



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

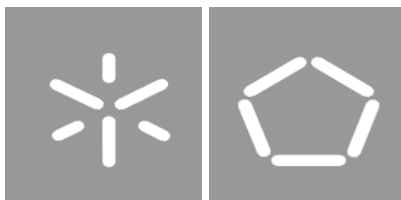
Inês Sá Otimização da fermentação em estado sólido da dreche

Inês Moreira de Sá

Otimização da fermentação em estado sólido da dreche

UMinho | 2022

Outubro 2022



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Inês Moreira de Sá

Otimização da fermentação em estado sólido da dreche

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Engenharia Química e Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor Doutor José António Teixeira

Doutor André Mota

Outubro 2022

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-SemDerivações CC BY-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/>

Agradecimentos

Esta dissertação corresponde ao projeto final do meu mestrado em Engenharia Química e Biológica, etapa importante na minha vida e no meu percurso académico. Assim, quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor José Teixeira pela orientação, apoio e disponibilidade prestada neste projeto.

Agradeço também pela oportunidade de desenvolver esta dissertação com a Colab4Food, em especial, ao meu supervisor Doutor André Mota por toda a ajuda e paciência prestada e também a toda a equipa pelo apoio dado ao longo do estágio e na escrita da dissertação.

À Doutora Sara Silvério do Departamento de Engenharia Biológica, agradeço toda a ajuda prestada quando me senti a navegar em alguns temas relativos ao meu projeto.

Quero deixar também uma palavra de agradecimento aos meus amigos que estiveram sempre comigo ao longo deste tempo.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais, irmão, namorado e família pela motivação e por me mostrarem que com esforço tudo se consegue.

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

Os resíduos e produtos secundários provenientes dos setores agroindustrial e alimentar são considerados potenciais poluentes devido aos problemas de disposição final, sendo necessário encontrar soluções para estes subprodutos, ricos em proteína, minerais, lípidos e hidratos de carbono. A sua valorização tornou-se numa oportunidade para obter novos produtos com valor acrescentado. A fermentação em estado sólido (FES) utiliza resíduos como substratos e através do crescimento microbiano sintetiza novos compostos com interesse industrial e/ou elevado valor nutricional. O presente trabalho visa otimizar a FES da dreche, subproduto da indústria cervejeira, com recurso ao microrganismo *Aspergillus niger* para aumentar o conteúdo proteico da dreche.

Foi utilizado um reator com tambor rotativo em que se estudaram duas concentrações de esporos ($0,5 \times 10^6$ esporos/ml e 1×10^6 esporos/ml), duas humidades iniciais (80 e 70 %), com temperatura constante. Mediu-se a concentração de proteína solúvel (PS) em todos os ensaios e proteína bruta (PB) nos dias de maior concentração de PS. Através da medição da PS foi avaliado o efeito da autoclave em dreche seca e dreche húmida.

Após autoclavar obteve-se maior concentração de PS para a dreche húmida. Foi na FES com maior concentração de esporos que se obteve a maior concentração de PS. Por sua vez, os melhores valores de PS foram obtidos para a humidade de 70 %. Também se analisou o comportamento do *A. niger* nas primeiras 24 h de crescimento e verificou-se que apresentava um crescimento dual, utilizando a hemicelulose e a celulose como fontes de carbono.

Relativamente à proteína bruta (PB), verificou-se um aumento de 9 % para a condição correspondente à humidade de 70 % e concentração 1×10^6 esporos/ml, sendo que as outras condições estudadas não apresentaram uma diferença significativa da PB em comparação com a dreche inicial.

Dentro dos valores considerados para os parâmetros estudados escolheu-se a melhor condição para realizar uma fermentação otimizada em que se verificou um aumento da PB em 1,2 vezes e

da PS em 3,6 vezes, mostrando que o conteúdo proteico da dreche aumenta com a FES. Este trabalho foi realizado em contexto empresarial na Colab4Food.

PALAVRAS-CHAVE

Fermentação em estado sólido; Dreche; Proteína solúvel; Proteína bruta; *Aspergillus niger*

ABSTRACT

The waste and byproducts that come from the agro industrial and food industries are considered pollutants due to problems with their final disposition, so it is important to find solutions for this byproducts, that are rich in protein, minerals, lipids and carbohydrates. Their valorization turned out to be an opportunity to obtain new products with higher value. The solid state fermentation (SSF) uses waste products as substrate and synthesizes new products with the use of microorganisms. The present work aims to optimize the SSF of brewers spent grain (BSG), waste of the beer industry, with the microorganism *Aspergillus niger* for protein enrichment.

It was used a rotary drum reactor and two inoculum sizes were tested ($0,5 \times 10^6$ spores/ml e 1×10^6 spores/ml) alongside with two different moistures (80 and 70 %), with constant temperature. Before these studies the effect of autoclave of BSG before SSF was tested for dry and wet BSG. The concentration of soluble protein (SP) during the process of fermentation and the crude protein (CP) was measured on the days that had the highest concentration of SP.

After the process of autoclave, the best concentration of SP was for the wet BSG. The highest inoculum size got the highest SP concentration. On the other side, the smaller moisture got the best values of SP. The behavior of *A.niger* was also analyzed in the first 24 h of growth and it was possible to verify that it presented a diauxic behavior where there were two carbon sources: hemicellulose and cellulose

For the crude protein (CP) there was an increase of 9 % for the condition of 70 % moisture and inoculum of 1×10^6 spores/ml and the other conditions did not present a significant difference of CP comparing with the initial BSG. With the best condition it was done a optimized fermentation and it was observed an increase of 1.2-fold for CP and 3.6-fold for SP showing the protein increase of BSG with SSF. The present work was conducted as a member of Colab4Food.

KEYWORDS

Solid state fermentation; Brewers spent grain; Soluble protein; Crude Protein; *Aspergillus niger*

Conteúdo

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de integridade.....	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas e siglas.....	xiv
1. Introdução	1
1.1. Motivação e Objetivos.....	1
1.2. Organização da dissertação.....	3
2. Estado de Arte.....	4
2.1. Fermentação.....	4
2.2. Fermentação em estado sólido.....	6
2.2.1. Definição.....	6
2.2.2. Vantagens e desvantagens.....	7
2.2.3. Aplicações.....	9
2.2.4. Reatores e modos de operação.....	9
2.2.5. Processos de purificação do produto fermentado.....	14
2.3. Seleção do microrganismo.....	15
2.4. Seleção do substrato.....	18
2.4.1. Categorias de substratos aptos à FES.....	18
2.4.2. A Indústria Cervejeira como fonte de substrato para a FES.....	18
2.4.3. Dreche.....	19

2.5.	Fermentação da dreche.....	21
2.6.	Produtos alimentares obtidos a partir de dreche	23
2.7.	Desafios para o futuro	26
3.	Materiais e métodos.....	27
3.1.	<i>Aspergillus niger</i> e condições de crescimento	27
3.2.	Determinação do volume de inóculo	27
3.3.	Substrato	28
3.4.	Fermentação em estado sólido	28
3.5.	Determinações analíticas.....	29
3.5.1.	Determinação da humidade inicial	29
3.5.2.	Determinação da proteína solúvel	29
3.5.3.	Determinação da quantidade de azoto	29
3.6.	Otimização das condições de fermentação.....	30
3.7.	Análise estatística.....	30
4.	Resultados e discussão	31
4.1.	Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i>	31
4.2.	Preparação do substrato.....	32
4.3.	Ensaio de fermentação	33
5.	Conclusões e recomendações	46
6.	Referências bibliográficas	48
Anexos	54
Anexo A	– Curva de Calibração	54

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de um reator estático. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).	11
Figura 2. Esquema de um reator de leito fixo. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).	12
Figura 3. Esquema de um reator de leito fluidizado. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006)..	13
Figura 4. Esquema de um reator de tambor rotativo. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).	14
Figura 5. Fases de crescimento de um microrganismo em cultura descontínua. Adaptado de Teixeira & Ferreira, (2003).	15
Figura 6. Reator onde foram colocados os tubos de falcon.	28
Figura 7. Equipamento Foss Kjeltex 8200 auto distillation.	29
Figura 8. Aspeto do <i>Aspergillus niger</i> 10 dias depois de ser incubado.	31
Figura 9. Dreche após o processo de produção do mosto (a) e dreche após o processo de secagem (b).	32
Figura 10. Evolução da proteína solúvel para dreche seca e dreche húmido.	33
Figura 11. Evolução da proteína ao longo dos 7 dias para as duas concentrações de esporos. ...	35
Figura 12. Crescimento microbiológico para as duas concentrações de esporos.	36

Figura 13. Evolução da proteína ao longo dos 7 dias para as duas humidades.	38
Figura 14. Crescimento microbiológico para as duas humidades estudadas.	40
Figura 15. Concentração de proteína ao longo das primeiras 24 horas de crescimento do <i>A.niger</i>	41
Figura 16. Concentração de proteína bruta na dreche inicial e nos testes realizados ao longo deste estudo. O teste 1 corresponde ao estudo da humidade de 80 % e concentração de esporo 1×10^6 esporos/ml, o teste 2 corresponde à humidade de 80 % e concentração de esporo $0,5$ $\times 10^6$ esporos/ml. O teste 3 diz respeito ao teste da humidade de 70 % e concentração de esporo de 1×10^6 esporos/ml. As barras com letras iguais não são estatisticamente diferentes significativamente ($P < 0,05$).	43
Figura A 1. Curva de calibração da biomassa que relaciona a absorvância com a concentração.	54

Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Adaptado de Hongzhang Chen, 2013	6
Tabela 2. Vantagens e respectivas consequências e problemas a resolver. Adaptado de Satari et al., 2016.....	8
Tabela 3. Composição da dreche tendo em conta a literatura disponível. Todos os valores estão descritos em g por 100 g de matéria seca (% p/p). Adaptado de Marcus & Fox, (2021)	20
Tabela 4. Estudos realizados com diferentes microrganismos para valorizar a dreche	22
Tabela 5. Produtos obtido com a fermentação da dreche e respetivo microrganismo. Adaptado de Marcus & Fox, (2021).....	25
Tabela 6. Comparação entre a dreche inicial e a dreche fermentada	45

Lista de Abreviaturas e siglas

μ_{\max}	Taxa de crescimento específica
ATP	Adenosina trifosfato
ABD	Agar batata Dextrose
BSA	Albumina Sérica de Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BSG	Dreche (<i>Brewers spent grain</i>)
EC	Economia circular
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
p/p	Peso por peso
PS	Proteína Solúvel
PB	Proteína Bruta

1. Introdução

1.1. Motivação e Objetivos

Atualmente, o desenvolvimento de processos sustentáveis tem sido um desafio. O crescimento populacional e consumo de energia para a obtenção de alimentos conduziu a uma procura por processos que utilizem fontes renováveis e produzam menor quantidade de resíduos. Os setores agroindustriais e alimentar são dos que produzem uma maior quantidade de resíduos e produtos secundários que são potenciais poluentes devido aos problemas de disposição final e a sua valorização pode ser dificultada pela perda de nutrientes de alto valor ao longo do processo (Trzcinski, 2018).

Estes produtos são considerados precívalos devido aos elevados teores de matéria orgânica e água presentes e à elevada facilidade de contaminação microbiológica. Os subprodutos podem conter diversos nutrientes como proteína, minerais, lípidos e hidratos de carbono, dependendo da matéria-prima e do processo que os originou. Assim, a sua valorização é uma necessidade e também uma oportunidade para obter novos produtos com valor acrescentado e com um impacto positivo na economia das indústrias (Manuela E. Pintado, 2015).

O aproveitamento de resíduos e a sua valorização é, cada vez mais, uma necessidade crescente para as indústrias alimentares, uma vez que a quantidade de resíduos gerada tem vindo a aumentar e é de interesse económico e ambiental transformá-los em produtos com valor acrescentado (Cooray & Chen, 2018).

Existem vários métodos que permitem o reaproveitamento dos resíduos, como por exemplo, a digestão anaeróbia, a compostagem, reciclagem e a incineração energética. Num processo de digestão anaeróbia formam-se dois subprodutos: o biogás, uma fonte de energia renovável, e o biofertilizante, correspondente a uma biomassa que funciona como um adubo natural. A compostagem é um processo natural de reciclagem da parte putrescível dos resíduos sólidos, através de microrganismos que são responsáveis pela degradação da matéria orgânica. Por sua vez, a reciclagem corresponde ao processo de transformação de materiais que podem voltar ao seu estado original ou transformar-se num produto completamente diferente. A incineração é outra forma de aproveitamento dos resíduos que é vantajosa na redução dos volumes e elimina resíduos

patogénicos e tóxicos e produz energia sob a forma de eletricidade ou de vapor de água (Augusto Tavares Russo, 2003).

No aproveitamento de resíduos, estes devem ser reduzidos ao mínimo e deve ser promovido o seu uso alimentar, tanto humano como animal. Em seguida, os resíduos devem ser usados para outros aproveitamentos industriais como a valorização energética ou para compostagem e em último caso, existe a opção do aterro sanitário ou incineração. Para entender o tipo de subproduto deve ser tida em conta a sua origem, que se traduz pela qualidade e sazonalidade da produção (Kuzina & Alimentar, 2014). É cada vez mais comum o uso dos resíduos como biomassa para produzir produtos de valor acrescentado com recurso a microrganismos (Cooray & Chen, 2018).

A procura de bioprocessos que acrescentem o devido valor aos subprodutos levou ao destaque da fermentação em estado sólido, uma vez que utiliza os resíduos como substratos e através do crescimento microbiano sintetiza novos compostos de grande interesse industrial e/ou com um elevado valor nutricional (Thomas et al., 2013).

O conceito de economia circular (EC) revela-se cada vez mais importante, no entanto, parte da comunidade científica considera-o vago porque “significa muitas coisas diferentes para diferentes pessoas” (Kirchherr et al., 2017). Kirchherr et al., 2017 analisaram 114 definições e concluíram que o conceito de EC é identificado como a combinação de reduzir, reutilizar e reciclar. Assim, a EC apresenta soluções para reduzir a quantidade de matérias-primas e outros recursos de entrada, resíduos e emissões, visando manter os fluxos de materiais e energia dentro da economia e sistemas de consumo (D’Amato, 2021)

A fermentação em estado sólido de resíduos provenientes da indústria enquadra-se dentro do conceito de economia circular e, por isso, o objetivo geral desta dissertação é otimizar o processo de fermentação em estado sólido do subproduto dreche, proveniente da indústria cervejeira, para obtenção de um novo produto alimentar.

Pretende-se utilizar o microrganismo *Aspergillus niger* e otimizar o seu crescimento durante a fermentação com a dreche. Por fim, pretende-se projetar a estabilização e caracterização do produto fermentado para perceber qual a melhor forma de o utilizar para obter um produto alimentar novo.

1.2. Organização da dissertação

A presente dissertação contém a seguinte estrutura:

- Introdução: Neste capítulo é feito um enquadramento do processo fermentativo que é abordado ao longo da dissertação, bem como a sua importância atualmente. São abordados os conceitos de aproveitamento de resíduos e economia circular. Além disso, é exposto o objetivo principal da tese.
- Estado de arte: Este capítulo consiste na introdução teórica das temáticas que envolvem o processo em estudo.
- Materiais e métodos: Neste capítulo são explicadas as metodologias utilizadas para realizar o estudo
- Resultados e discussão: Apresenta os resultados obtidos e a respetiva discussão
- Conclusão e Recomendações: Neste capítulo encontram-se as conclusões retiradas no trabalho e são feitas algumas recomendações para futuros estudos.
- Bibliografia e Anexos: Estes dois últimos capítulos são referentes ao material auxiliar e necessário para a realização do trabalho

2. Estado de Arte

Ao longo das últimas décadas a biotecnologia tem-se desenvolvido rapidamente através do aparecimento de novos processos a nível industrial que recorrem a microrganismos (Schürle, 2020). Os processos biotecnológicos têm sido aplicados nas indústrias agroalimentares, farmacêuticas, química fina, de energia e do ambiente (Teixeira & Ferreira, 2003).

Os processos biotecnológicos podem dividir-se em processos de crescimento microbiano e processos catalisados por enzimas (Teixeira & Ferreira, 2003).

Estes processos têm como objetivo a síntese de compostos químicos intracelulares – proteínas – ou extracelulares – antibióticos – a produção de biomassa, de alimentos e energia (Teixeira & Ferreira, 2003).

2.1. Fermentação

A fermentação é definida como um processo bioquímico que consiste na síntese de ATP sem envolver a cadeia respiratória e que funciona em condições anaeróbicas, sendo o aceitador final de eletrões uma molécula orgânica (Kuila & Sharma, 2018).

Este processo utiliza microrganismos para a produção de compostos e pode ser aplicado em várias indústrias como, por exemplo, na produção de energia e nas indústrias farmacêutica, química e alimentar. Esta tecnologia tem sido utilizada desde os tempos antigos para preservar as propriedades dos alimentos e para produção de pão, cerveja, vinagre, iogurte, vinho e queijo (Kuila & Sharma, 2018).

Produtos fermentados têm um prazo de validade elevado e possuem texturas e sabores únicos. A preservação destes produtos deve-se à produção de ácido láctico e de ácidos orgânicos que reduzem o pH e inibem o crescimento de microrganismos patogénicos (Kuila & Sharma, 2018).

Em síntese, um processo fermentativo consiste em quatro etapas:

1. Preparação do meio fermentativo e inoculação
2. Fermentação, etapa em que os microrganismos transformam a matéria-prima no produto que se pretende obter
3. Tratamentos finais, necessários para obter o produto com melhor qualidade
4. Tratamento dos resíduos gerados

O processo de fermentação está distribuído pela natureza e os microrganismos são descritos, desde sempre, como os principais organismos capazes de realizar fermentação. De um ponto de vista biológico, a fermentação consiste num processo que permite a obtenção de energia a partir de moléculas e é comum a todos os seres vivos. A libertação de produtos secundários como os antibióticos e as enzimas é muito comum nos processos fermentativos (Martínez & Espinosa, 2020).

Associado aos processos biotecnológicos está o conceito de cultura pura, que começou a ser utilizado em 1896 a nível industrial, surgindo assim os métodos de assepsia que permitem manter o ambiente puro, ou seja, sem contaminações (Teixeira & Ferreira, 2003). Industrialmente, os métodos de assepsia foram implementados em 1940 e, neste ano, surgiram os primeiros elétrodos esterilizáveis de pH e oxigénio.

Os produtos fermentados sofreram uma evolução desde produtos de baixo valor acrescentado, como o caso do vinagre, para produtos com alto valor acrescentado, que são obtidos por microrganismos geneticamente modificados. Estes organismos são manipulados geneticamente de forma a favorecer características desejadas, como por exemplo a cor e o tamanho (Teixeira & Ferreira, 2003).

A interconexão da tecnologia com o processo fermentativo tornou possível a produção de produtos fermentados a uma escala industrial, em que a qualidade e a segurança do produto estão asseguradas devido ao desenvolvimento e à evolução da biotecnologia e da engenharia (Singhania et al., 2009).

Existem dois tipos de fermentação: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES).

Estes processos apresentam várias diferenças, como mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1. Comparação entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Adaptado de Hongzhang Chen, 2013

Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
O conteúdo de água do substrato é baixo	Água é o componente principal do meio de cultura
Existe um gradiente de concentração de nutrientes	Não existe gradiente de concentração de nutrientes
A área de superfície para inoculação é grande	A área de superfície para inoculação é pequena
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia
Os microrganismos penetram no substrato sólido	Os microrganismos distribuem-se uniformemente à superfície do líquido
Taxa de produção e rendimento elevados	Taxa de produção e rendimento baixos
Mistura difícil	Mistura fácil
Heterogeneidade	Homogeneidade
Baixa atividade de água	Elevada atividade de água
Matéria-prima barata	Matéria-prima cara

Nesta dissertação será abordada a FES, como foi referido no capítulo da 1.Introdução.

2.2. Fermentação em estado sólido

2.2.1. Definição

A FES é um bioprocesso de fermentação na qual os microrganismos crescem em material sólido na presença de uma baixa quantidade de água livre, através de um suporte sólido que pode ser um substrato natural ou inerte (Pandey et al., 2000).

O objetivo da FES é a utilização de substratos sólidos como fonte de carbono e azoto para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos para a obtenção de um produto fermentado com valor acrescentado (Hongzhang Chen, 2013).

A seleção apropriada de um microrganismo tendo em conta a composição química do substrato, a otimização dos parâmetros cruciais à FES como a temperatura, pH, arejamento, humidade, rácio C/N e altura do leito fermentativo assim como a purificação do produto final são pontos essenciais ao sucesso deste processo (Singhania et al., 2009).

Neste processo existem três pontos cruciais: o objetivo pretendido com a fermentação, a escolha do microrganismo e a escolha do ambiente a que o microrganismo é sujeito (Chen, 2013).

Assim, o objetivo desta dissertação corresponde à otimização do processo fermentativo de forma a obter um produto nutricionalmente enriquecido.

A fermentação em estado sólido oferece várias oportunidades no processamento de resíduos agroindustriais porque requer pouca energia, baixa concentração de água e não origina tanto desperdício (águas residuais) como o processo de fermentação em meio líquido, logo é menos poluente (Pandey et al., 2000).

2.2.2. Vantagens e desvantagens

O facto de ser possível produzir produtos com valor acrescentado através de resíduos a baixo custo industrial traduz-se numa mais-valia (Hongzhang Chen, 2013).

A fermentação em estado sólido é vantajosa, uma vez que requer uma baixa quantidade de água, diminuindo o desperdício, forma elevadas concentrações de produto final, a repressão catabólica é baixa e os resíduos podem ser utilizados sem qualquer tipo de pré-tratamento, traduzindo-se numa vantagem em comparação com a FS que precisa sempre de pré-tratamento para hidrolisar os polissacarídeos e obter açúcares simples fermentáveis.

Além disso, contrariamente ao que acontece na FS, na FES existe uma simulação de um ambiente natural que melhora o desempenho dos microrganismos. Além disso, existe uma elevada produtividade e a energia necessária para aquecer, assim como os custos de operação, são baixos (Singhania et al., 2009).

No entanto, existem obstáculos como o aumento de escala devido a dificuldades em controlar certos parâmetros como o calor e a transferência de massa (Trzcinski, 2018).

Durante o processo, gera-se uma elevada quantidade de calor que, conseqüentemente, leva a uma redução da atividade metabólica do microrganismo.

A temperatura é um parâmetro crítico porque afeta o crescimento do microrganismo, a formação e germinação de esporos e a formação do produto final (Pandey, 2003).

Humidades muito elevadas levam a uma redução da porosidade do substrato, que como consequência impede a penetração de oxigénio, podendo levar a uma contaminação por bactéria. Por outro lado, baixas humidades levam a uma fraca acessibilidade de nutrientes e impedem o crescimento adequado dos microrganismos (Pandey, 2003).

Os materiais sólidos utilizados têm condutividades térmicas baixas e por isso a remoção de calor durante o processo torna-se muito lenta (Pandey, 2003).

Assim, existe acumulação de calor, que leva à desnaturação do produto final (Pandey, 2003). Parâmetros como a temperatura, pH, humidade e concentração de substrato são difíceis de controlar devido à baixa disponibilidade de água neste processo (Satari et al., 2016).

Tendo em conta as vantagens, consequências e os problemas a serem resolvidos Satari et al. (2016) apresentou uma tabela sucinta, que está adaptada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Vantagens e respetivas consequências e problemas a resolver. Adaptado de Satari et al., 2016

Vantagens	Consequências	Problemas a ser resolvidos
Baixa quantidade de água requerida	Menos desperdício de água	Criação de gradientes de humidade
Elevada concentração de produto final	Baixos custos de purificação	—
Baixa repressão catabólica	Fermentação na presença de glucose	—
Utilização de um substrato sólido	Concentrações elevadas do crescimento de substratos	Criação de gradientes de humidade e de pH
Suporte sólido para os microrganismos simulando um ambiente natural	Melhor performance dos microrganismos	—
Produtividade de volumes elevada	Volumes fermentados mais reduzidos	—
Baixa energia requerida para aquecer	—	Criação de gradientes de temperatura
Aeração fácil	Fontes de carbono abundantes	—

Outra desvantagem da fermentação em estado sólido é a falta de métodos que caracterizem o crescimento dos microrganismos durante o processo.

2.2.3. Aplicações

A fermentação em estado sólido tem sido usada ao longo dos anos para produzir alimentos através de fungos. Um exemplo é o processo fermentativo através de *Aspergillus oryzae* para produção de arroz e o uso de *Penicillium roquefortii* para produção de queijo. Atualmente existem vários bioprocessos em que a FES pode ser utilizada, como a biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação de colheitas para aumento nutricional e para a produção de produtos com valor acrescentado (Krishna, 2005).

A maioria das enzimas são produzidas através de FES. Os ácidos orgânicos como o ácido cítrico, ácido fumárico e ácido láctico também são produzidos por FES. Através de FES também são produzidos antibióticos como a penicilina (Krishna, 2005).

2.2.4. Reatores e modos de operação

Nos processos de fermentação, os biorreatores fornecem o ambiente necessário ao crescimento dos microrganismos e existem vários fatores que afetam este crescimento, como a temperatura, o tipo de substrato, o tamanho do reator, a aeração e a taxa de arrefecimento (Bhargav et al., 2007).

Em qualquer tipo de biorreator existem 5 fatores que limitam a performance do processo fermentativo: humidade, transferência de oxigénio, transferência de dióxido de carbono, transferência de calor e o próprio reator. O tipo de reator utilizado na fermentação em estado sólido depende do substrato (Abdul Manan & Webb, 2018).

No processo fermentativo o reator tem quatro tarefas importantes: sustentar o substrato, manter os microrganismos, proteger o meio contra contaminações e controlar as condições do ambiente de forma a otimizar o crescimento do microrganismo e a formação do produto pretendido (Abdul Manan & Webb, 2018).

Um reator deve ser capaz de prevenir a contaminação dos microrganismos, tanto quanto possível, manter a temperatura e humidade adequadas para o processo fermentativo, fornecer oxigénio suficiente aos microrganismos aeróbicos, fornecer um ambiente anaeróbico para os

microrganismos anaeróbicos, facilitar a extração dos produtos fermentados e distribuir o material da forma mais semelhante possível (Hongzhang Chen, 2013).

Existem três modos de operação com que os reatores podem operar: descontínuo (batch), contínuo e semicontínuo (Kadic & Heindel, 2014).

Tendo em conta o tipo de aeração existem 4 tipos de reatores: reator em tabuleiro, reator de leito fixo, reator de leito fluidizado e reator de tambor rotativo (Hongzhang Chen, 2013).

O reator em tabuleiro (*tray reactor*) é o tipo de reator mais simples e pode ser feito de madeira, plástico ou metal. Este reator consiste numa câmara com prateleiras planas, onde circula o ar, com temperatura e humidade controladas, como mostra a **Figura 1**. Normalmente, as prateleiras estão colocadas umas acima das outras, com espaço entre elas, e o substrato encontra-se espalhado, por camadas, em cima das prateleiras.

Antes da fermentação ser iniciada, as prateleiras são autoclavadas, arrefecidas e inoculadas para depois serem colocadas na câmara onde decorre a fermentação. Os parâmetros de humidade, aeração e temperatura são regulados e, depois da fermentação, os sólidos são recolhidos, dando início às operações de purificação. Estes reatores requerem quantidades elevadas de prateleiras e conseqüentemente maior volume, tornando-se desvantajoso para processos à escala industrial (Krishna, 2005).

Segundo a patente Seiskari, (2006) estes reatores são inoculados depois da esterilização através de um spray que espalha o inóculo líquido na superfície de cada prateleira ou mergulhando o conteúdo do reator numa suspensão que contém o microrganismo.

A operação de um reator em tabuleiro requer custos elevados de mão de obra porque cada prateleira deve ser preenchida e limpa manualmente.

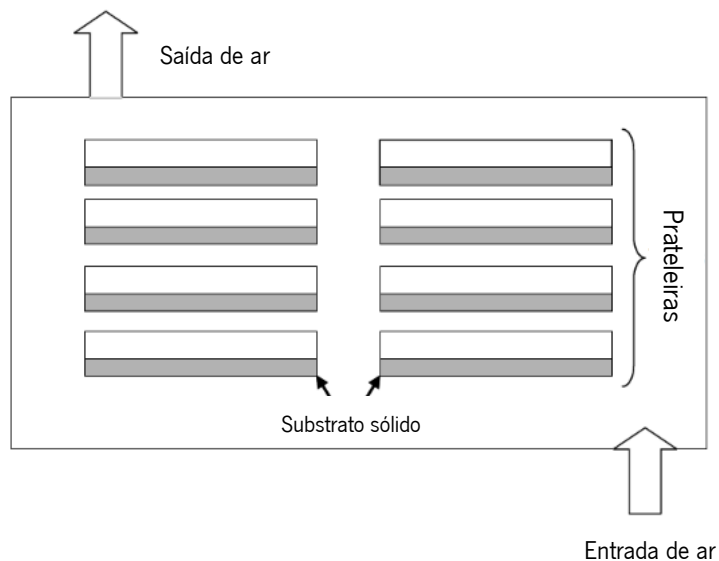


Figura 1. Esquema de um reator estático. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).

Um reator de leito fixo (*packed bed reactor*), **Figura 2**, consiste numa coluna cilíndrica onde o substrato se encontra retido na base, que é perfurada, e existe circulação de ar forçado permitindo aeração. É um reator em que o meio reacional se encontra normalmente em fase líquida ou gasosa e existe um catalisador na fase sólida, sendo o principal objetivo promover o contacto entre as fases envolvidas. Neste tipo de reatores a produção de calor durante o processo fermentativo é uma limitação, mas a redução do conteúdo de água permite o endurecimento do substrato (Krishna, 2005).

Os reatores de leito fixo são vantajosos porque são reatores simples que permitem um controlo do processo melhorado, uma cama de substrato mais larga e mantêm as condições assépticas. Após a fermentação, a coluna do reator pode ser utilizada para recuperação do produto (Couto & Sanromán, 2006).

Este tipo de reator pode desligar-se antes do tempo previsto quando estão a ser processados fluídos que contêm sólidos suspensos porque levam a uma diminuição de pressão repentina causando problemas de ligação. (Kramer, 1985).

Além disso, os microrganismos produzem calor levando a um aumento da temperatura e consequentemente o seu crescimento diminui. Existe, também, uma constante aeração que acaba por secar o substrato, que também afeta o crescimento dos microrganismos (Kramer, 1985).

Na patente Seiskari, (2006) foi criado um reator de leito fixo inovador para ser utilizado em cultivações assépticas de culturas puras. O uso de vibração externa no sólido, que se encontra dentro do reator, permite o controlo do meio assepticamente.

O tamanho e a forma do reator podem variar tendo em conta o tipo de cultura e o material utilizado, mas o reator é preferencialmente cilíndrico, cónico ou angular. Existe um separador que pode ser estático numa determinada posição, dividindo o compartimento do reator em volumes fixos. Para que a operação decorra corretamente, o reator deve ser colocado de cima para baixo, depois de ser adicionado o substrato (Kramer, 1985).

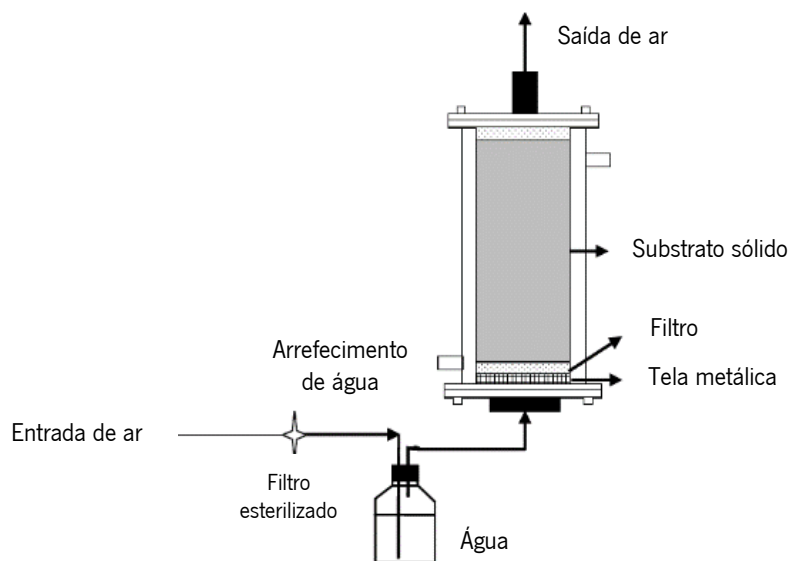


Figura 2. Esquema de um reator de leito fixo. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).

Num reator de leito fluidizado, apresentado na **Figura 3**, o fluido passa através de material sólido granulado, que é geralmente um catalisador, com velocidade elevada de forma a ser possível suspender o material sólido forçando-a a comportar-se como se fosse um fluido. Assim, neste tipo de reator existe uma agitação continua com ar forçado (Couto & Sanromán, 2006).

O material do substrato sólido passa por um distribuidor, que consiste numa placa porosa, e o fluido é forçado através da mesma placa para cima, atravessando o sólido (Couto & Sanromán, 2006).

Se as velocidades de fluido forem mais baixas, os sólidos não se movem e o fluido passa pelos espaços vazios do material. Com o aumento da velocidade do fluido, a força deste sobre os sólidos é suficiente para equilibrar o peso do material (Couto & Sanromán, 2006).

A principal desvantagem deste reator é o facto de o calor acumulado afetar negativamente o rendimento do produto final (Couto & Sanromán, 2006).

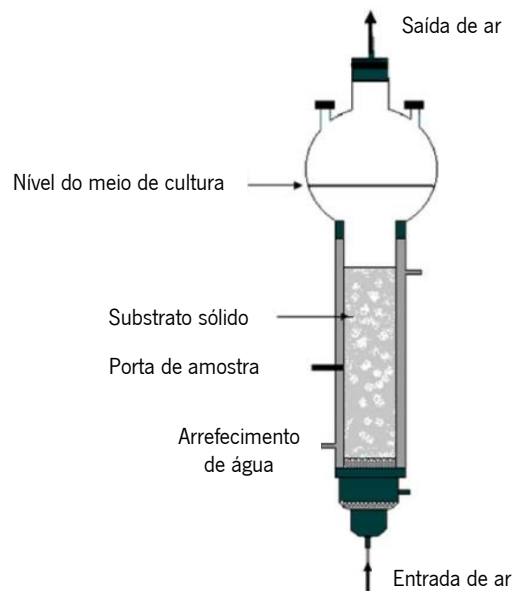


Figura 3. Esquema de um reator de leito fluidizado. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).

O reator de tambor rotativo permite uma aeração e mistura de substrato adequadas, o que limita os danos causados ao inoculo ou ao produto final. A mistura é conseguida através da rotação do tambor e das chicanas internas que envolvem o substrato.

O ar encontra-se saturado e percorre o tambor longitudinalmente para que haja um contacto intenso entre a fase sólida e a fase líquida. No entanto, o tambor só pode estar cheio a 30 % da sua capacidade, para que a sua mistura seja eficiente (Singhania et al., 2009).

O esquema deste tipo de reator encontra-se na **Figura 4**.

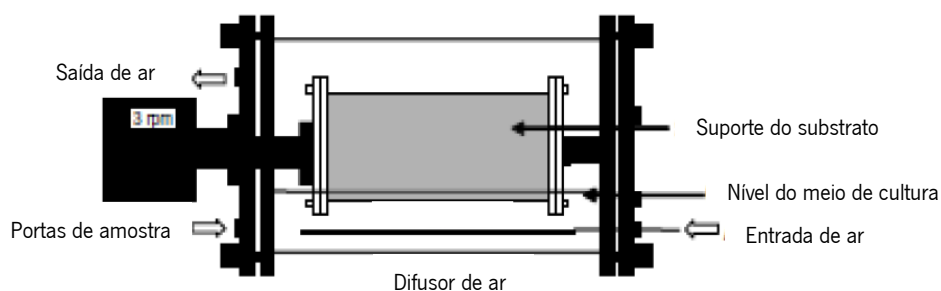


Figura 4. Esquema de um reator de tambor rotativo. Adaptado de Couto & Sanromán, (2006).

Este tipo de reator favorece a difusão de oxigênio no interior do meio de cultivo e a dissipação do calor e de gases que advêm do metabolismo microbiano (Couto & Sanromán, 2006).

2.2.5. Processos de purificação do produto fermentado

Os processos de downstream correspondem à purificação do produto fermentado.

Para processos de fermentação de misturas como compostos e silagens, os produtos finais não necessitam de ser esterilizados e podem ser utilizados diretamente, mas os produtos usados nas indústrias alimentar, farmacêutica e química têm de ser esterilizados (Hongzhang Chen, 2013).

Durante a fermentação existe a possibilidade de ocorrer uma contaminação e, por isso, o processo deve ser analisado em detalhe para identificar a fonte de contaminação e determinar as medidas necessárias para garantir a segurança da fermentação. Pode ocorrer, por exemplo, contaminação do meio, devido a falhas no equipamento de esterilização ou no tempo e temperatura de esterilização. A cultura também pode ser contaminada e pode ser devido a erros nas técnicas de assepsia ou falta de higiene. Uma esterilização do ar incompetente pode levar a que o sistema de ar fique contaminado. O processo fermentativo também pode ser contaminado devido a processos de limpeza inadequados (Hongzhang Chen, 2013).

Em processos de fermentação em estado sólido a contaminação é comum, mas se a operação for controlada, a contaminação também poderá ser controlada, sendo considerada inofensiva. As boas práticas da fermentação em estado sólido incluem o controlo da atividade de água do substrato, o aumento da quantidade de inoculação, ajuste dos valores de pH e arrefecimento (Hongzhang Chen, 2013).

2.3. Seleção do microrganismo

Na fermentação em estado sólido, o microrganismo catalisa nutrientes e sintetiza os metabolitos secundários. Existem duas categorias para a fermentação em estado sólido, tendo em conta o microrganismo: processo de cultura pura ou processo de cultura impura (Krishna, 2005).

Processos com cultura impura controlam a população de microrganismos através do controlo das condições do ambiente, como a humidade e a temperatura. No entanto, a existência de vários microrganismos diferentes torna a escolha do substrato complicada uma vez que, cada microrganismo tem a sua necessidade e, além disso, a existência de vários microrganismos diferentes leva a que estes assumam diferentes funções. Pelo contrário, o uso de apenas um tipo de microrganismo em processos de cultura pura permite um controlo mais facilitado (Chen, 2013).

Numa cultura descontínua, durante o crescimento de um microrganismo é possível observar diferentes fases de crescimento, que estão apresentadas na **Figura 5**.

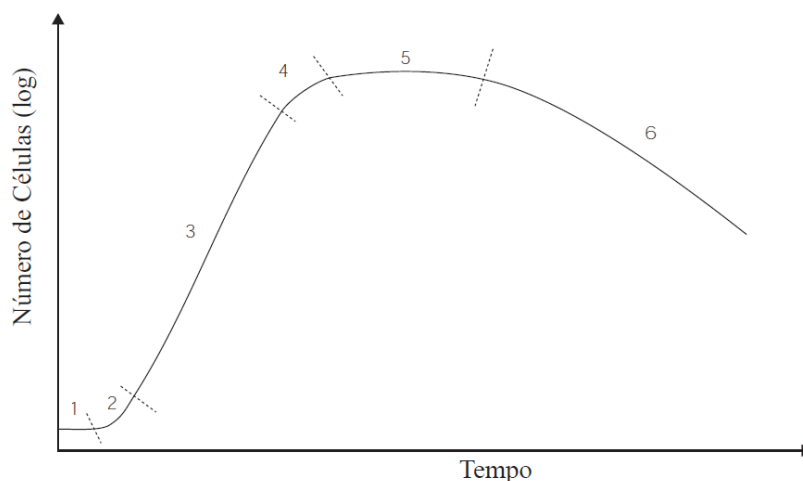


Figura 5. Fases de crescimento de um microrganismo em cultura descontínua. Adaptado de Teixeira & Ferreira, (2003).

A primeira fase, denominada de fase de latência (1), decorre depois da inoculação e não apresenta qualquer tipo de crescimento e, é seguida, da fase de aceleração (2). A terceira fase corresponde à fase de crescimento exponencial (3) em que se verifica um crescimento rápido do microrganismo que depois passa para uma fase de desaceleração (4). Em seguida, atinge-se a fase estacionária (5) em que se atinge um tamanho de população máximo. A última fase é a morte celular (6) (Teixeira & Ferreira, 2003).

Num processo com crescimento microbiano, o objetivo é minimizar a fase de latência e maximizar a fase exponencial e a taxa de crescimento do microrganismo (Teixeira & Ferreira, 2003).

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares ou filamentosos, haploides, com parede celular e com ausência de plastos. Um fungo pode ter origem nos esporos ou nos conídios e para germinarem necessitam de humidade e calor. Uma vez germinados ocorre a formação de filamentos finos – hifas – que se ramificam em todos os sentidos e formam uma camada filamentosa, denominada de micélio, que é responsável pelo desenvolvimento do fungo e pela absorção dos alimentos (Lima et al., 2019).

Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis à fermentação em estado sólido porque são capazes de crescer com pouca água, baixos valores de pH e na presença de vários sólidos. Adicionalmente, durante o seu crescimento produzem hifas, favorecendo a colonização do meio. A principal vantagem do uso de fungos filamentosos é a sua capacidade de penetrar dentro do substrato, permitindo o aproveitamento dos nutrientes internos e conseqüentemente diminuindo a área para processos de difusão. Isto é importante no final da fermentação porque os nutrientes à superfície do substrato são limitados. Além disso, produzem várias enzimas hidrolíticas que degradam macromoléculas presentes no substrato e os esporos produzidos são fáceis de armazenar, podendo ser utilizados novamente noutra processo fermentativo (Krishna, 2005)

Neste projeto pretende-se analisar o crescimento do microrganismo *Aspergillus niger*. O género do *Aspergillus* é um dos mais comuns e mais estudados dos fungos filamentosos. As espécies deste género estão distribuídas mundialmente e podem estar presentes na água e no ar, em organismos vegetais e animais.

A. niger é um fungo filamentoso que cresce aerobicamente em matéria orgânica e é uma das espécies mais comuns do género *Aspergillus* (Schuster et al., 2002). *A. niger* cresce com temperaturas de 6 °C a 47 °C, sendo a temperatura ótima de 30 a 37 °C. Para o seu crescimento ótimo, a atividade da água não deve ultrapassar os 0,88 e o pH varia entre os 1,4 e os 9,8, sendo 6 o pH ótimo. Os seus esporos fornecem a proteção necessária contra a luz do sol e radiação ultravioleta, traduzindo-se numa vantagem em comparação com outros microrganismos (Lima et al., 2019).

Este microrganismo é um dos mais importantes na área da biotecnologia, tendo vindo a ser utilizado durante várias décadas para produzir enzimas e ácido cítrico. Além disso, é utilizado para o tratamento de resíduos. *A. niger* captou a atenção, pela primeira vez, em 1919 quando a sua capacidade para produzir ácido cítrico foi explorada industrialmente.

Desde 1960 este microrganismo tem sido uma fonte para várias enzimas que são importantes para a indústria alimentar (Schuster et al., 2002). *A. niger* é considerado um microrganismo promissor para a fermentação em estado sólido porque aumenta o conteúdo proteico (Carvalho Do Santos et al., 2015). Existem estudos que mostram o aumento de proteína como o estudo de Vandenberghe et al. (2000) em que com a produção de ácido cítrico também foi analisada a proteína e verificou-se o seu aumento.

A utilização deste microrganismo é vantajosa porque este fungo é fácil de manipular, tem capacidade de fermentar várias matérias-primas com baixo custo e permite produzir elevadas quantidades de produto (Carvalho Do Santos et al., 2015).

Além disso, *A. niger* é considerado não patogénico e não tóxico, o que faz com que seja geralmente reconhecido como seguro (GRAS) e por isso, o seu uso tem um impacto positivo na indústria alimentar (Carvalho Do Santos et al., 2015).

Na fermentação em estado sólido os microrganismos apenas conseguem usar pequenas moléculas de açúcar, como a glucose (monossacarídeo), e não podem transportar macromoléculas diretamente para as células. Processos como o esmagamento e aquecimento permitem a hidrólise do substrato pelos microrganismos (Stuedler et al., 2019).

As alterações do ambiente são determinadas pelo calor e água provenientes do crescimento dos microrganismos. O crescimento e metabolismo dos microrganismos são afetados pela transferência de massa e calor do substrato. Por sua vez, o substrato pode sofrer alterações da estrutura e das suas propriedades físicas devido ao crescimento dos microrganismos. Desta forma, considera-se que existe uma relação entre as três variáveis: variáveis do ambiente (pH, temperatura, oxigénio e atividade da água), crescimento e metabolismo dos microrganismos, composição e propriedades físicas do substrato (Hongzhang Chen, 2013).

2.4. Seleção do substrato

2.4.1. Categorias de substratos aptos à FES

A FES requer substratos com recursos essenciais para suportar o crescimento e metabolismo dos microrganismos. No entanto existe uma grande diversidade de matérias-primas de baixo custo com características adequadas para serem utilizadas com substrato em FES atuando como suporte para o crescimento microbiano e fonte de carbono e azoto, reduzindo os custos de produção (Hongzhang Chen, 2013).

Os substratos utilizados costumam ser subprodutos ou resíduos de outros processos e, por isso, podem dividir-se em várias categorias, como os farelos, cascas, bagaços, entre outros. Estes materiais são considerados viáveis para biotransformação e são recursos naturais renováveis que são produzidos em grandes quantidades, podendo traduzir-se num problema ambiental. Desta forma, a sua reutilização tem sido cada vez mais explorada (Hongzhang Chen, 2013).

Denominam-se materiais heterogéneos porque são compostos por celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, que servem como fonte de carbono e energia, assim como de suporte para o crescimento microbiano (Hongzhang Chen, 2013).

O farelo é a matéria-prima mais usada na fermentação em estado sólido e para ser utilizado, muitas vezes, é necessário proceder a um pré-tratamento, sendo os processos mais comuns o esmagamento e cozedura. O esmagamento consiste em reduzir o tamanho das partículas do substrato de forma a aumentar a uniformidade das partículas e a área de superfície. O processo de cozedura facilita a degradação das macromoléculas (Hongzhang Chen, 2013).

A dreche (Brewers spent grain, BSG) é um subproduto da indústria cervejeira que representa cerca de 85 % dos resíduos de cerveja e é obtido principalmente como um resíduo sólido após a produção do mosto no processo de fermentação (Pinheiro et al., 2019).

2.4.2. A Indústria Cervejeira como fonte de substrato para a FES

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo, em conjunto com o chá, as bebidas carbonatadas, o café e o leite. Em Portugal o volume de cerveja consumida em 2020 foi 46 L/capita (Conway, 2022).

A matéria-prima utilizada na produção de cerveja é a cevada maltada, mas algumas cervejarias também utilizam outros tipos de cereais como o trigo e o milho (Olajire, 2012).

A fermentação da cevada consiste na conversão dos açúcares dos grãos de cevada em álcool, sendo a fermentação a principal etapa do processo. Na fermentação são utilizados lúpulos, água e leveduras, sendo que para produzir cerveja são necessárias elevadas quantidades de energia elétrica, combustível e água (Olajire, 2012).

Além de haver uma grande produção de cerveja, há também a geração de subprodutos. Gera-se uma elevada quantidade de água residual. Os resíduos sólidos gerados são a dreche, o trub, terra de diatomácea e o resíduo de levedura. A dreche é um resíduo que é gerado na etapa de produção de mosto. A terra de diatomácea advém do processo de filtração e é constituída por água e substâncias orgânicas, sendo considerada perigosa devido às quantidades elevada que são geradas no processo cervejeiro. O resíduo de levedura advém da maturação e fermentação da cerveja, contendo um teor elevado de proteínas e vitamina B (Olajire, 2012).

2.4.3. Dreche

Segundo Pinheiro et al. (2019) as cervejarias na Europa geram cerca de 3,5 milhões de toneladas de BSG por ano.

BSG é uma biomassa lignocelulósica que é constituída por fibra, lignina, celulose, hemicelulose, vitamina, minerais e proteína (Pinheiro et al., 2019).

Este resíduo consiste na casca de grão da cevada obtida depois do processo de preparação do mosto, sendo que a quantidade de cada um dos compostos depende do tempo de colheita e uso dos grãos, do processo de maltagem e moagem e da quantidade e qualidade dos aditivos utilizados no processo (Aldana et al., 2021).

Normalmente, a dreche apresenta altos valores de teor de humidade e de carbono, hemicelulose, lignina, celulose e compostos fenólicos e teor reduzido de cinzas (Aldana et al., 2021).

A **Tabela 3** apresenta os dados relativos à composição química da dreche, existente na literatura.

Tabela 3. Composição da dreche. Todos os valores estão descritos em g por 100 g de matéria seca (% p/p). Adaptado de Marcus & Fox, (2021)

Componente	Valores (%)
Proteína	10,0 – 26,7
Lípidos	3,0 – 10,6
Carboidratos	1,0 – 13,0
Cinzas	1,2 – 4,6
Compostos fenólicos	0,7 – 2,0
Lignina	11,9 – 22,0

A dreche também é composta por minerais, vitaminas e aminoácidos. Os minerais existentes neste resíduo são o cálcio, cobalto, ferro, cobre, magnésio, fósforo, potássio, selênio e sódio, todos em concentrações abaixo dos 0,5 % p/p. O seu conteúdo em vitaminas consiste em biotina, colina, ácido fólico, niacina, entre outras (Mathias et al., 2015).

Este subproduto é valioso devido ao seu conteúdo em açúcares fermentáveis que são a fonte de alimento dos fungos e, por isso, tem elevado potencial para ser valorizado. Segundo Celus et al. (2007) a dreche contém o mesmo tipo de proteínas que a cevada e o malte (correspondentes ao material de onde vem a dreche) e cerca de 65 % p/p das proteínas do malte encontram-se na dreche e as restantes 35 % estão presentes no mosto.

As proteínas da cevada são divididas em quatro grupos, tendo em conta a solubilidade: as albuminas que são solúveis em água, as globulinas (solúveis em sais diluídos), prolaminas (solúveis em misturas de álcool com água) e as glutelinas (solúveis em meio alcalino).

As albuminas e as globulinas são as principais proteínas metabólicas dos grãos de cereais, sendo que as albuminas correspondem a cerca de 11 % p/p das proteínas da cevada e as globulinas correspondem a cerca de 15 % p/p. As prolaminas também podem ser chamadas hordeínas e correspondem a cerca de 37 % p/p das proteínas totais da cevada. As glutelinas constituem cerca

de 30 % p/p das proteínas da cevada e são as proteínas menos estudadas porque requerem condições de extração extremas, com solventes agressivos (Celus et al., 2007). Na dreche, as prolaminas encontram-se em maior quantidade e fazem com que este resíduo seja rico em glutamina e ácido glutâmico (Celus et al., 2007).

A humidade da dreche, normalmente, ronda os 75 - 80 % e, devido a esta quantidade elevada e ao conteúdo de açúcares fermentáveis, este resíduo é instável e deteriora-se rapidamente por causa da sua atividade microbiana. Assim, para poder utilizar a dreche é necessário conservá-la e uma das técnicas mais utilizadas é o processo de secagem que leva à redução do volume e dos custos de transporte e armazenamento, permitindo manter este resíduo à temperatura ambiente (Santos Mathias et al., 2015).

Geralmente, a dreche é utilizada para alimentar os animais, tanto em base seca como em base húmida, mas a sua reutilização através da fermentação em estado sólido com microrganismos permite o aumento do seu conteúdo nutritivo, o que torna este resíduo numa alternativa que visa a sustentabilidade e a produção de produtos novos comerciais (Canedo et al., 2016).

Além disso, a dreche tem potencial energético e, por isso, está a ser investigada a produção de biogás a partir deste resíduo. O seu valor enzimático e a quantidade abundante em ácidos fenólicos remetem para um potencial biotecnológico. Este resíduo é composto por β -glucanos, que é atrativo para a área médica, principalmente para tratamento de problemas gastrointestinais (Aldana et al., 2021).

Assim, apesar da utilidade mais comum da dreche ser para alimentação animal, mais precisamente de gado, o aumento dos estudos e testes laboratoriais permitiu concluir que o valor da dreche pode aumentar com a utilização de microrganismos, o que leva à descoberta de novas utilidades deste resíduo da indústria cervejeira, tornando possível a síntese de novos produtos (Marcus & Fox, 2021).

2.5. Fermentação da dreche

Atualmente, diversos estudos analisam o potencial de vários microrganismos para valorizar a dreche através de fermentação em estado sólido, dando origem a produtos novos de valor acrescentado.

Tendo em conta alguns destes estudos foi possível construir a **Tabela 4** que mostra o microrganismo utilizado, em cada estudo, bem como as condições de temperatura e de tempo escolhidas.

Tabela 4. Estudos realizados com diferentes microrganismos para valorizar a dreche

Microrganismo	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Referência
<i>Rhizopus sp</i>	30	192	(Ibarruri et al., 2019)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	37	72	(Cooray & Chen, 2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	37	48	(Tan et al., 2019)
<i>Aspergillus oryzae</i>	28	840	(Ogunjobi et al., 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	30	144	(Sousa et al., 2018)

Comprovou-se que o processo fermentativo leva ao aumento do conteúdo proteico (total e solúvel) da dreche. Para avaliar o efeito da FES na composição da dreche é necessário fazer uma caracterização físico-química antes e depois da fermentação.

Os fungos filamentosos têm sido utilizados na produção de alimentos e bebidas fermentadas. Cooray & Chen, (2018) analisaram a fermentação da dreche com recurso ao microrganismo *Rhizopus oligosporus*, de forma a produzir um produto de valor acrescentado. O processo fermentativo demorou 72 horas a uma temperatura de 37 °C, como mostra a **Tabela 4** e foram recolhidas amostras a cada 24 horas. Após os 3 dias de fermentação, o conteúdo da dreche alterou-se, tendo havido um decréscimo no conteúdo em gordura, nas fibras e no conteúdo em açúcares. A redução de gordura pode ser devido à hidrólise das lípases, produzidas durante o processo fermentativo de fungos. A redução de fibras pode ser uma consequência da degradação através da pectinase e da celulase, produzidas também durante a fermentação. Por sua vez, a produção de invertase leva à hidrólise da sacarose em frutose e glucose, ou seja, transforma os dissacarídeos em açúcares simples que podem ser consumidos pelo fungo. Neste estudo, foram observados valores elevados de aminoácidos, ácido cítrico, vitamina e antioxidante na dreche fermentado, o que permitiu concluir que a fermentação, de facto, aumenta o valor nutricional deste

resíduo da indústria cervejeira conferindo-lhe potencial para ser utilizado na alimentação e produção de produtos de valor acrescentado.

O estudo realizado por Sousa et al. (2018) teve como objetivo estudar o efeito da FES no valor nutricional de resíduos das indústrias cervejeira e vinícola, tendo sido testados três fungos e quatro resíduos diferentes. Foi avaliado o efeito do crescimento dos microrganismos e a relação entre os microrganismos e a composição do substrato. Os fungos utilizados foram o *A. niger*, *A. uvarum* e *A. ibericus*, com um processo fermentativo a uma temperatura de 30 °C, durante 6 dias. Verificou-se que a dreche antes de fermentado já tinha um conteúdo proteico elevado, mas após a fermentação a proteína aumentou. Este estudo demonstrou o interesse em utilizar fungos do género *Aspergillus* para a fermentação em estado sólido da dreche.

Com o intuito de analisar o conteúdo proteico da dreche, Ogunjobi et al. (2011) analisou os efeitos da fermentação em estado sólido com o *A. oryzae*.

Ibarruri et al. (2019) otimizou os parâmetros para a fermentação em estado sólido da dreche com microrganismos do género *Rhizopus*, com o objetivo de melhorar a composição nutricional do substrato.

2.6. Produtos alimentares obtidos a partir de dreche

Tendo em conta o produto final que se pretende obter, o uso de fungos em FES usando a dreche como substrato pode ser classificado em três categorias. O produto final pode ser uma enzima, um composto com elevado valor comercial, como o etanol, ou um substrato com valor nutricional melhorado (Marcus & Fox, 2021).

Devido ao seu baixo custo e alto valor nutritivo, tem sido avaliada a possibilidade de utilizar a dreche para produzir pão de trigo, biscoitos e snacks. No entanto, como este resíduo é bastante granular, não pode ser aplicado diretamente em alimentos e, por isso, tem de ser convertido em farinha (Mathias et al., 2015)

Segundo Mathias et al. (2015) uma farinha com alto valor proteico, preparada a partir de BSG, foi implementada em vários produtos de pastelaria, como bolachas, cereais, pão, panquecas e tortilhas. No entanto, existem limitações no uso desta farinha como aditivo proteico devido à sua cor e sabor uma vez que a dreche apresenta uma cor acastanhada quando se encontra húmida e só pode ser utilizada em produtos que sejam totalmente feitos a partir de farinhas de trigo. As

alterações no sabor do produto final levam a que sejam apenas incorporadas pequenas quantidades da farinha.

Hassona, (1993), apresenta um pão com 10 % de dreche que tem um conteúdo proteico e de aminoácidos superior ao pão tradicional - sem dreche. Além disso, o novo pão tem menos 7 % em calorias.

Mathias et al. (2015) referiu que a incorporação de produtos derivados da dreche na nossa dieta pode ser benéfica para a saúde humana.

O uso de farinha de dreche em alimentos permite uma facilidade na mistura, o conteúdo calórico é reduzido para metade em comparação com a maioria das farinhas de trigo, existe uma capacidade de absorção de água elevada, fornece minerais, tem uma cor acastanhada uniforme e elevados conteúdos de proteína e fibra (Mathias et al., 2015).

O baixo conteúdo de cinzas e elevado conteúdo em fibra da dreche levou ao seu uso para materiais de construção. Este resíduo pode ser utilizado para aumentar a porosidade e características dos tijolos sem influenciar a cor e a qualidade do tijolo em si. Assim, a dreche pode ser um substituto do pó de serra que é utilizado normalmente em tijolos para aumentar a porosidade (Mathias et al., 2015).

Também foi investigado o uso deste resíduo para a produção de papel devido à composição em fibra e verificou-se que os produtos tinham maior textura em comparação com produtos sem dreche (Mathias et al., 2015).

Pode também ser fermentado de forma a produzir biogás, constituído por 60 – 70 % de metano, dióxido de carbono, pequenas quantidades de hidrogénio, azoto e monóxido de carbono.

Assim, é possível afirmar que a dreche tem potencial para ser aplicado na produção de energia (Mathias et al., 2015).

Na **Tabela 5** estão representados alguns exemplos de produtos obtidos através de FES utilizando a dreche como substrato e o respetivo microrganismo utilizado.

Tabela 5. Produtos obtido com a fermentação da dreche e respetivo microrganismo. Adaptado de Marcus & Fox, (2021)

Categoria	Produto obtido	Microrganismo
Enzimas	α - amilase	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Penicillium frequestans</i>
	β - amilase	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Aspergillus fumigatus</i>
		<i>Penicillium frequestans</i>
	Celulase	<i>Aspergillus flavus</i>
		<i>Aspergillus fumigatus</i>
		<i>Fusarium oxysporum</i>
		<i>Neurospora crassa</i>
Glucanase	<i>Trichoderman spp</i>	
Hemicelulase	<i>Fusarium</i>	
Protéases	<i>Aspergillus oryzae</i>	
Xilanases	<i>Penicillium janczewskii</i>	
Outros produtos	Bioetanol	<i>Neurospora crassa</i>
	Etanol	<i>Zymomonas mobilis</i>
	Glucose	<i>Trichoderma reesei</i>
	Xilose	<i>Candida guilliermondii</i>
	Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
	Proteína	<i>Aspergillus niger</i>
Dreche fermentado	Digestão de hemicelulose	<i>Penicillium janczewskii</i>
	Aumento dos aminoácidos, antioxidantes, vitaminas e conteúdo proteico	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>

2.7. Desafios para o futuro

A dreche é um substrato versátil e a sua composição pode variar muito, por isso o processo deve ser capaz de suportar diferentes tipos de dreche. A humidade deste resíduo é geralmente alta, o que pode levar a riscos de contaminação microbiana. Além disso, se a dreche for mantida a temperatura ambiente pode apresentar atividade microbiana (Marcus & Fox, 2021).

O aumento de escala da fermentação da dreche pode levar a um aumento da transferência de oxigénio para o substrato e conseqüentemente a uma maior produção de xilanase. Ainda não está provado se o aumento de escala afeta o crescimento microbológico (Marcus & Fox, 2021).

3. Materiais e métodos

3.1. *Aspergillus niger* e condições de crescimento

O microrganismo *Aspergillus niger* 01UAs83 e o respetivo meio de cultura (ABD, agar batata dextrose) foram fornecidos pela Universidade do Minho. O meio de cultura foi preparado através da dissolução de 10 gramas de meio ABD em pó, em 256 mL de H₂O e depois foi autoclavado para ser colocado em placas de petri, em assepsia.

O fungo *A. niger* foi colocado em estufa a 30 °C durante 7-10 dias. Para preparação do inóculo foi usada uma solução de esporos composta por solução salina Tween: 0,85 %(p/p) NaCl e 0,01 %(p/p) Tween 80. Adicionou-se 1 ml da solução salina à placa de petri com o microrganismo e suspendeu-se os esporos nessa solução. A partir desta solução ajustou-se a concentração de esporos para proceder à inoculação da dreche.

O microrganismo foi repicado regularmente para novas placas de petri de forma a manter esporos viáveis no início de cada fermentação.

3.2. Determinação do volume de inóculo

Para contagem dos esporos utilizou-se um microscópio e uma câmara de Neubauer espelhada, constituída por 16 quadrados que possuem 25 quadrículas com uma área de 0,0025 mm² e profundidade, para cada quadricula, de 0,1 mm.

A contagem efetuou-se em 5 quadrantes e utilizaram-se as seguintes equações para determinação do volume de inóculo:

$$\frac{cel}{ml} = \sum \text{dos 5 quadrantes} \times 5 \times F. \text{Diluição} \times 10^4 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{cel}{ml} \times V1 = C2 \times V2 \quad (\text{Eq. 2})$$

3.3. Substrato

A dreche, fornecida pelo Grupo Super Bock, tinha uma humidade de 71 % e foi seca numa estufa a 80 °C durante 24 horas.

3.4. Fermentação em estado sólido

Todas as fermentações foram realizadas num reator com tambor rotativo e agitação que se encontrava numa estufa com uma temperatura constante de 30 °C, durante 7 dias. O reator tinha 6 divisórias e em cada uma cabiam 3 tubos de falcon de 50 mL. Antes das fermentações os tubos foram submetidos a um processo de autoclave.

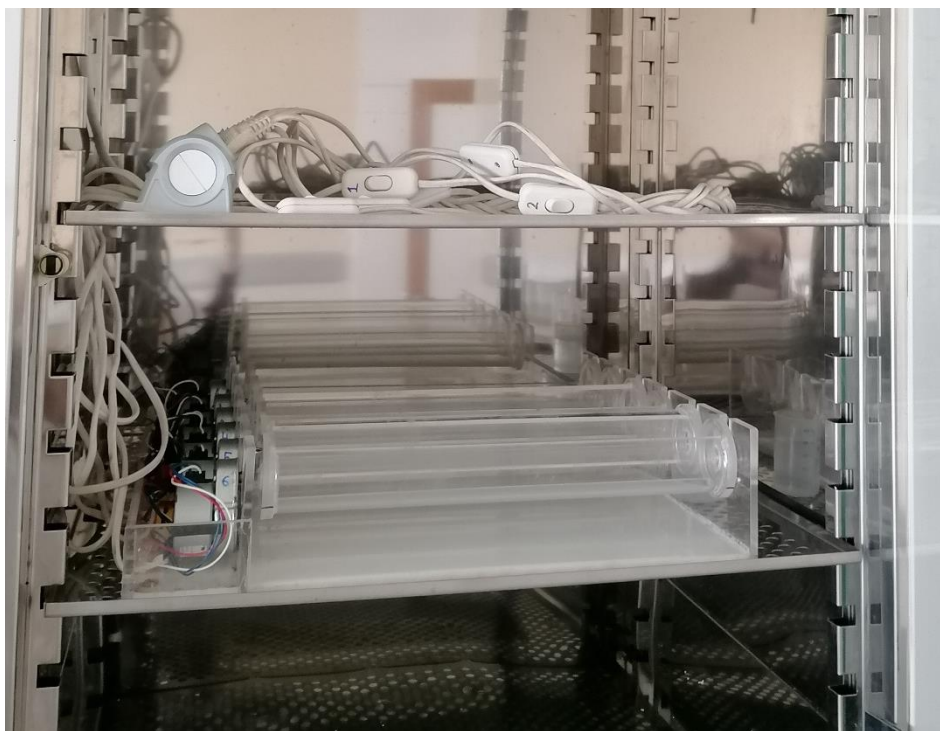


Figura 6. Reator onde foram colocados os tubos de falcon.

Foram retiradas amostras ao longo do período fermentativo (7 dias) para perceber a evolução do conteúdo proteico.

3.5. Determinações analíticas

3.5.1. Determinação da humidade inicial

Para determinar a humidade inicial foi utilizada uma balança medidora de humidade e foram medidas 4,8 g de dreche húmido.

3.5.2. Determinação da proteína solúvel

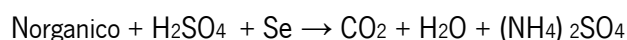
Para determinar a quantidade de proteína solúvel utilizou-se o descrito por Satari et al., (2016) com pequenas modificações. Resumidamente, misturou-se 10 mg de amostra com 3 mL de hidróxido de sódio 1 M em tubos de falcon de 15 ml e ferveu-se a solução durante 10 min. Após fervura, colocou-se em banho de gelo imediatamente. Em seguida, adicionou-se 1 mL de 2,5 % sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a cada tubo de falcon e misturou-se durante 5 min. Por fim, recolheu-se o sobrenadante depois de centrifugar e leu-se a absorbância a 555 nm.

Para a curva de calibração foi utilizado BSA standard em 1 M de hidróxido de sódio.

3.5.3. Determinação da quantidade de azoto

A quantidade total de azoto do resíduo foi determinada pelo método de Kjeldahl. Este método é utilizado para determinar o conteúdo de proteína em materiais biológicos através da conversão do azoto em proteína, utilizando um fator de conversão. Neste caso foi utilizado 6,25.

O método de Kjeldahl divide-se em três etapas: digestão, destilação e titulação. A etapa da digestão consistiu no aquecimento de 0,5 g de amostra até 420 °C, durante 2 horas com 10 mL de ácido sulfúrico a 96 % p/p e o catalisador selénio. O produto obtido na digestão é o sulfato de amónio:



A seguir à digestão utilizou-se o equipamento Foss Kjeltec 8200 auto distillation que permite a realização da destilação e da titulação ao mesmo tempo.



Figura 7. Equipamento Foss Kjeltec 8200 auto distillation. Retirado de Fisher Scientific

3.6. Otimização das condições de fermentação

Foi realizado um teste preliminar para determinar o comportamento do fungo *A. niger* na presença de dreche e avaliou-se o efeito da humidade do substrato no crescimento microbiano. Para tal inoculou-se a dreche húmida e a dreche seca. O material inoculado foi colocado numa estufa a 30 °C durante 9 dias e foram retiradas amostras diárias.

Após o teste preliminar foi testado o efeito da humidade e concentração de inóculo no crescimento do fungo. Para uma temperatura de 30 °C, testaram-se duas concentrações de esporos (1×10^6 e $0,5 \times 10^6$) e dois valores de humidade (70 e 80 %).

Após definir qual a melhor condição, analisou-se as primeiras 24 horas de crescimento. Fez-se uma última fermentação otimizada com a condição escolhida.

A proteína solúvel foi medida em todos os tempos e a proteína total e a fibra foram medidas no início e no fim da fermentação.

3.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados com recurso à análise de variância ANOVA e com o teste de Tukey (diferença mínima significativa) em que $P < 0,05$ significa que os valores não são estatisticamente semelhantes. A análise estatística foi realizada através do programa Statgraphics Plus 5.1 (Manusgistics Inc., Rockville, MD, USA).

4. Resultados e discussão

4.1. Crescimento do fungo *Aspergillus niger*

O fungo *Aspergillus niger* foi inoculado em meio ABD em meio asséptico todas as semanas de forma a ter esporos frescos sempre que se iniciava uma fermentação. Em seguida, foi colocado numa estufa à temperatura de 30 °C. Após 10 dias, o seu aspeto correspondia ao observado na **Figura 8**.



Figura 8. Aspeto do *Aspergillus niger* 10 dias depois de ser incubado.

Estudos anteriores revelam que o comportamento normal do *A. niger* é formar colónias inicialmente brancas ou amareladas que ao longo do tempo se tornam pretas.

Uma colónia é constituída pelo micélio aéreo que se encontra distribuído ao longo da superfície do meio em que o fundo se encontra, havendo grande produção de conídeos (Lima et al., 2019).

Pela **Figura 8** é possível observar a existência de esporos pretos ao longo de toda a placa, tal como previa a literatura. Além disso, inicialmente o fungo apresentava cor branca e os esporos foram-se formando ao longo do período de incubação.

O crescimento foi demorado nos primeiros 5 dias e apenas se viam alguns esporos no centro da placa. A partir do 6º dia houve um crescimento acentuado dos esporos. O seu crescimento à temperatura de 30 °C vai de acordo com a literatura que indica que o crescimento ótimo deste microrganismo varia entre 30 e 37 °C (Lima et al., 2019).

As estruturas morfológicas são características importantes para classificar os fungos e as espécies pertencentes a este grupo de fungos produzem uma “cabeça aspergillar” que é constituída por uma haste que contém uma vesícula onde se formam as células conidiogénicas alongadas, responsáveis pela formação dos esporos (conídeos) (Schuster et al., 2002).

Analisando a placa de petri do lado inverso foi possível observar uma cor amarelada e fissuras radiais no agar, correspondentes às células alongadas, e no centro da placa encontra-se a cabeça aspergillar.

4.2. Preparação do substrato

Antes de ser submetido a um processo de secagem, a dreche apresentava o aspeto da imagem a apresentada na **Figura 9**. A imagem b corresponde à dreche após o processo de secagem.

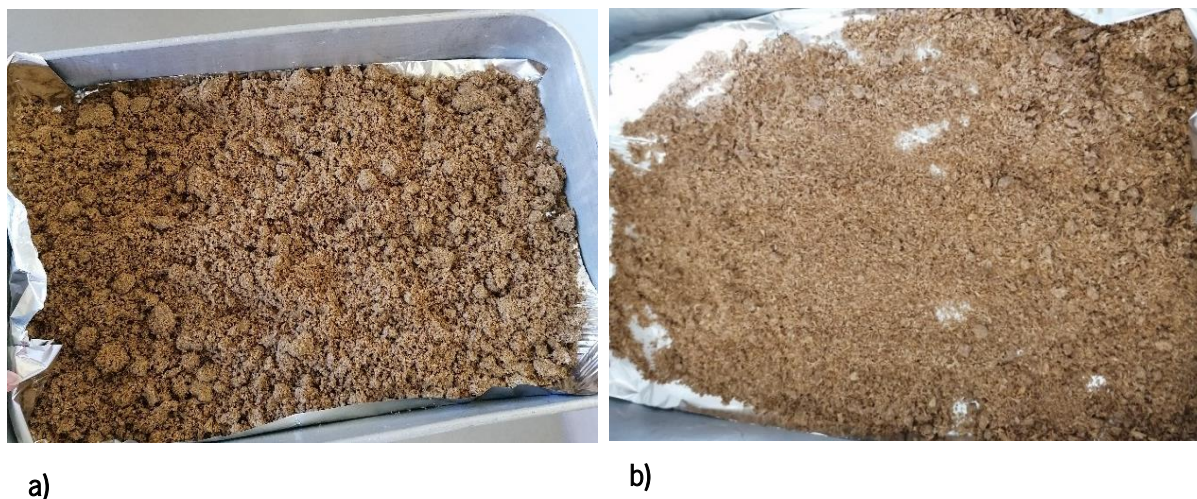


Figura 9. Dreche após o processo de produção do mosto (a) e dreche após o processo de secagem (b).

Este resíduo, apresenta um odor a cereal e, em base húmida, tem tendência a fermentar à temperatura ambiente, o que se confirmou com o aquecimento rápido da dreche, que resulta da libertação de energia durante a fermentação.

De modo a evitar alterações da sua composição química, a dreche deve ser armazenado a uma temperatura abaixo de zero (-20 °C) até ser utilizado.

Foi medida a humidade inicial do resíduo e obteve-se um valor de 71 %, o que vai de encontro com a literatura, que considera este resíduo uma biomassa com elevado teor de água.

Depois de ser submetido a um processo de secagem a dreche é estabilizado e pode ser armazenado à temperatura ambiente.

Após o processo de secagem, a humidade presente na dreche é residual apresentando um valor de 1,15 %. O resíduo seco apresenta uma cor acastanhada e manteve o odor a cereal.

4.3. Ensaio de fermentação

Todas as fermentações conduzidas no âmbito desta dissertação foram realizadas no reator com tambor rotativo e agitação que se encontrava numa estufa com uma temperatura constante de 30 °C.

No primeiro teste realizado parte da dreche foi autoclavada seca, com adição de água após o processo de autoclave em meio asséptico, e outra parte foi autoclavada húmida a 80 %. A proteína solúvel (PS) foi medida ao longo do tempo em que a fermentação decorreu.

Os resultados do teste preliminar realizado encontram-se na **Figura 10**.

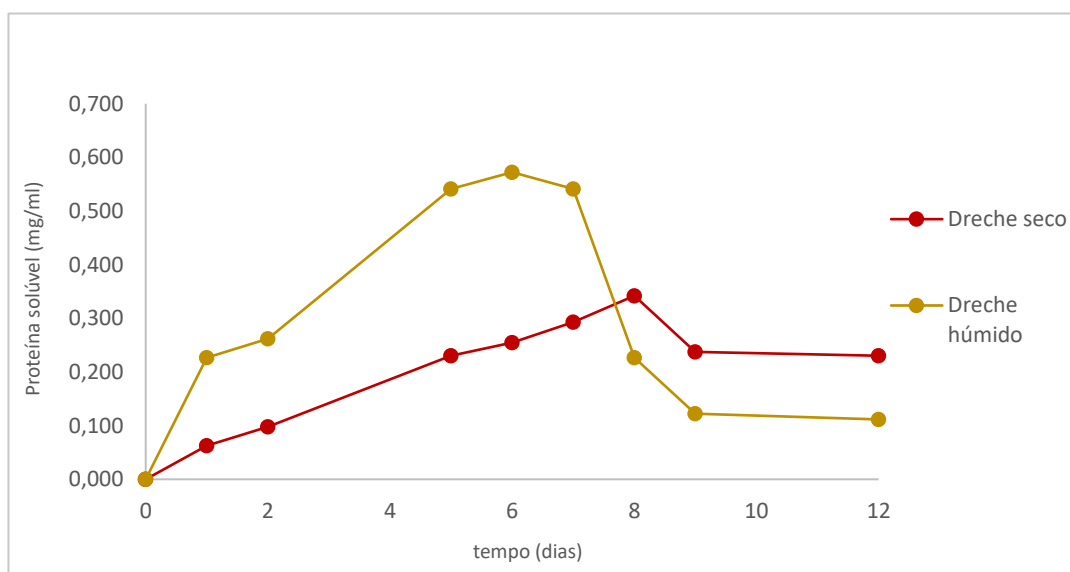


Figura 10. Evolução da proteína solúvel para dreche seca e dreche húmido, depois do processo de autoclave.

Um substrato é considerado bom para o crescimento de um determinado microrganismo quando se atingem condições de crescimento ótimas para o microrganismo em específico e, para tal, é necessário eliminar qualquer outro tipo de organismo que possa estar presente, através de um processo de esterilização, como a autoclave (Kotlar et al., 2011).

A aplicação de biomassas lignocelulósicas, como é o caso da dreche, em processos de fermentação é melhorada se houver um pré-tratamento do substrato por calor e pressões elevadas porque torna a celulose e hemicelulose acessíveis para serem sacarificadas, através do processo parcial de hidrólise. A sacarificação corresponde à transformação dos carboidratos em açúcares fermentescíveis, como a glucose e a xilose, e estes açúcares são utilizados pelos microrganismos para catalisar o seu crescimento (Debiagi et al., 2020; Ravindran & Jaiswal, 2016). Este pré-tratamento pode ser conseguido através da autoclave, que é um método de esterilização através do uso de água e, por isso, leva à ocorrência de um processo de auto hidrólise, onde há libertação dos açúcares e formação de produtos solúveis em água, como as proteínas solúveis (Tarconsky, 1985).

Verificou-se que autoclavar a dreche húmida leva a um aumento superior da concentração de proteína solúvel em comparação com a dreche seca e, além disso, os picos de concentração foram atingidos em dias diferentes. No dia 6, para a dreche húmida, obteve-se uma concentração de 0,572 mg/ml, sendo este o maior valor medido, e com dreche seca o maior valor medido foi 0,342 mg/ml no dia 8, revelando-se um processo mais demorado.

Segundo a literatura, a escolha das condições de autoclave e da biomassa interfere na fermentação dos hidrolisados obtidos e, por isso, o teor de humidade da biomassa interfere nos rendimentos do processo (Tarconsky, 1985). Tal foi possível comprovar na **Figura 10**, com a diferença de concentração da dreche esterilizada húmida para a seca. Estes resultados podem ser interpretados como fruto da diminuição da violência do processo de autoclave na dreche húmida porque parte do calor latente de vaporização foi utilizado para aquecer a água na dreche húmida (Tarconsky, 1985).

As diferenças são notórias nas primeiras 24 horas sendo que neste teste preliminar a quantidade de PS, no primeiro dia, para a dreche húmida e dreche seca foi, respetivamente, 0,227 mg/ml e 0,063 mg/ml. Assim, é possível afirmar que autoclavar a dreche húmida otimiza a obtenção de proteína.

A diferença na concentração inicial de esporos também foi analisada, para a mesma humidade de 80 %. As concentrações de esporo são adicionadas ao substrato através do inóculo, sendo que para uma concentração de esporo específica se adiciona um volume de inóculo específico.

A evolução da PS, ao longo de 7 dias de fermentação, em função das diferentes concentrações de inóculo testadas ($0,5 \times 10^6$ esporos/ml e 1×10^6 esporos/ml) está representada na **Figura 11**.

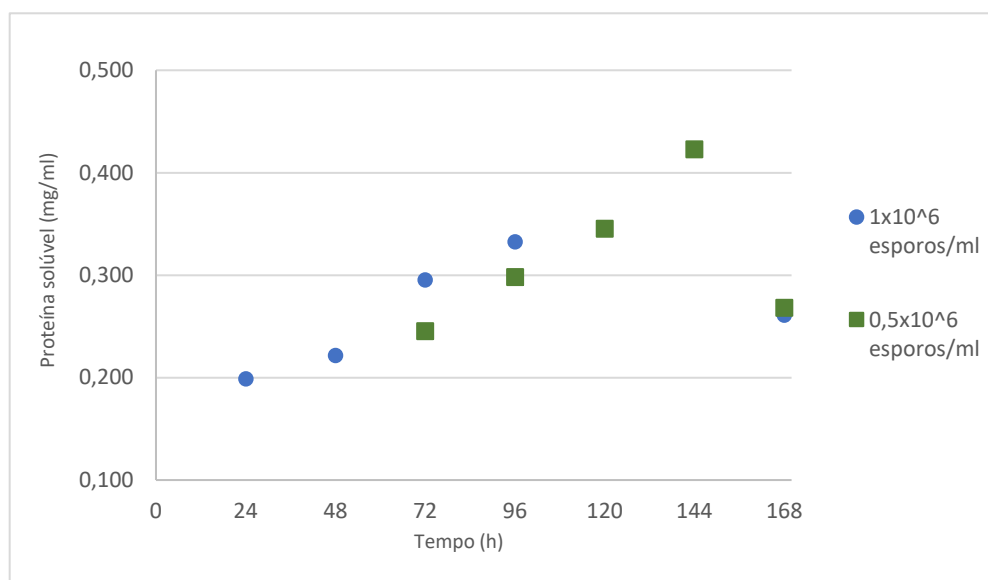


Figura 11. Evolução da proteína solúvel ao longo dos 7 dias para as duas concentrações iniciais de esporos.

Através da realização do primeiro teste com uma humidade de 80 %, uma concentração de esporos de 1×10^6 esporos/ml e comparando os resultados obtidos com os do teste preliminar previamente realizado, aferiu-se que as 24 e 48 h não eram pontos tão relevantes como as 120 h e 144 h. Deste modo, no segundo teste efetuado, com concentração de esporos de $0,5 \times 10^6$ esporos/ml, alteraram-se os dias de análise de amostras, para obter a concentração máxima de proteína solúvel possível, não tendo sido analisadas as primeiras 48 h e sim as 120 e 144 h, como mostra a **Figura 11**, sendo possível prever o comportamento dos dias em falta através dos valores existentes.

Além disso, para uma concentração de esporos de 1×10^6 esporos/ml obteve-se uma maior concentração de PS. No sétimo dia (168 h), em ambas as concentrações de esporos, verificou-se um decréscimo da quantidade de proteína, obtendo-se valores semelhantes entre as duas concentrações testadas correspondendo a 0,261 mg/ml e 0,268 mg/ml para 1×10^6

esporos/ml e $0,5 \times 10^6$ esporos/ml, respetivamente. De acordo com Erten et al. (2006) , uma concentração de esporo superior leva à redução da fase de latência que consequentemente resulta em taxas de fermentação mais rápidas e em concentrações de proteína superiores, que se pode confirmar com a **Figura 11** em que se vê, por exemplo, que com 1×10^6 esporos/ml se atingiu a concentração de 0,300 mg/ml mais rápido do que com $0,5 \times 10^6$ esporos/ml (Erten et al., 2006; Gibbons & Westby, 1986). Assim, verificou-se que os resultados obtidos vão de encontro com a bibliografia.

Apesar da diferença de valores, é perceptível que de uma concentração para a outra não houve uma diferença significativa na quantidade de PS, o que permite assumir que para analisar de forma mais realista o efeito do volume de inoculo deve ser testado um intervalo de concentrações de esporo maior, por exemplo 1×10^7 esporos/ml e 1×10^8 esporos/ml. Espera-se que uma concentração de esporo muito baixa leve a um crescimento insuficiente e, consecutivamente, produzem-se menores concentrações de proteína. O mesmo pode ocorrer com uma concentração de esporo muito elevada porque pode levar à escassez de nutrientes impedindo a atividade metabólica do microrganismo (Subhosh Chandra & Rajasekhar Reddy, 2013).

Na **Figura 12** está descrito o comportamento do *Aspergillus niger* ao longo da fermentação para as duas condições estudadas.

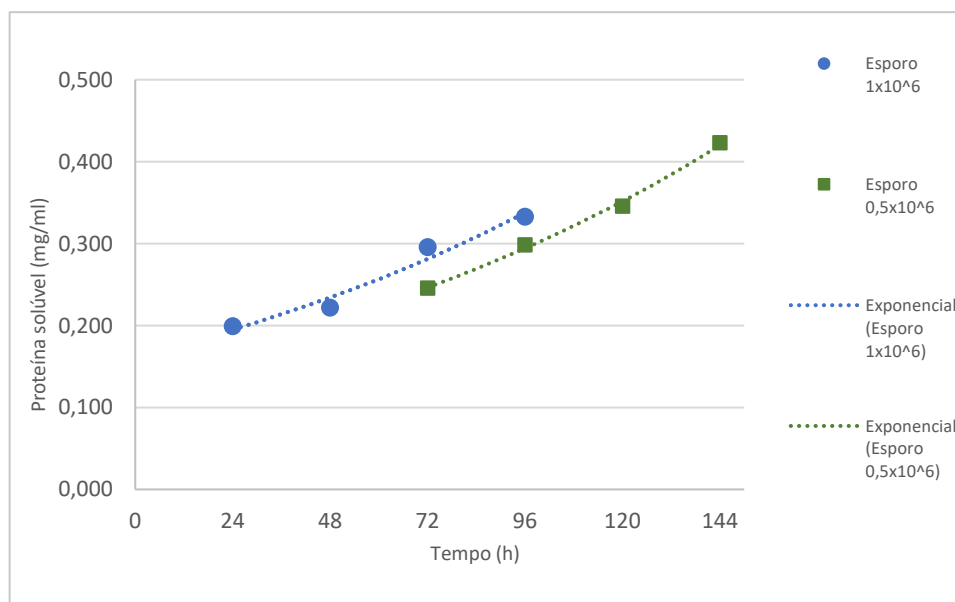


Figura 12. Crescimento microbológico para as duas concentrações de esporos.

Analisando a **Figura 12** percebe-se que houve uma taxa de crescimento superior para a concentração de esporo de 1×10^6 esporos/ml. Pelo gráfico determinou-se a equação de crescimento do microrganismo para ambas as concentrações.

As equações para 1×10^6 esporos/ml e $0,5 \times 10^6$ esporos/ml estão apresentadas, respetivamente, nas equações 3 e 4.

$$y = 0,1624 e^{0,0076x} \quad \text{Eq. 3}$$

$$y = 0,1445 e^{0,0074x} \quad \text{Eq. 4}$$

As taxas de crescimento máximo (μ_{\max}) para 1×10^6 esporos/ml e $0,5 \times 10^6$ esporos/ml são, respetivamente, $0,0076 \text{ h}^{-1}$ e $0,0074 \text{ h}^{-1}$, o que comprova que para uma concentração de esporos superior existe um crescimento superior.

As taxas de crescimento obtidas não são comparáveis com a literatura porque não existem estudos suficientes para as taxas de crescimento em FES do *A.niger*. No entanto, PII et al. (1998) apresenta a diferença entre taxas de crescimento para FES e FS deste microrganismo com condições diferentes.

Contrariamente a esta dissertação em que se estuda a biomassa, o estudo de PII et al. (1998) é feito em glucose e, por isso, os valores obtidos são elevados. Apesar de não ser possível comparar valores concretos, foi possível aferir que a FES obtém melhores taxas de crescimento do que a FS em que, para a mesma quantidade de glucose (50 g/l) se obteve $0,323 \text{ h}^{-1}$ e $0,091 \text{ h}^{-1}$ para FES e FS, respetivamente, o que mostra a vantagem de realizar FES.

Para perceber de que forma se comporta o microrganismo na dreche deve ser feito um estudo entre FES e FS em biomassa, de forma a ser possível comparar os valores de taxa de crescimento, no entanto este estudo está fora do âmbito desta dissertação pelo que é recomendado para projetos futuros.

O facto de estas duas concentrações de esporos terem uma diferença é reduzida, visto que as taxas específicas de crescimento são muito parecidas, suporta a ideia de ser importante testar mais concentrações de esporo, tendo em atenção que um aumento de concentração de esporos leva à diminuição da fase de latência e consecutivamente obtém-se uma maior quantidade de produto em menos tempo até se esgotar a biomassa, ou seja, espera-se que o aumento exagerado

dos esporos leve à escassez de biomassa e, por isso, afeta a obtenção de produto final, porque sem biomassa o microrganismo não consegue continuar a produção e atinge mais rapidamente a fase de decréscimo.

O efeito da humidade também foi testado tendo sido analisadas duas humidades: 80 e 70 %, para uma concentração de esporo de 1×10^6 esporos/ml.

A **Figura 13** retrata os resultados obtidos para a fermentação com diferentes valores de humidade durante os 7 dias de fermentação.

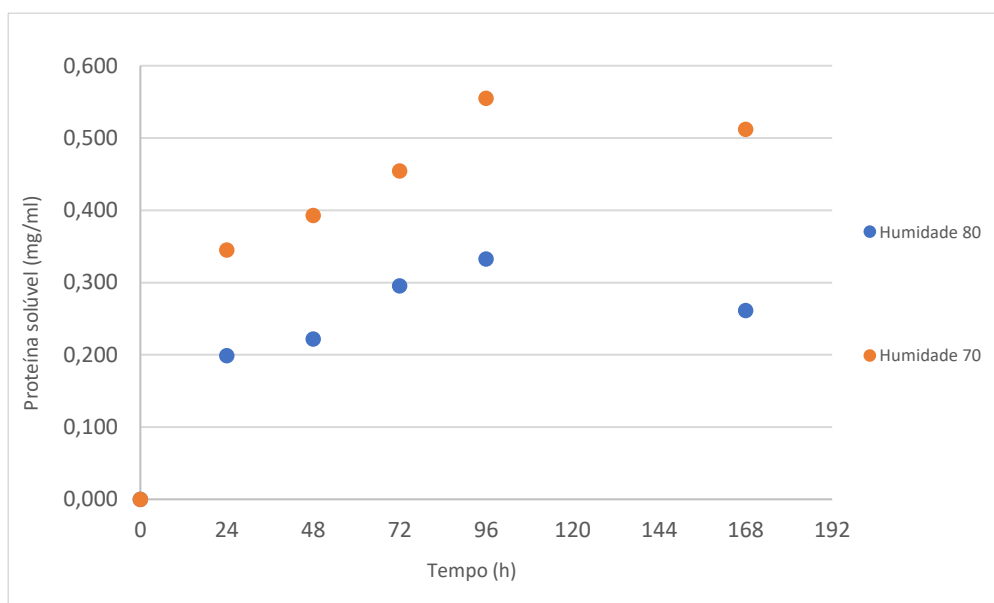


Figura 13. Evolução da proteína ao longo dos 7 dias para as duas humidades.

A fermentação em estado sólido é definida como um processo fermentativo que utiliza pouca água e a água presente neste tipo de fermentação é proveniente do substrato utilizado, podendo encontrar-se entre as partículas sólidas ou como uma camada fina que está absorvida pela superfície das partículas. A água só se encontra livre dentro do sistema de fermentação quando ocorre saturação da capacidade do substrato, ou seja, depende do nível de humidade suportado. Desta forma, a humidade é um parâmetro que é considerado importante na FES e afeta o crescimento microbiano, as reações metabólicas e os processos de transferência de massa. A humidade ótima varia conforme o substrato (Mussatto et al., 2012; Rimbault, 1998).

Quando as condições de crescimento do microrganismo não são as adequadas ou quando o substrato é consumido até ao seu limite pode ocorrer esporulação, redução do crescimento e morte celular (Raimbault, 1998).

Estudos anteriores revelam que valores baixos de humidade podem levar à esporulação do microrganismo. Por outro lado, valores mais elevados levam à redução da porosidade do sistema, que corresponde à percentagem de volume total de substrato que não é ocupada por sólidos e é composta por água e ar. Por sua vez, a diminuição da porosidade leva à limitação da transferência de oxigénio. Em geral, o valor ótimo de humidade para o crescimento num substrato sólido varia entre 40 % a 70 % (Raimbault, 1998).

Neste estudo a PS apresentou valores de concentração superiores para uma humidade de 70 %, correspondendo a um aumento de 3,6 vezes no 4º dia de crescimento. Apesar de as concentrações, para a humidade de 80 %, serem inferiores aos valores da humidade de 70 % foi possível observar que no 4º dia de fermentação houve um aumento de 3,4 vezes.

Os menores valores de concentração de PS a 80 % podem ser explicadas pelo facto de esta humidade já não ser adequada para a dreche estudada. De facto, ao longo da fermentação verificou-se dificuldade na mistura porque a dreche fermentada estava demasiado húmida e ficava agarrada às paredes dos tubos. Além disso, a humidade de 80 % é superior à humidade da dreche inicial (71 %) e por isso, faz sentido que com uma humidade de 70 % se observe um melhor crescimento, o que permite assumir que a 80 % de humidade ocorre saturação da capacidade deste substrato.

No sétimo dia de fermentação a concentração de proteína diminuiu para 0,261 mg/ml e 0,415 mg/ml para as condições de 80 e 70 % de humidade, respetivamente. Segundo Ibarruri et al., (2019) o metabolismo do fungo é elevado a uma temperatura de 30 °C. O tempo de fermentação também aumenta a atividade metabólica. Atividades metabólicas altas levam a uma assimilação de aminoácidos para a produção de biomassa e, por isso, a determinada altura a quantidade de PS diminui.

Ainda analisando a **Figura 13** é perceptível que nas primeiras 24 h existe um elevado aumento da proteína, em comparação com as restantes horas.

Neste estudo analisou-se a proteína até ao 4º dia, não tendo sido observado o seu crescimento nos dias 5 e 6 e concluiu-se que poderiam ser dias importantes para o aumento do conteúdo proteico. Assim, foi feita uma nova fermentação para uma humidade de 70 % em que se obteve uma quantidade máxima de proteína no 5º dia, que será discutida mais à frente neste capítulo. Os dias em que se obteve uma concentração máxima de proteína coincidem com os valores da literatura, que mostram um máximo de conteúdo proteico no quinto dia de fermentação (Canedo et al., 2016).

Na **Figura 14** está descrita a curva do crescimento na fase exponencial do fungo *Aspergillus niger* para as duas humidades estudadas.

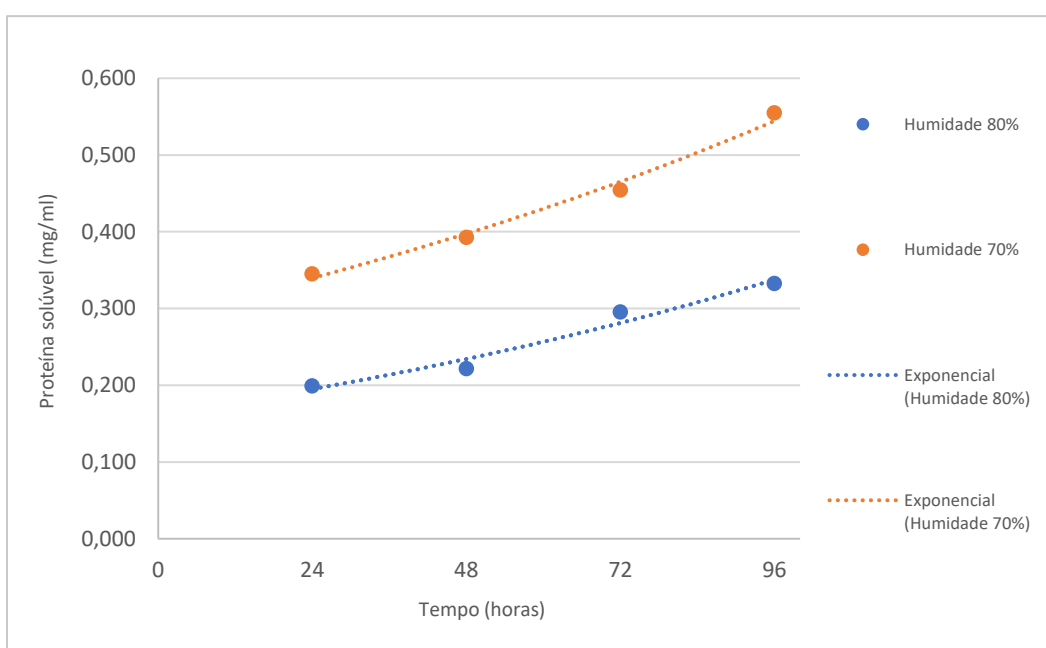


Figura 14. Crescimento microbológico para as duas humidades estudadas.

Pela **Figura 14** é notório que houve um melhor desempenho para a humidade de 70 %.

Também foram determinadas as equações de crescimento do fungo para as humidades estudadas. As equações 5 (correspondente à equação 3 descrita anteriormente) e 6 representam, respetivamente, as humidades de 80 e 70 %.

$$Y = 0,1624 e^{0,0076x} \quad \text{Eq. 5}$$

$$y = 0,1996 e^{0,2027x} \quad \text{Eq. 6}$$

Nas equações 5 e 6 estão descritas as taxas específicas de crescimento do microrganismo. Para uma humidade de 70 % observou-se um μ_{max} de $0,2027 h^{-1}$, sendo este um valor superior à μ_{max} para 80 %, que foi apenas de $0,0076 h^{-1}$, comprovando que a humidade de 70 % é melhor do que 80 %.

Com o objetivo de perceber o que acontece nas primeiras horas de crescimento retiraram-se amostras ao longo das 24 h iniciais, para uma humidade de 70 % e concentrações de esporo de 1×10^6 esporos/ml e obteve-se o gráfico representado na **Figura 15**.

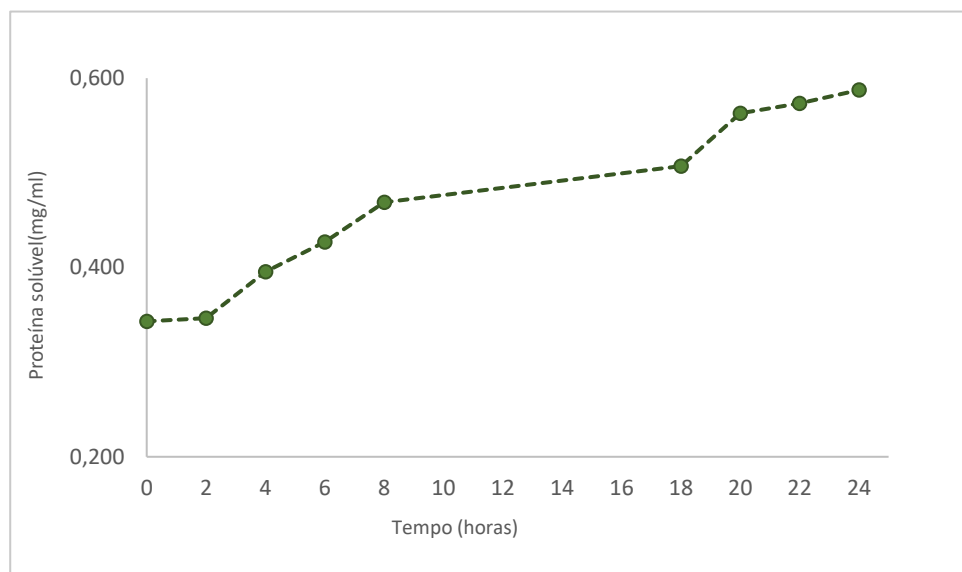


Figura 15. Concentração de proteína ao longo das primeiras 24 horas de crescimento do *A.niger*.

Na análise do comportamento do *A. niger* (**Figura 15**) verifica-se que nas duas primeiras horas há uma fase de latência, que é seguida pela primeira fase exponencial com uma duração de 6 horas. Das 8 horas às 18 horas verifica-se que a gama de aumento de proteína diminui, apresentando um comportamento parecido ao de uma fase de latência, que pode ser justificado pela mudança de fonte de carbono, visto que às 18 horas volta a haver um aumento exponencial.

Este comportamento remete ao chamado crescimento dual. Este fenómeno acontece quando estão presentes duas fontes de carbono, havendo dois crescimentos exponenciais separados por uma fase de latência intermédia (Chu & Barnes, 2016).

O crescimento dual é uma adaptação do microrganismo que permite maximizar o seu crescimento na presença de mais do que um nutriente (Chu & Barnes, 2016).

Segundo a literatura, as enzimas que degradam a celulose e hemicelulose podem ser produzidas por microrganismos através da FES em que o substrato fornece os nutrientes necessários ao crescimento microbiano, induzindo a produção enzimática (Dias et al., 2018).

O *A. niger* é considerado um bom produtor de enzimas que degradam a celulose e hemicelulose, como as xilanas, β -xilosidase e β -glucosidase e celulasas (Dias et al., 2018). Além disso, segundo Zhang et al. (2022) este microrganismo utiliza a celulose e a hemicelulose como fontes de carbono. Por sua vez, Mirón et al. (2002) mostra que *A. niger* tem a capacidade de ter um crescimento dual e, embora este estudo seja referente a fontes de carbono diferentes da celulose e hemicelulose, a capacidade do fungo utilizar duas fontes de carbono é comprovada. Assim, considera-se que o *A. niger* apresenta um comportamento dual na drecche através de duas fontes de carbono: a hemicelulose e a celulose.

A celulose é encontrada principalmente na parede celular da biomassa e é constituída por longas cadeias lineares de moléculas de glicose, ligadas por pontes ésteres α -D-glicosídicas e por pontes de hidrogénio, o que torna a sua degradação complicada. Por sua vez, a hemicelulose é constituída por xilanas (pentoses), unidades alternadas de manoses e glicoses e unidades de galactoses, sendo mais fácil de degradar (Dias et al., 2018).

Por norma as hemiceluloses estão ligadas às ligninas por ligações covalentes e através de um processo de hidrolise estas ligações podem ser quebradas. Além disso, a hemicelulose e a lignina formam uma barreira protetora à volta da celulose, impedindo o seu acesso (Andlar et al., 2018; Dias et al., 2018).

Como foi referido acima, inicialmente houve um processo de autoclave que induziu a autohidrolise parcial na drecche e, por isso, tendo em conta a literatura assume-se que as ligações entre a hemicelulose e a lignina foram quebradas. Sendo mais fácil aceder à hemicelulose, existe a forte suspeita de que a primeira fonte de carbono consumida pelo fungo é a hemicelulose e a segunda fonte é a celulose.

Para compreender o que acontece, de facto, com estas fontes de carbono seria importante em trabalhos futuros determinar a atividade das enzimas.

A **Figura 16** representa os valores de proteína bruta obtidos para a dreche antes de qualquer tratamento e para a dreche após os diferentes testes efetuados, sendo que o resíduo dos testes foi autoclavado antes da medição da proteína.

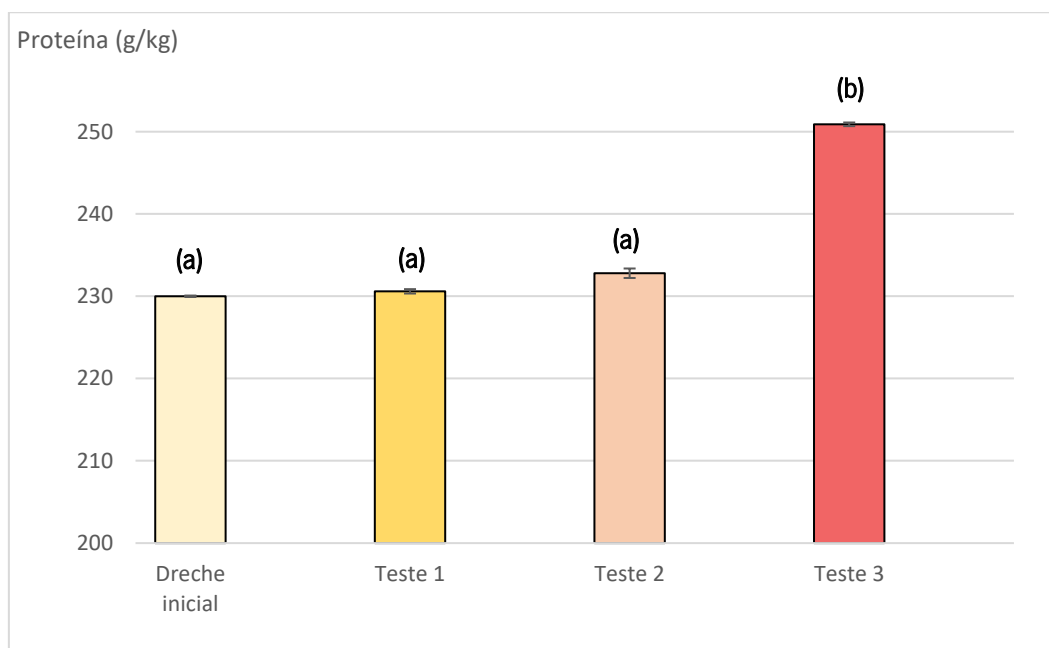


Figura 16. Concentração de proteína bruta na dreche inicial e nos testes realizados ao longo deste estudo. O teste 1 corresponde ao estudo da humidade de 80 % e concentração de esporo 1×10^6 esporos/ml, o teste 2 corresponde à humidade de 80 % e concentração de esporo $0,5 \times 10^6$ esporos/ml. O teste 3 diz respeito ao teste da humidade de 70 % e concentração de esporo de 1×10^6 esporos/ml. As barras com letras iguais não são estatisticamente diferentes significativamente ($P < 0,05$).

A atividade metabólica do *A. niger* durante a fermentação leva à secreção de enzimas extracelulares que degradam a dreche e permitem o aumento do conteúdo proteico (Canedo et al., 2016).

Estudos anteriores comprovam que a fermentação em estado sólido aumenta o conteúdo da proteína bruta (PB) devido à produção de proteínas microbianas como as enzimas, os péptidos e outros componentes microbianos (Canedo et al., 2016; Gmoser et al., 2020)

A análise da PB, feita pelo método de Kjeldahl, foi importante para verificar se, de facto, havia um aumento da proteína na dreche fermentada, no entanto, este método é baseado na estimativa do conteúdo em azoto total e através do fator de conversão 6,25 obteve-se a PB. Assim, estes resultados podem não corresponder aos níveis de proteína exatos presentes na dreche, uma vez

que segundo Ong & Lee, (2021) a fermentação pode levar à diminuição do conteúdo em azoto e por isso o valor da proteína bruta pelo método de Kjeldahl também será inferior.

Na **Figura 16**, a dreche inicial é comparada aos testes realizados e verifica-se que a maior concentração de PB foi no teste 3 (70 % de humidade e 1×10^6 esporos/ml) com 250,9 g de proteína por cada kg de dreche com um aumento de 9 % comparado com a dreche inicial, sendo que este valor não é estatisticamente semelhante ($P < 0,05$) à dreche inicial. Tais resultados podem ser relacionados com os valores obtidos de PS, uma vez que o seu aumento pode dever-se à solubilização da PB, visto que durante a fermentação há produção de protéases que podem catalisar a PB em aminoácidos e péptidos que são solúveis. Além disso, o *A. niger* é um bom produtor desta enzima (Lindberg et al., 2021). Assim, os resultados obtidos vão de acordo com o esperado.

Esperava-se também que o menor conteúdo em PB fosse o do teste 2 (80 % de humidade e $0,5 \times 10^6$ esporos/ml), uma vez que com esta condição se obteve uma quantidade de PS inferior. No entanto, pela **Figura 16** verifica-se que o teste 2 tem valores de PB ligeiramente superiores ao teste 1. No entanto, conclui-se que não há uma diferença significativa, uma vez que o aumento de esporos diminui a fase de latência e por isso obtém-se mais PS em menos tempo mas na prática em termos de crescimento total de biomassa, ou seja na fase de crescimento, não se observa esta diferença.

Antes de medir a PB a dreche foi submetida a um processo de secagem numa estufa a 60 °C para ser estabilizada. No entanto, a temperatura de secagem é elevada e pode ter levado a uma alteração da conformidade da estrutura das proteínas da dreche levando à sua inativação, diminuindo os valores obtidos de PB.

Assim, é possível assumir que a secagem leva, de facto, a uma diminuição do conteúdo proteico, mas esta diminuição não é mensurável teste a teste. Foi possível observar, mesmo assim, um aumento no teste 3.

Este aumento após a secagem é positivo porque industrialmente deve ser feito sempre o processo de secagem, que no caso da dreche é essencial para que este resíduo não fermente à temperatura

ambiente (como já foi referido acima) e, por isso, pretende-se que haja um aumento independentemente deste processo.

Como as condições do teste 3 foram as melhores realizou-se um teste final em que se otimizou a FES da dreche com humidade de 70 % e concentração de esporo de 1×10^6 esporos/ml. A proteína bruta foi medida no quinto dia de fermentação.

Com os valores obtidos construiu-se a **Tabela 6** que compara a dreche inicial com a dreche otimizada.

Tabela 6. Comparação entre a dreche inicial e a dreche fermentada

Amostra	Proteína Bruta %	Proteína solúvel (mg/ml)
Dreche Inicial	$23 \pm 0,09$	$0,224 \pm 0,005$
Dreche fermentada	$27,31 \pm 0,53$	$0,800 \pm 0,010$

Analisando a **Tabela 6** verifica-se que após a fermentação com as condições otimizadas obteve-se uma dreche com maior PB e PS, o que permite concluir que, de facto, houve um aumento do conteúdo nutricional da dreche.

A PB da dreche otimizada aumentou 1,2 vezes em comparação com a dreche inicial e a PS aumentou 3,6 vezes. No estudo realizado por Canedo et al. (2016), a PS aumentou 4 vezes e a PB aumentou 2 vezes, na melhor das condições. Os aumentos da quantidade de PB e PS da **Tabela 6** encontram-se na mesma ordem de grandeza de valores da literatura, o que permite assumir que houve um aumento de acordo com o esperado do conteúdo proteico da dreche após fermentação com *A. niger*.

5. Conclusões e recomendações

O uso de resíduos como substrato para processos biotecnológicos permite um reaproveitamento de matérias e obtenção de novos produtos de valor acrescentado, contribuindo para um desenvolvimento mais sustentável.

Esta dissertação teve como objetivo aumentar o valor nutricional da dreche através do uso de um processo biotecnológico de baixo impacto ambiental e económico.

A fermentação em estado sólido demonstrou ser um processo adequado para a valorização da dreche através do aumento do seu conteúdo em proteína.

A dreche demonstrou possuir propriedades físico-químicas adequadas para ser utilizada como um substrato em fermentação em estado sólido.

Identificaram-se e procedeu-se à otimização das condições de fermentação levando à obtenção de uma maior quantidade de proteína bruta e solúvel no final do processo fermentativo, atingindo o seu máximo ao 5º dia de fermentação. A concentração de 1×10^6 esporos/ml, com uma humidade de 70 % foi a condição que conduziu a um maior aumento das variáveis em estudo.

Adicionalmente, verificou-se que o processo de esterilização por autoclave influencia o rendimento de produção de proteína e que o processo de secagem da dreche pode afetar a quantidade de proteína obtida uma vez que elevadas temperaturas podem alterar a conformação das proteínas levando à perda da sua atividade.

Em suma, o objetivo desta dissertação foi cumprido, mas existem várias melhorias que podem ser feitas para trabalhos futuros que envolvam o estudo da FES da dreche. Pode ser testada a diferença entre fermentação com suplemento de azoto ou sem suplemento. Adicionalmente podem ser testados mais microrganismos para comparar a diferença entre o crescimento de cada um. Avaliar o efeito de co-culturas na valorização da dreche. Determinar, quantificar e extrair compostos bioativos como enzimas e compostos fenólicos com diferentes bioatividades (antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória), com aplicações a nível industrial.

Por último, recomenda-se o estudo de formas diferentes para estabilizar a dreche após a fermentação de forma a torná-lo numa farinha que possa ser incorporada em novos produtos alimentares e avaliar a digestibilidade destes produtos.

6. Referências bibliográficas

- Abdul Manan, M., & Webb, C. (2018). Control strategies with variable air arrangements, forcefully aerated in single circular tray solid state bioreactors with modified Gompertz model and analysis of a distributed parameter gas balance. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(6), 1455–1467.
- Aldana, C. D., de Oliveira, L. C., & Waldman, W. R. (2021). Overview of the valorization of brewery industry by-products. In *Revista Virtual de Química* (Vol. 13, Issue 4, pp. 926–932).
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 18, Issue 11, pp. 768–778). Wiley-VCH Verlag.
- Augusto Tavares Russo, M. (2003). Tratamento de Resíduos Sólidos. Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Civil
- Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javed, S. (2007). Solid-state Fermentation: An Overview.
- Bonjoch, N. P., & Tamayo, P. R. (2006). Protein Content Quantification by Bradford Method. In *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (pp. 283–295). Kluwer Academic Publishers.
- Canedo, M. S., de Paula, F. G., da Silva, F. A., & Vendruscolo, F. (2016). Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (7), 1105–1113.
- Carvalho Do Santos, T., Alves Diniz, G., Riany De Brito, A., José, A., Pires, V., & Franco, M. (2015). Effect of solid state fermentation on nutritional content and evaluation of degradability in cactus pear. *Revista Caatinga*, 3, 248–254.
- Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2007). Enzymatic hydrolysis of Brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8703–8710.
- Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). *Protein Analysis* (pp. 315–331).

- Chen, H. (2013). Modern Solid State Fermentation. In *Modern Solid State Fermentation*.
- Chu, D., & Barnes, D. J. (2016). The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*, 6.
- Conway, J. (2022). *Portugal: annual volume of beer consumed per capita 2008-2020*.
- Cooray, S. T., & Chen, W. N. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42 (October 2017), 85–94.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, 76 (3), 291–302.
- D'Amato, D. (2021). Sustainability Narratives as Transformative Solution Pathways: Zooming in on the Circular Economy. *Circular Economy and Sustainability*, 1(1), 231–242.
- Debiagi, F., Madeira, T. B., Nixdorf, S. L., & Mali, S. (2020). Pretreatment Efficiency Using Autoclave High-Pressure Steam and Ultrasonication in Sugar Production from Liquid Hydrolysates and Access to the Residual Solid Fractions of Wheat Bran and Oat Hulls. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(1), 166–181.
- Dias, L. M., dos Santos, B. v., Albuquerque, C. J. B., Baeta, B. E. L., Pasquini, D., & Baffi, M. A. (2018). Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 708–718.
- Erten, H., Tanguler, H., Cabaroglu, T., & Canbas, A. (2006). The influence of inoculum level on fermentation and flavour compounds of white wines made From cv. Emir. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(3), 232–236.
- Gibbons, W. R., & Westby, C. A. (1986). Effects of Inoculum Size on Solid-Phase Fermentation of Fodder Beets for Fuel Ethanol Production. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 52).

- Gmoser, R., Fristedt, R., Larsson, K., Undeland, I., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2020). From stale bread and brewers spent grain to a new food source using edible filamentous fungi. *Bioengineered*, *11*(1), 582–598.
- Hassona, H. Z. (1993). High fibre bread containing brewer's spent grains and its effect on lipid metabolism in rats. In *Die Nahrung* (Vol. 37).
- Hongzhang Chen. (2013). *Modern Solid State Fermentation Theory and Practice*.
- Ibarruri, J., Cebrián, M., & Hernández, I. (2019). Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus sp.* to Enhance Nutritional Value. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(12), 3687–3700.
- Kadic, E., & Heindel, T. (2014). 2 Modes of Operation.
- Kirchherr, J., Reike, D., & Hekkert, M. (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. In *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 127, pp. 221–232). Elsevier B.V.
- Kotlar, C. E., Belagardi, M., & Roura, S. I. (2011). Brewer's spent grain: Characterization and standardization procedure for the enzymatic hydrolysis by *Bacillus cereus* strain. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *58*(6), 464–475.
- Kramer, D. C. (1985). CA1182984A PACKED BED REACTOR FOR SOLIDS CONTAINING FEEDS.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems - An overview. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 25, Issues 1–2, pp. 1–30).
- Kuila, A., & Sharma, V. (2018). *Principles and Applications of Fermentation Technology*.
- Kuzina, A., & Alimentar, E. (2014). Valorização de subprodutos de cenoura. *Orientadora: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins Coorientadora: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu*.

- Lima, M. A. S., de Oliveira, M. D. C. F., Pimenta, A. T. Á., & Uchôa, P. K. S. (2019). *Aspergillus Niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. In *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Vol. 30, Issue 10, pp. 2029–2059).
- Lindberg, D., Kristoffersen, K. A., Wubshet, S. G., Hunnes, L. M. G., Dalsnes, M., Dankel, K. R., Høst, V., & Afseth, N. K. (2021). Exploring effects of protease choice and protease combinations in enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *Molecules*, 26(17).
- Manuela E. Pintado, J. A. T. (2015). Valorização de subprodutos.
- Marcus, A., & Fox, G. (2021). Fungal biovalorization of a brewing industry byproduct, brewer's spent grain: A review. In *Foods* (Vol. 10, Issue 9). MDPI.
- Martinez, M., & Espinosa, R. (2020). Introductory Chapter: A Brief Overview on Fermentation and Challenges for the Next Future. In *New Advances on Fermentation Processes*. IntechOpen.
- Mathias, T. R., Alexandre, V. M. F., Cammarota, M. C., de Mello, P. P. M., & Sérvulo, E. F. C. (2015). Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 400–404.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2012). 6 Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. www.intechopen.com
- Ogunjobi, A. A., Mejeha, O. K., & Fagade, O. E. (2011). At the present time, there is great need to reduce the pollution resulting from industrial activities. In *AUJ.T* (Vol. 15, Issue 1).
- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, 256.
- Ong, A., & Lee, C. L. K. (2021). Cooperative metabolism in mixed culture solid-state fermentation. *LWT*, 152.
- Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. 13 (November 2001), 81–84.

- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. In *Process Biochemistry* (Vol. 35). www.elsevier.com/locate/procbio
- Pinheiro, T., Coelho, E., Romani, A., & Domingues, L. (2019). Intensifying ethanol production from brewer's spent grain waste: Use of whole slurry at high solid loadings. *New Biotechnology*, 53, 1–8.
- Pill, E., Favela-Torres, E., Cordova-L, J., Garda-Rivero, M., & Gutierrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. In *Process Biochemistry* (Vol. 33, Issue 2).
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. In *Bioengineering* (Vol. 3, Issue 4). MDPI AG.
- Satari, B., Karimi, K., Taherzadeh, M. J., & Zamani, A. (2016). Co-production of fungal biomass derived constituents and ethanol from citruswastes free sugars without auxiliary nutrients in airlift bioreactor. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3).
- Schürle, K. (2020). History, current state, and emerging applications of industrial biotechnology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 173, pp. 13–51). Springer.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - A review. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 59, Issues 4–5, pp. 426–435).
- Seiskari, P. (2006). WO2006035104A1_Original_document_20220318123254.
- Shen, C.-H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 187–214). Elsevier.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 44, Issue 1, pp. 13–18).

- Sousa, D., Venâncio, A., Belo, I., & Salgado, J. M. (2018). Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(14), 5248–5256.
- Stuedler, S., Werner, A., & Cheng Editors, J. J. (2019). Solid State Fermentation Research and Industrial Applications.
- Subhosh Chandra, M. G., & Rajasekhar Reddy, B. (2013). Exoglucanase production by *Aspergillus niger* grown on wheat bran: Exoglucanase by *A. niger* in SSF. *Annals of Microbiology*, *63*(3), 871–877.
- Tan, Y. X., Mok, W. K., Lee, J., Kim, J., & Chen, W. N. (2019). Solid state fermentation of Brewers' spent grains for improved nutritional profile using *Bacillus subtilis* WX-17. *Fermentation*, *5*(3).
- Tarconsky. (1985). Autohydrolysis Extraction Process as a Pretreatment of Lignocelluloses for their Enzymatic Hydrolysis. In *Acta Biotechnol* (Vol. 5).
- Teixeira, J. A., & Ferreira, E. C. (2003). VIII-Biorreactores.
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *81*, 146–161.
- Trzcinski, A. P. (2018). RESIDUES A dissertation submitted to the University of Manchester for the degree of Master of Science in Biotechnology in the Faculty of Engineering and Physical Sciences
- Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J.-M. (2000). *Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by Aspergillus niger*.
- Zayas, J. F. (1997). Functionality of Proteins in Food. In *Functionality of Proteins in Food*. Springer Berlin Heidelberg.
- Zhang, L., Cao, G., Liu, H., Wu, Z., Gong, D., Ru, X., Gong, X., Pi, Q., & Yang, Q. (2022). Application of *Aspergillus niger* in Practical Biotechnology of Industrial Recovery of Potato Starch By-Products and Its Flocculation Characteristics. *Microorganisms*, *10*(9).

Anexos

Anexo A – Curva de Calibração

Como foi mencionado na secção 3.4.2. para determinar a concentração da proteína solúvel foi utilizada uma curva de calibração. A curva relaciona a absorbância com a concentração e está apresentada na **Figura A 1**.

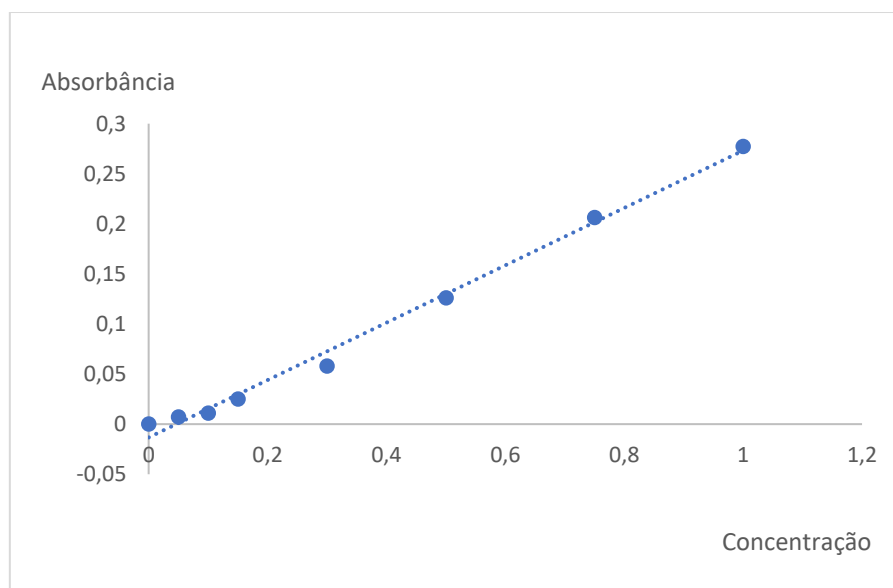


Figura A 1. Curva de calibração da biomassa que relaciona a absorbância com a concentração.

A curva é expressa pela equação 7, cujo R^2 é 0,993.

$$y = 0,2865x - 0,0133$$

Eq. 7