.H., TAPINGKAE, W., KHAMTAVEE, P. **The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Fish & shellfish Immunology, v.62, p. 139-146, 2017.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. Princípios e prática. 2º Edição. Ed Artmed, p 183-205, 602, 2006.

FIORDA, F.A., PEREIRA, G.V. DE MELO, SOCCOL-THOMAZ, V., RAKSHIT, S.K., PAGNONCELLI, M.G.B., VANDENBERGHE, L.P. DE SOUZA, SOCCOL, C.R. **Microbial, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation – A review**. Food Microbiology, v.66. p. 86-95, 2017.

GHASEMLOU, M., KHODAIYAN, F., JAHANBIN, K., GHARIBZAHEDI, S.M.T. **Structural investigation and response surface optimization for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium**. Food Chemistry, v.133, p. 383-389, 2012.

GOUVÊA, P.F. **Estudos genéticos e moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger***. Tese de doutorado apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2013.

GUPTA, R., BEG, Q. K., KHAN, S., & CHAUHAN, B. **An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases**. Applied microbiology and biotechnology, v. 60(4), p. 381–95, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. **Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective**. Process Biotechnol., 38, 1599-1616p. 2003.

HASUNUMA, T., OKAZAKI, F., OKAI, N., HARA, K.Y., KONDO, J.A. **A review of**

**enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology.** *Bioresource Technology*, v.135, p. 513-522, 2013.

HENRISSAT B, TEERI TT, WARREN RA. **A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants.** *FEBS Lett*; v.425 (2), p.352– 354, 1998.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.

KUMAR, D., SINGH, B., KORSTAD, J. **Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bactéria for production of biodiesel and renewable diesel.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.73, p. 654-671, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

LIAO, H.J., HUNG, C.C. **Chemical composition and in vitro starch digestibility of green banana (cv. Giant Cavendish) flour and its derived autoclaved/debranched powder.** *LWT – Food Science and Technology*, v. 64, p. 639 – 644, 2015.

LIBARDI, N., SOCCOL, C.R., NETO, A.G., OLIVEIRA, J., VANDENBERGHE, L.P.S. **Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*.** *Process Biochemistry*, v.57, p.190-199, 2017.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, sept. 2002.

MACEDO, M.G., LACROIX, C., CHAMPAGNE, C.P. **Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus RW-9595M* in a Whey Permeate Based Medium.** *Biotechnol. Prog*, v.18, p. 167 – 173, 2002.

MAEDA, H., ZHU, X., OMURA, K., SUZUKI, S., KITAMURA, S. **Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation.** *BioFacts*, v.22, p. 197 – 200, 2004.

MAITI, B., RATHORE, A., SRIVASTAVA, S. **Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 90, p. 385-395, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.T. **Enzimas.** In: *Bioquímica Básica.* Ed. Guanabara Koogan. 59-88.1999.

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

MONTESANTO, S., CALÒ, G., CRUCIATA, M., SETTANNI, L., BRUCATO, V.B., CARRUBBA, V. **Optimization of Environmental Conditions for Kefiran Production by Kefir Grain as Scaffold for Tissue Engineering.** Chemical Engineering Transactions, v. 49, p. 607-612, 2016.

NELSON, D. L., & COX, M. M. Lehninger, **Principles of Biochemistry** (4th ed., p. 191–202) W.H Freeman and Company, New York, 2005

NIEVES, D.C., RUIZ, H.A., AGUILAR, C.N., ILYINA, A., SALDIVAR, P.R., TORRES, J.A., HERNÁNDEZ, J.L.M. **Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues.** Bioresour Technol., v2(239), p. 430-436, 2017.

OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. **Proteolytic enzyme from Oerskovia sp CK lysing viable yeast cell.** Agricultural and Biological Chemistry. v.41, p.2387-2394, 1977.

OLIVEIRA, A.N., OLIVEIRA, L.A., ANDRADE, J.S., CHAGAS JÚNIOR, A.F. **Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central,** Amazonas, Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.26. p.853-860, 2006.

OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. **Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia.** Acta Amazônica. 40(2) 2010: 401 – 404. 2010.

PADAM, B.S., TIN, H.S., CHYE, F.Y. **Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential.** J. Food Sci Technol, v. 51(12), p. 3527-3545, 2014.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V.T.; Singh, D.; Mohan, R. **Advances in microbial amylases.** Biotechnol. Appl. Biochem., v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. 1994. **Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças.** In.:Fernandes, J. M.; Prestes, A. M.; Picinini, E. C. 1994. Revisão anual de patologia de plantas, 2:1-51.

POROSKE, L.H. **Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 61, p. 1758-1765. 1984.

RODRIGUES, K. L., ARAÚJO, T. H., SCHEEDORF, J.M., FERREIRA, C. de S., MORAES, G. DE O. I., COIMBRA, R.S., RODRIGUES, M. R. **A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents.** Journal of Functional Foods, v.2, p. 58 – 69, 2016.

SAKAI, T. ET AL. **Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and applications.** Advances in Applied Microbiology, v.39, p. 213-294, 1993.

SARAIVA, M. R. M. **Enzimas extracelulares de fungos da família Botryosphaeriaceae.** Dissertação de Mestrado Microbiologia. Universidade de Aveiro. 2009.

SILVA -NEVES, K.C., PORTO, A. L.F., TEIXEIRA, M.F.S. **Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular** *Acta Amazônica*. v.36, p.299 – 306. 2006.

SWAMI, S.B., THAKOR, N.G., HALDANKAR, P.M., KALSE, S.B. **Jackfruit and its many functional components as related to human health: A review**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.11, p.565-576, 2012.

TEUNISSEN, M. J.; CAMP Op den, H. J. M. **Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes**. *Antonie van Leeuwenhoek, Netherlands*, v. 63, n. 1, p. 63-76, jan. 1993.

XU, X. **Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review**. *European Journal of Lipid Science and Technology*. p. 287-303. 2000.