

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO DAS SOJAS ORGÂNICA, TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL.**

LEANDRO DANIEL DE PARIS

TOLEDO – PR

2008

LEANDRO DANIEL DE PARIS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO DAS SOJAS ORGÂNICA, TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos.

Orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

TOLEDO - PR

2008

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

P232pa Paris, Leandro Daniel de
Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado
sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional / Leandro
Daniel de Paris. -- Toledo, PR : [s. n.], 2009.
115 f.

Orientador: Dr. Salah Din Mahmud Hasan
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) -
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo.
Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Microbiologia industrial 2. Engenharia bioquímica 3.
Fermentação 4. Fungos - Biotecnologia 5. Enzimas de fungos -
Aplicações industriais 6. Aspergillus - Biotecnologia 7. Soja -
Substrato I. Hasan, Salah Din Mahmud, Or. II. T

CDD 20. ed. 660.28449
660.63

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e coragem para enfrentar os obstáculos e seguir em frente.

Aos meus pais Orlando e Marta e aos meus irmãos Lucas e Orlando Jr., pelo apoio, compreensão e força nesta longa caminhada.

Ao Professor Dr. Salah D. M. Hasan, pela orientação e grande dedicação em todo o trabalho e, principalmente, pelo conhecimento transmitido a mim.

Aos colegas de pesquisa da graduação em Engenharia Química da UNIOESTE – Toledo, Ademir, Fabiano e Thiago, pela grande ajuda na realização deste trabalho.

À Fabiana, pelo companheirismo e dedicação e amor nestes anos.

Aos servidores da UNIOESTE – Toledo, pela indispensável colaboração.

À empresa Sadia de Toledo – PR, pelo fornecimento da soja.

Ao grupo de pesquisas Gemaq da UNIOESTE – Toledo, pela colaboração na utilização de equipamentos.

À empresa Prati, Donaduzzi, pela colaboração na doação de material utilizado na pesquisa.

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
NOMENCLATURA	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivos específicos	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Soja	4
2.1.1. Composição da soja	5
2.2. Fermentação em estado sólido (FES)	8
2.2.1. Microrganismos utilizados em FES.....	12
2.2.2. Substratos utilizados em FES	12
2.2.3. Produção de enzimas por FES	13
2.2.3.1. Amilase	14
2.2.3.2. Lipase	16
2.2.3.3. Protease.....	18
2.2.3.4. Celulase	21
2.2.3.5. Invertase	23
2.2.4. Fatores que afetam a produção enzimática por FES.....	25
2.2.4.1. Umidade.....	25
2.2.4.2. Temperatura.....	25
2.2.4.3. pH.....	26
2.2.4.4. Agitação e aeração	26
2.2.4.5. Tamanho de partícula	26
2.2.4.6. Concentração inicial do inóculo	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material	28
3.2. Preparo do inóculo.....	28
3.3. Preparo dos substratos	29
3.4. Fermentação em estado sólido (FES)	30
3.4.1. Preparo de soluções-tampão e solução nutriente.....	30

3.5. Extração das enzimas.....	31
3.6. Métodos analíticos	32
3.6.1. Determinação de gorduras	32
3.6.2. Determinação de proteínas.....	32
3.6.3. Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR).....	33
3.6.4. Determinação de AE e AE _{esp} da lipase	34
3.6.5. Determinação de AE e AE _{esp} da amilase	34
3.6.6. Determinação de AE e AE _{esp} da protease	35
3.6.7. Determinação de AE e AE _{esp} da celulase	35
3.6.8. Determinação de AE da invertase	36
3.6.9. Determinação de umidade.....	37
3.7. Otimização das condições do processo fermentativo.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Caracterização dos substratos.....	38
4.2. Curvas de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> para os três tipos de soja.....	42
4.3. Avaliação dos parâmetros operacionais da FES com <i>Aspergillus niger</i>	48
4.4. Estudo de otimização da FES.....	53
4.5. Avaliação da influência do pH inicial da FES.....	58
4.6. FES da soja convencional bruta e seu farelo com <i>Aspergillus clavatus</i>	63
4.7. Estudo da variação do pH e de fontes de nutrientes da FES com <i>Aspergillus</i> <i>casiellus</i>	73
4.8. Otimização dos parâmetros da FES com <i>Aspergillus casiellus</i>	82
4.9. Curvas de crescimento do <i>Aspergillus casiellus</i>	86
4.10. Comparação dos resultados obtidos.....	90
5. CONCLUSÕES	95
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema da semente de soja mostrando seus componentes	6
Figura 4.1. Perfis de açúcares redutores para as frações granulométricas das três sojas .	38
Figura 4.2. Perfis de açúcares redutores totais para as frações granulométricas das três sojas	39
Figura 4.3. Perfis de proteína para as frações granulométricas das três sojas.....	40
Figura 4.4. Perfis de gordura para as frações granulométricas das três sojas.....	41
Figura 4.5. Perfis de AE amilásica para as frações granulométricas das três sojas	42
Figura 4.6. Perfis de AE _{esp} proteolítica para as frações granulométricas das três sojas	42
Figura 4.7. Perfis de AR dos três tipos de soja fermentada	43
Figura 4.8. Perfis de ART dos três tipos de soja fermentada	43
Figura 4.9. Perfis de proteína dos três tipos de soja fermentada	44
Figura 4.10. Perfis de atividade proteásica dos fermentados	45
Figura 4.11. Perfis de atividade lipásica dos fermentados	46
Figura 4.12. Perfis de atividade amilásica dos fermentados	47
Figura 4.13. Gráficos de Pareto para o modelo obtido do planejamento completo 2 ³	51
Figura 4.14. Resíduos do modelo obtido pelo planejamento completo 2 ³	52
Figura 4.15. Superfícies de resposta: AE e AE _{esp} da protease em função de C ₀ e U	52
Figura 4.16. Gráficos de Pareto para o modelo obtido do planejamento DCCR	55
Figura 4.17. Resíduos do modelo obtido pelo planejamento DCCR	56
Figura 4.18. Superfícies de resposta: AE e AE _{esp} da protease em função de dp e pH	57
Figura 4.19. Perfis de AE e AE _{esp} para a protease em função do pH.....	58
Figura 4.20. Perfis de AE e AE _{esp} para a lipase em função do pH	59
Figura 4.21. Perfis de AE e AE _{esp} para a amilase em função do pH	60
Figura 4.22. Perfis de AE para a celulase comparativo a amilase em função do pH	62
Figura 4.23. Perfis de AE _{esp} para a celulase comparativo a amilase em função do pH	62
Figura 4.24. Perfis de ART para a soja convencional bruta e seu farelo.....	64
Figura 4.25. Perfis de proteína para a soja convencional bruta e seu farelo.....	64
Figura 4.26. Perfis de AE da protease para a soja convencional bruta e seu farelo	65
Figura 4.27. Perfis de AE _{esp} da protease para a soja convencional bruta e seu farelo	65
Figura 4.28. Perfis de AE e AE _{esp} da lipase para a soja convencional bruta e seu farelo ...	67
Figura 4.29. Perfis de AE da amilase para a soja convencional bruta e seu farelo.....	68
Figura 4.30. Perfis de AE _{esp} da amilase para a soja convencional bruta e seu farelo	69
Figura 4.31. Perfis de AE da celulase para a soja convencional bruta e seu farelo.....	70
Figura 4.32. Perfis de AE _{esp} da celulase para a soja convencional bruta e seu farelo	71

Figura 4.33. Perfis de AE e AE_{esp} da invertase para a soja convencional bruta e seu farelo	72
Figura 4.34. Resíduos do modelo do planejamento completo 2^{5-1}_v para a protease	77
Figura 4.35. Superfícies de resposta: AE e AE_{esp} da protease	77
Figura 4.36. Superfícies de resposta: AE e AE_{esp} da invertase	81
Figura 4.37. Superfícies de resposta: AE e AE_{esp} da protease	85
Figura 4.38. Perfil de ART para o farelo de soja convencional	86
Figura 4.39. Perfil de proteína para o farelo de soja convencional	87
Figura 4.40. Perfis de AE e AE e AE_{esp} da amilase para o farelo de soja convencional	87
Figura 4.41. Perfis de AE e AE e AE_{esp} da protease para o farelo de soja convencional	88
Figura 4.42. Perfis de AE e AE e AE_{esp} da invertase para o farelo de soja convencional	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição bioquímica da soja	7
Tabela 2.2. Comparativos entre Fsm e FES	10
Tabela 2.3. Aplicações industriais da FES	11
Tabela 3.1. Composição da solução nutriente	31
Tabela 4.1. Melhores resultados para as curvas de crescimento do <i>Aspergillus niger</i>	48
Tabela 4.2. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento completo 2^3 ..	48
Tabela 4.3. Matriz do planejamento completo 2^3	49
Tabela 4.4. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento completo 2^3 ..	50
Tabela 4.5. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da protease para o planejamento completo 2^3	50
Tabela 4.6. Análise de variância obtida para o planejamento completo 2^3 para AE e AE _{esp} ..	51
Tabela 4.7. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR	54
Tabela 4.8. Matriz do planejamento DCCR.....	54
Tabela 4.9. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento DCCR	54
Tabela 4.10. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da protease para o planejamento DCCR... ..	55
Tabela 4.11. Análise de variância obtida para o planejamento DCCR para AE e AE _{esp}	56
Tabela 4.12. Comparativo das produções de protease obtida neste trabalho	66
Tabela 4.13. Comparativo das produções de lipase obtida neste trabalho	67
Tabela 4.14. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento 2^{5-1}_v	73
Tabela 4.15. Matriz do planejamento 2^{5-1}_v	74
Tabela 4.16. Resultados para AE e AE _{esp} da protease, amilase e invertase	74
Tabela 4.17. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento 2^{5-1}_v	75
Tabela 4.18. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da protease para o planejamento 2^{5-1}_v	75
Tabela 4.19. Análise de variância obtida para o planejamento 2^{5-1}_v para AE e AE _{esp}	76
Tabela 4.20. Estimativa dos efeitos para AE da amilase para o planejamento 2^{5-1}_v	79
Tabela 4.21. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da amilase para o planejamento 2^{5-1}_v	79
Tabela 4.22. Estimativa dos efeitos para AE da invertase para o planejamento 2^{5-1}_v	80
Tabela 4.23. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da invertase para o planejamento 2^{5-1}_v	80
Tabela 4.24. Análise de variância obtida para o planejamento 2^{5-1}_v para AE e AE _{esp}	81
Tabela 4.25. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR	83
Tabela 4.26. Matriz do planejamento DCCR para a invertase.....	83
Tabela 4.27. Estimativa dos efeitos para AE da invertase para o planejamento DCCR.....	83
Tabela 4.28. Estimativa dos efeitos para AE _{esp} da invertase para o planejamento DCCR..	84
Tabela 4.29. Análise de variância obtida para o planejamento DCCR para AE e AE _{esp}	84

Tabela 4.30. Comparativo de valores para a atividade da protease	90
Tabela 4.31. Comparativo de valores para a atividade da lipase	91
Tabela 4.32. Comparativo de valores para a atividade da celulase.....	91
Tabela 4.33. Comparativo de valores para a atividade da amilase	92
Tabela 4.34. Comparativo de valores para a atividade da invertase	92

NOMENCLATURA

Abs – Absorbância
AE – Atividade enzimática (U)
AE_{esp} – Atividade enzimática específica (U/g proteína)
AR – Açúcares redutores (mg glicose/gms)
ART – Açúcares redutores totais (mg glicose/gms)
a_w – Atividade de água
B.S. – Base seca
BSA – Bovine Serum Albumine
B.U. – Base úmida
C_C – Concentração de carbono
C_{CeN} – Concentração de carbono e nitrogênio
C_N – Concentração de nitrogênio
C_{MIN} – Concentração de minerais
C_{esp} – Concentração de esporos (esporos/mL)
C₀ – Concentração inicial de inóculo (esporos/gms)
DCCR – Delineamento composto central rotacional
DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico
dp – Diâmetro de partícula (mm)
F_{calc} – F calculado (teste “F”)
Fonte de C – Fonte de carbono
Fonte de C e N – Fonte de carbono e nitrogênio
Fonte de min. – Fonte de minerais
Fonte de N – Fonte de nitrogênio
FES – Fermentação em estado sólido
Fsm – Fermentação submersa
F_{tab} – F tabelado (teste “F”)
GL – Graus de liberdade
gms – gramas de massa seca
gmu – gramas de massa úmida
MQ – Média quadrática
PDA – Potato dextrose ágar
SQ – Soma quadrática
U – Unidade de atividade enzimática
U – Umidade inicial do meio (%)

RESUMO

Dado o potencial regional do Oeste do Paraná para a produção de soja convencional, assim como a expansão das sojas orgânica e transgênica e também a ampla disponibilidade de componentes bioquímicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, lecitina, dentre outros, presentes no grão, torna-se interessante sua utilização como substratos para a fermentação em estado sólido (FES). Este processo, apesar de não ser tão utilizado industrialmente quanto à fermentação submersa (Fsm), pode ser uma alternativa viável, pois tem apresentado resultados superiores de produtividade, principalmente no cultivo de fungos filamentosos e na produção de enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de comparar a produção de diferentes tipos de enzimas utilizando as sojas convencional, transgênica e orgânica como substratos, por fermentação em estado sólido, utilizando diferentes tipos de fungos. Foram feitas também, a caracterização dos substratos utilizados no processo de fermentação para a produção das enzimas amilase, protease, lipase, celulase e invertase, avaliação das curvas de crescimento dos microrganismos e avaliação das condições ótimas de produção das enzimas utilizando planejamento fatorial. O farelo de soja convencional desengordurado também foi utilizado como substrato, para comparação da produção enzimática em relação à soja bruta (grão). Com a utilização do fungo *Aspergillus niger* sp., foram realizadas fermentações para construção de curvas de crescimento do microrganismo e seleção das melhores condições de produção da enzima protease (tipo de soja, umidade do meio fermentativo, pH, concentração inicial de inóculo, diâmetro de partícula do substrato e tempo de fermentação). Após a determinação das condições ótimas, o fungo *Aspergillus clavatus* foi utilizado para a realização da fermentação sob tais condições, onde novamente foram construídas curvas de crescimento, com o intuito de comparar a produção enzimática dos diferentes tipos de fungos. Pode-se observar uma grande variação na produção dos diferentes tipos de enzimas avaliados neste trabalho, sendo a soja convencional com umidade de 50%, tempo de fermentação de 144h, concentração inicial do inóculo de 4.10^6 esporos/gms e diâmetro de partícula de 0,6 mm as melhores condições para a produção da enzima protease. O pH do meio indicou atividades enzimáticas em diferentes níveis, sendo as maiores atividades obtidas em meio alcalino (pH 9,0). Em seguida, foram realizados estudos de otimização do meio fermentativo com adição de nutrientes e controle de pH, e construção das curvas de crescimento no ponto ótimo utilizando o fungo *Aspergillus casingii*, onde pode-se observar um aumento na produção da protease em relação às fermentações realizadas com *Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus*. Os resultados obtidos nos estudos mostraram que os melhores resultados foram observados na produção de protease, amilase e invertase, sendo interessante o uso da soja como substrato para a obtenção destas enzimas por FES. Para as demais enzimas, verificou-se uma baixa produção com a utilização da soja.

Palavras Chave: Fermentação em estado sólido, soja, enzimas, *Aspergillus*.

ABSTRACT

Given the potential of Western Paraná region for the production of conventional soybeans, as well as the expansion of organic and transgenic soybeans and the wide availability of biochemical components such as proteins, polysaccharides, lipids, carbohydrates, minerals, vitamins, fiber, lecithin, and others, present in grain, it makes interesting the use as substrates for solid state fermentation (SSF). This process, although not so used industrially as the submerged fermentation (SFm) may be a viable alternative, because it has shown better results in productivity, especially in the cultivation of filamentous fungi and the production of enzymes. The aim of this study was to compare the production of various enzymes using the conventional soybeans, as transgenic and organic substrates by solid state fermentation, using different types of fungi. Were also the characterization of substrates used in fermentation process for the production of the enzymes, evaluation of growth curves of microorganisms and evaluation of optimum conditions for production of enzymes using factorial design. The conventional defatted soybean meal was used as substrate for comparison of enzyme production on raw soybean (grain). Using the fungi *Aspergillus niger* sp., fermentations were carried out for construction of growth curves of microorganisms and selection of the best conditions for production of the enzyme protease (type of soybean, fermentation of the medium moisture, pH, initial concentration of inoculum, diameter particle of the substrate and time of fermentation). After determining the optimum conditions, the fungi *Aspergillus clavatus* was used to carry out the fermentation under these conditions, where again the growth curves were constructed in order to compare the enzyme production of different types of fungi. It can be seen a wide variation in the production of different types of enzymes evaluated in this study, the conventional soybean with moisture of 50%, time of 144h of fermentation, concentration of initial inoculum of $4 \cdot 10^6$ spores/gdw and particle diameter of 0,6 mm the best conditions for production of protease enzyme. The pH of the medium indicated enzymatic activities at different levels, and the highest activities obtained in alkaline medium (pH 9,0). Subsequently, studies were performed to optimize the fermentation medium with the addition of nutrients and pH control, and construction of growth curves of the optimal point using the fungi *Aspergillus casingii*, where you can see an increase in the production of protease for fermentation carried out with *Aspergillus niger* and *Aspergillus clavatus*. The results of studies showed that the best results were observed in the production of protease, amylase and invertase, and the interesting use of soybean as a substrate to obtain these enzymes by SSF. For the other enzymes, there was a low production using the soybean.

Key-words: solid state fermentation, soybean, enzymes, *Aspergillus*.

1. INTRODUÇÃO

A produção de soja é uma das principais culturas do Brasil, sendo o carro chefe da produção agrícola nacional. A região Oeste do Paraná se destaca como uma das líderes na produção do grão. A soja convencional é produzida pela maneira tradicional, bastante difundida em todo o mundo, com a utilização de técnicas adequadas ao plantio e adubos químicos e defensivos agrícolas. O cultivo de soja orgânica é realizado sem a presença destes adubos químicos e defensivos (herbicidas, fungicidas e inseticidas). Como este tipo de cultivo ganha muito espaço em nível mundial, o produto final, além de proporcionar benefícios e não agredir o meio ambiente, ainda possui um valor agregado mais alto do que o cultivo tradicional. No cultivo transgênico, a soja é modificada geneticamente em estudos laboratoriais com a finalidade de obter um produto com características novas ou melhoradas em relação ao produto original, como maior produtividade, melhor resistência a pragas e doenças, etc.

A soja é uma matéria-prima de custo acessível e que apresenta em sua composição importantes elementos bioquímicos (proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, isoflavonóides, dentre outros) que constituem excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos utilizados em processos como o da fermentação em estado sólido (FES).

Muitos grupos de microrganismos podem crescer em substrato sólido. Fungos filamentosos, entretanto possuem melhor capacidade de crescer na ausência de água livre. As bactérias e leveduras crescem preferencialmente na superfície enquanto os fungos filamentosos penetram nas partículas do substrato (PANDEY, 2003).

Algumas das principais vantagens da FES são a de poder ser conduzida sob condições não estéreis e sem problemas de contaminação, melhor transferência de oxigênio e menor degradação do produto, comuns aos processos submersos. Ainda, torna-se um processo interessante do ponto de vista econômico pelo fato de requerer condições mais brandas de assepsia, bem como a utilização de substratos de valor relativamente baixo e de fácil obtenção. Em contrapartida, apresenta algumas desvantagens, como o uso de microrganismos que crescem em baixos

níveis de umidade, dificuldades para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, escassez de dados e de projeto para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados (LONSANE *et al.*, 1992).

O processo da FES apresenta uma grande capacidade de produção de enzimas, tornando-se interessante pelo fato de se poder utilizar o sólido fermentado bruto como fonte direta para a obtenção das mesmas. Segundo LERAYER (1993), as enzimas são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria manufatureira. Muitos produtos alimentícios consumidos diariamente, entre os quais o pão e o queijo, são feitos com a colaboração desse tipo especial de proteína. Como suplemento de ração animal, desempenham importante papel por reduzirem a quantidade de resíduos. Também são empregadas em muitas atividades industriais, como produtos de limpeza, no processamento do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas, substituindo compostos ou processos químicos, etc. Caracterizam-se pela alta especificidade e eficiência e se fazem necessárias em apenas pequenas quantidades. Muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia.

Podem-se citar algumas enzimas com importante aplicação industrial, por exemplo: protease, celulase, xilanase, pectinase, amilase, glucoamilase, ligninase, lipase, etc. Estas enzimas podem ser aplicadas comercialmente, por exemplo, na indústria alimentícia, em biocombustíveis, produção de fármacos, ração animal, indústria têxtil, de detergentes. Diferentes gêneros de microrganismos podem ser utilizados para a produção destas enzimas, como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cerrena*, *Botritis*, *Gliocladium*, *Bacillus*, etc. Na produção de enzimas por FES, emprega-se comumente como substrato, uma grande diversidade de produtos e subprodutos oriundos da agroindústria, como farelo de milho, farelo de trigo, farelo de soja, polpa de coco, polpa de café, resíduo da indústria do vinho, farelo de arroz, batata e bagaço de cana (PANDEY *et al.*, 2000).

Algumas considerações importantes para o desenvolvimento da FES incluem a seleção adequada do substrato e microrganismo, otimização dos parâmetros do processo e separação e purificação dos produtos. De uma maneira geral, este é um processo que emerge como uma tecnologia em potencial para a produção de

diversos produtos de origem microbiana, principalmente para a produção de enzimas fúngicas (PANDEY, 2003).

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de uso das sojas orgânica, transgênica e convencional como substrato para a produção das enzimas lipase, amilase, protease, celulase e invertase, por meio de fermentação em estado sólido dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* sp., *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus casingii*.

1.1.1. Objetivos específicos

1. Caracterização dos substratos utilizados no processo de fermentação;
2. Produção das enzimas amilase, protease, lipase e celulase por FES pelo fungo *Aspergillus niger* e avaliação das curvas de crescimento;
3. Avaliação das condições ótimas de produção da enzima protease, utilizando planejamento fatorial;
4. Produção, determinação das condições ótimas de obtenção e avaliação das curvas de crescimento das enzimas amilase, protease, lipase, celulase e invertase por FES pelo fungo *Aspergillus clavatus*.
5. Produção, determinação das condições ótimas de obtenção e avaliação das curvas de crescimento das enzimas amilase, protease e invertase por FES pelo fungo *Aspergillus casingii*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Soja

Planta pertencente à família das leguminosas, como o feijão e a ervilha, a soja tem recebido várias denominações e o seu preciso posicionamento taxonômico foi sujeito a inúmeras controvérsias no passado. Atualmente, a soja cultivada é classificada como *Glycine Max* (L.) e pertence ao ramo *Fanerógama*, divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionidae* e ao gênero *Glycine* L. Seus produtos vêm sendo amplamente estudados devido não somente ao seu valor nutricional, mas também às suas propriedades funcionais na indústria de alimentos, e como alimento funcional, porque exerce ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos por meio de suas proteínas e isoflavonas (CIABOTTI *et al.*, 2006; MORAES & SILVA, 1996).

A primeira notícia sobre soja que se tem conhecimento no Brasil data de 1882, e relata resultados de testes feitos com algumas variedades na Bahia. Efetivamente, foi introduzida no país em 1908, em São Paulo, por intermédio de imigrantes japoneses, mas o verdadeiro impulso na produção ocorreu na década de 60, quando se iniciou o cultivo sucessivo trigo-soja no Rio Grande do Sul (MORAES & SILVA, 1996).

No Paraná, a produção passou de 8 mil toneladas na média dos anos 1960 e 1961, para 150 mil na média dos anos 1960, para 3,5 milhões na média dos anos 1970, para 4,15 milhões na média dos anos 1980 e para 6,5 milhões de toneladas na média dos anos 1990, consolidando o Paraná na segunda posição entre os maiores produtores, atrás apenas do Mato Grosso (fonte: Embrapa, 2004, citado por COSTA & ALMEIDA, 2007).

O valor nutritivo da soja foi confirmado por meio de resultados clínicos e análises químicas. Demonstrou-se que possui composição quase completa, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos complexos, oligossacarídeos, fibras solúveis e insolúveis, minerais e vitaminas e fitoquímicos. No entanto, associadamente existem os fatores antinutricionais: casca dura, não digerível pelos não-ruminantes, fatores que dificultam a digestão e outros que aumentam a necessidade de vitaminas e minerais. Esses inconvenientes têm sido quase

totalmente solucionados empregando-se as técnicas adequadas de processamento (STENZEL, 2007).

Dentre os diversos tipos de culturas orgânicas, crescentes no mundo, a soja vem ocupando um espaço importante no mercado europeu e, mais recentemente, no Brasil. Cultivada livre de produtos químicos como herbicidas, fungicidas e inseticidas, a soja orgânica também é um bom investimento para pequenos produtores. Apresenta um valor de comercialização mais elevado em relação à cultura convencional e um custo de produção mais baixo, além de não agredir o meio ambiente.

A soja transgênica, outra variedade com grande ascensão no mercado mundial, tem como característica principal a modificação genética, com o intuito de melhorar a qualidade do produto final, a resistência a ervas daninhas e agrotóxicos que possam interromper seu crescimento e, uma maior produtividade do grão. A melhora destas condições influenciaria de forma positiva a relação entre produção, custo e espaço físico requerido.

O farelo de soja, resíduo proveniente da indústria de extração de óleo, também apresenta grande potencial de comercialização, principalmente na composição alimentar de animais (ração), com baixo custo e considerável valor agregado. É amplamente utilizado em dieta alimentar de aves e suínos. O Paraná é um dos principais responsáveis pela produção nacional de soja e um importante fornecedor de farelo para a alimentação animal, destacando-se as regiões Oeste e Sudoeste do Estado (RIEGER *et al.*, 2008).

2.1.1. Composição da soja

A soja convencional possui composição quase completa, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e muitos minerais. Seu valor calórico é alto, com a vantagem deste não resultar de uma grande quantidade de amido; entretanto, é deficiente em vitaminas, e suas fibras estão contidas quase totalmente na casca. Ao lado de uma composição quase completa, no entanto, a soja impõe barreiras à sua utilização como alimento. Sua casca é dura, protegendo-a das enzimas digestivas dos não ruminantes, seu sabor é desagradável, existem fatores que aumentam as necessidades de fontes alternativas de vitaminas e minerais (STENZEL, 2007).

As frações de proteína e óleo da soja compreendem aproximadamente 60% do total da massa seca da semente. Os grãos maduros contêm cerca de 40,7% de proteína, 22,7% de óleo, 10,9% de açúcares totais, 6,7% de fibra e cerca de 5,8% de cinzas e 30,8% de carboidratos, em base seca (Costa *et al.*, 1974, citados por VIEIRA *et al.*, 1999). Com relação ao conteúdo de minerais na soja, López-Andreu *et al.* (1985), citados por VIEIRA *et al.* (1999) verificaram pouca diferença entre algumas cultivares plantadas nas mesmas condições de cultivo. De acordo com os resultados, os minerais mais abundantes foram K, P, Mg e Ca, com 1960; 629; 269,5 e 188,5 mg/100 g da amostra, respectivamente.

A despeito dos questionamentos dos efeitos adversos do consumo de soja transgênica, deve-se considerar também que essa leguminosa, na sua forma convencional, tem sido amplamente apontada como agente de prevenção ao câncer (Chen *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2005; Inakagi *et al.*, 2005, citados por AZEVEDO *et al.*, 2008).

Um esquema demonstrando os componentes da soja é apresentado na figura 2.1. Nos cotilédones (camadas intermediárias do grão) e hipocotilédones estão armazenadas as proteínas. Nas camadas mais externas do grão, onde se encontra a casca (tegumento), estão os maiores teores de carboidratos e material celulósico (MORAES & SILVA, 1996).

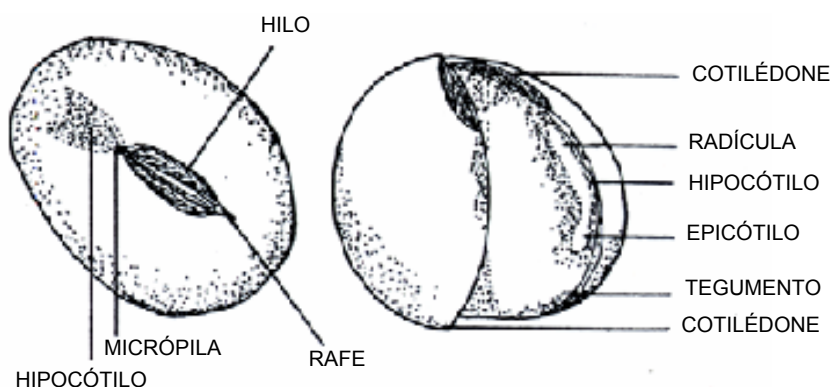


Figura 2.1. Esquema da semente de soja mostrando seus componentes. Fonte: Scott & Aldrich (1975), citados por MORAES & SILVA (1996).

A composição química da soja pode variar com as condições climáticas, tipo de solo, localização geográfica, variedades e práticas agronômicas, entre outros fatores. Os valores médios dos componentes básicos da soja estão relatados na tabela 2.1. Existe uma relação inversa entre os teores de proteínas e os de lipídeos

e carboidratos, ou seja, variedades com maior teor protéico têm menor quantidade de óleo e carboidrato (VIEIRA *et al.*, 1999).

Tabela 2.1. Composição bioquímica da soja (B.S.).

	Componente (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)	Cinza (%)
Soja integral	-	40,2	21,0	33,9	4,9
Cotilédone	90,3	42,8	22,8	29,4	5,0
Casca	7,3	8,8	1,0	85,9	4,3
Hipocotilédone	2,4	40,8	11,4	43,4	4,4

Fonte: Kawamura, citado por MORAES & SILVA, (1996).

Mais de 20% da soja é constituída por lipídeos como triglicérides, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e componentes insaponificáveis (esteróides, tocoferóis e a vitamina A). Contém aproximadamente 34% de carboidratos (4% de celulose, 15% de hemicelulose, 3,8% de estaquiose, 1,1 de rafinose, 5% de sacarose e 5,1% de outros açúcares). Os açúcares livres correspondem a 8% do total (60% de sacarose, 4% de rafinose e 36% de estaquiose). O amido é encontrado em sementes verdes, em pequenas quantidades. A casca contém a maior parte das fibras (40 a 53% de celulose, 14 a 33% de hemicelulose e 1 a 3% de lignina). Contém vitaminas solúveis em água e óleo, quando madura é ótima fonte de vitaminas E (tocoferol) e K, e boa fonte de riboflavina, ácido fólico e tiamina (SOYA HANDBOOK, 2003).

A soja apresenta grande quantidade de proteína e, de acordo com Berk (1992), 90% destas proteínas são globulinas, com solubilidade mínima em torno do pH 4,5. São distribuídas em 4 frações denominadas 2, 7, 11 e 15 “S”. A 2S corresponde a 10-20% do total e inclui vários inibidores da tripsina, citocromo “C” e numerosas enzimas. A 7S corresponde a 30-35% do total, contém 4 hemaglutinas, duas lipoxigenases e uma globulina conhecida como conglicina, que é uma proteína de armazenamento e representa 91% dessa fração. A 15S corresponde a 5-10% do total, é pouco conhecida, mas sabe-se que contém urease.

As hemaglutininas, assim chamada por causa de sua capacidade de aglutinar *in vitro* glóbulos vermelhos do sangue de várias espécies de animais, inclusive do homem, são glicoproteínas amplamente distribuídas no reino vegetal, principalmente entre as espécies da família das leguminosas, à qual pertence a soja (Silva, 1981, citado por STENZEL, 2007). Correspondem a 5% das proteínas da soja, e são

encontradas em vários vegetais com o objetivo de ligar carboidratos (MORAES & SILVA, 1996).

Em relação ao farelo de soja, sua composição química, nas regiões Oeste e Sudoeste do Paraná, apresenta pouca variação e os valores são próximos daqueles encontrados na literatura (RIEGER *et al.*, 2008). A indústria de soja pode produzir três tipos de farelo de soja com base no teor de proteína bruta. O farelo de soja com 44% de proteína bruta é obtido pela adição de casca de soja, proveniente da fabricação do farelo de soja com 48% proteína bruta, que é descascada antes da extração do óleo. Também existe o farelo de soja com 46% proteína bruta, no qual a quantidade de casca já se encontra no grão. Assim, pode-se considerar que a soja e seu resíduo apresentam características favoráveis, relacionadas à composição, que viabilizam a produção de enzimas por FES (Ministério da Agricultura, 1988, citado por GERBER *et al.*, 2006).

A soja apresenta, também, em sua constituição, diversos tipos de enzimas que influenciam a germinação da semente e seu crescimento. Algumas destas enzimas são as lipoxigenases, hidroperóxido liase, peroxigenase, hidroperóxido redutase, amilase, protease, tripsina, etc. (SILVA, 2004).

Nas sementes da soja, pode ocorrer um processo de deterioração, manifestado pela perda do vigor. Várias enzimas, tais como amilases, proteinases, lipases, desidrogenases e fosfatases apresentam redução de atividade em função do decréscimo da qualidade fisiológica das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994).

2.2. Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ele está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Del Bianchi *et al.*, 2001, citados por LIMA *et al.*, 2001).

Foi desenvolvida originalmente no Japão onde se utilizavam subprodutos como farelo de arroz e cascas de frutas com substrato. No estado do Paraná, desde 1986 o Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do

Paraná vem desenvolvendo pesquisas relacionadas à utilização de produtos e subprodutos agrícolas do Brasil em FES (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Entre as vantagens da FES, podem ser citadas algumas: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais, simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma (Soccol, 1994; Kolicheski, 1995; Vandenberghe, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003, citados por RODRIGUES, 2006).

Em comparação com o processo de fermentação submersa (FSm), a FES apresenta melhor transferência de oxigênio, pouco ou nenhum controle da assepsia do processo, maior disponibilidade de diferentes substratos, eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação (HASAN, 2002).

Por outro lado, o processo também oferece algumas desvantagens, as quais são: uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, escassez de dados e de projeto para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, dentre outras (PANDEY, 1991).

A tabela 2.2 apresenta algumas diferenças fundamentais em relação aos processos de Fsm e FES.

Segundo Barrios-Gonzales & Mejia (1996), pode-se distinguir dois tipos de FES, em função da natureza do suporte:

- Cultura sólida em uma fase substrato-suporte, onde a fase sólida é constituída por um material que possui função de suporte e fonte de nutrientes,
- Cultura sólida com uma fase suporte impregnada de um meio líquido. Neste tipo de fermentação, a fase sólida é considerada como um suporte inerte, que não constitui uma fonte de nutrientes para os microrganismos, mas serve de reservatório para uma solução nutritiva que estará adsorvida na matriz sólida.

Tabela 2.2. Comparativos entre Fsm e FES.

Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Profundidade do meio limitada	Profundidade do meio variável como biorreator
Consumo limitado de água, baixa a_w , sem efluentes	Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Aeração requer elevado fluxo	Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Condições estáticas	Boa homogeneização
Necessita projetos	Equipamentos industriais disponíveis
Inoculação de esporos em batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

Fonte: Holker *et al.*, 2004; Raimbault, 1997; Roussos *et al.*, 2003, citados por RODRIGUES, 2006.

Os processos de fermentação no estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (Castilho *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 1992, citados por MACIEL, 2006). Vários resíduos oriundos da agroindústria, como bagaço de mandioca, polpa e casca de café, polpa de maçã, soja e resíduo de batata vem sendo usados em FES com diferentes tipos de microrganismos por pesquisadores, para a produção, por exemplo, de ácidos orgânicos.

Segundo Pandey *et al.* (2000), a partir da década de 90, houve um aumento sem precedentes no interesse em relação à fermentação em estado sólido, para o desenvolvimento de bioprocessos, tais como a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação e enriquecimento nutricional de culturas e de resíduos de culturas,

obtenção de produtos com grande valor agregado, tais como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento de plantas, etc. Podem-se citar também as enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustível e compostos aromáticos.

A tabela 2.3 apresenta algumas aplicações industriais onde há o emprego do processo de fermentação em estado sólido.

Tabela 2.3. Aplicações industriais da FES

Aplicações	Exemplos
Alimentos fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos
Bioconversão de resíduos	Bagaço de cana, polpa de café
Aditivos de alimentos	Flavorizantes, corantes, óleos essenciais
Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i>
Crescimento de plantas, hormônios	<i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i> , Giberelina
Produção de enzimas	Amilase, celulase, protease, pectinases, xilanases
Fármacos	Penicilina e probióticos
Produção de ácidos orgânicos	Ácido cítrico, fumárico, gálico, láctico, giberélico
Fermentação alcoólica	<i>Schwanniomyces</i> sp., malteação
Metabólitos fúngicos	Hormônios e alcalóides

Fonte: RAIMBAULT, 1998.

Outro fator relevante apresentado pelo processo de FES refere-se ao custo do processo. Castilho *et al.* (2000), analisando o custo da produção da enzima lipase por Fsm e FES, concluíram que o total de capital necessário para a produção de 100 m³/ano de concentrado de lipase foi 78% maior para o processo submerso, em relação ao processo em estado sólido, sendo que o custo unitário de produção foi 68% maior que o preço de venda. Para o processo em estado sólido, o custo unitário foi 47% menor que o preço de venda.

2.2.1. Microrganismos utilizados em FES

A dificuldade na escolha de microrganismos capazes de crescer sob condições de baixa umidade, condições controladas de umidade, pH e fluxo de ar é uma das limitações impostas pelo processo de FES (MAHADIK *et al.*, 2002).

De acordo com Pandey (1992), citado por HASAN (2002), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (*Polysporus*).

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um bom crescimento em concentrações elevadas de açúcar e sal, portanto em muitos alimentos com baixo teor de atividade de água. Os conídios desse gênero de fungo possuem uma coloração esverdeada e seus ascósporos se encontram dentro de ascas cujos peritécios têm cor que varia de amarelo a avermelhado (FRAZIER & WESTHOFF, 1993).

PANDEY (1992) cita que culturas de fungos em substratos sólidos comportam-se de modo distinto à fermentação submersa. A repressão catabólica, geralmente observada no processo submerso, pode ser contornada pelo uso da fermentação semi-sólida. No caso, por exemplo, do *Aspergillus niger* as cepas podem crescer em FES com a vantagem de que as atividade enzimáticas e a produtividade geralmente são maiores, havendo tendência à secreção mais rápida de enzimas se comparada com a técnica FSm.

2.2.2. Substratos utilizados em FES

Comumente utilizam-se produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, que tem como característica servir de matriz sólida e fornecer carbono e fontes de energia para o crescimento do microrganismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo. Pode-se também incorporar solução nutriente ao substrato, com o intuito de adequá-lo às condições nutricionais do microrganismo. A granulometria deve ser adequada para proporcionar maior grau de conversão e dissipação de calor e gases produzidos.

De acordo com Schmidell *et al.* (2001), pode-se exemplificar o uso das seguintes matérias no processo de FES:

- Farelo e palha de trigo, farinha e farelo de soja, manipueira, palha e quirera de arroz, bagaço de cana, dentre outros, para a produção de enzimas;
- Resíduos de banana e mandioca, bagaços de laranja e maçã, grão-de-bico, polpa de café, cana-de-açúcar, arroz cozido, dentre outros, para obtenção de enriquecimento protéico;
- Sorgo, bagaço de maçã, bagaço de uva, melaço e cana-de-açúcar, dentre outros, para a produção de álcool;
- Farelo de trigo, beterraba, bagaço de cana e melaço para a produção de ácidos orgânicos;
- Soja, peixe e mandioca, dentre outros, para a elaboração de alimentos e condimentos.

Normalmente, o substrato necessita de um pré-tratamento para adequar-se às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelo microrganismo. Schmidell *et al.* (2001) citam alguns destes pré-tratamentos utilizados para a realização do processo de FES, os quais são:

- Esmagamento, quebra, moagem e peneiramento, visando a adequação da granulometria;
- Suplementação de nutrientes e correção de pH;
- Hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico;
- Embebição, para regular o teor e umidade inicial do processo;
- Adição de agente seqüestrante, com o objetivo de retirar íons metálicos do meio;
- Esterilização, visando diminuir ou eliminar possíveis contaminações.

2.2.3. Produção de enzimas por FES

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão, movimentando bilhões de dólares por ano (VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Até 2001, conheciam-se aproximadamente 4000 enzimas, e destas, cerca de 200 foram comercializadas, sendo que a maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (SHARMA *et al.*, 2001).

Comparando a produtividade volumétrica obtida nos processos submersos em relação ao processo em estado sólido, a FES tem apresentado grande superioridade na produção de enzimas (Meira *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2003,

citados por VARGAS, 2004), com um desempenho 10 vezes maior (DURAND, 2003).

Dentre as várias enzimas produzidas por FES, podem ser citadas a celulase (Aguiar & Menezes, 2000; Camassola & Dillon, 2007; Gao *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2002), amilase (Cordeiro *et al.*, 2002; Guandalini, 2007), lipase (Azeredo *et al.*, 2007; Castilho, *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 1997), protease (Basu *et al.*, 2008; Merheb *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008) e invertase (Shaheen, 2008; Montiel-González *et al.*, 2004).

2.2.3.1. Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, pertencendo à classe das hidrolases, dentre as quais encontram-se a α -amilase, a β -amilase e a amilase. Esta última produz glicose a partir do amido, a β -amilase produz maltose e a α -amilase dá origem às dextrinas. Estas enzimas possuem grande importância biotecnológica com aplicações em alimentos, fermentação, indústria têxtil e de papel.

Podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos. De acordo com Gupta *et al.*, 2003, atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem substituído quase completamente a hidrólise química do amido, e com grande aplicação industrial, como na produção de detergentes e produtos de limpeza, panificação, bebidas, na indústria de papel e celulose e na alimentação animal. Segundo o mesmo autor, as amilases são divididas em dois grupos, as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e dessa forma quebram as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina. A α -amilase é a endoamilase mais conhecida. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1, 4, como a β -amilase ou ambas as ligações α -1,4 e α -1, 6, como a amiloglicosidase e a glicosidase. Outros exemplos de exoamilases são a ciclomaltodextrina-glicosil-transferase (CGTase) e a α -amilase maltogênica (glicano 1,4- α -glicanohidrolase).

Segundo Tanyildizi *et al.* (2005), as α -amilases encontram grande aplicação em processos alimentícios e têxteis. Segundo o mesmo autor, a produção desta

enzima é economicamente importante e essencial para a conversão de amido em oligossacarídeos.

A α -amilase e a ciclomaltodextrina-glicosil-transferase são enzimas importantes na sacarificação de amido e, observou-se que a combinação de ambas promove acréscimo na produção de açúcares livres. A CGTase pode ser aplicada na hidrólise de amido para a obtenção de sacarídeos fosforilados, que são capazes de reagir com minerais como cálcio, magnésio e ferro para formar complexos, que previnem a insolubilização destes minerais na alimentação animal (AGUIAR, 2001).

Na produção de amiloglicosidase por FES pelo fungo *Aspergillus awamori*, Bertolin *et al.* (2001) utilizaram maltose e amido solúvel como fontes secundárias de carbono. Durante o processo em batelada, 2,5% (m/m) de maltose reprimiram a produção de glucoamilase. Mas, quando adicionado 2,5% (m/m) de maltose ou 1,25% (m/m) de amido solúvel, em batelada alimentada, a atividade enzimática da glucoamilase aumentou em 15% e 170%, respectivamente. Os autores concluíram, então, que a maltose é um fraco indutor para a produção de amiloglicosidase por FES.

No estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*, Guandalini (2007) observou, para a produção de α -amilase e amiloglicosidase, um meio de cultivo ótimo constituído por farelo e casca de arroz na proporção 6/4 (m/m), com umidade de 47%. O pH ótimo para a atividade de α -amilase e de amiloglicosidase foi de 5 a 5,5, apresentando estabilidade numa faixa de 5 a 6,5 para a α -amilase e de 5,5 a 6 para a amiloglicosidase. A temperatura ótima para a atividade enzimática de α -amilase foi de 70°C e de 60°C para a amiloglicosidase, apresentando estabilidade numa faixa de 10 a 50°C. O autor concluiu que o pH apresenta influência na produção de α -amilase, sendo que a atividade desta enzima foi influenciada positivamente pelos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{2+} e Ca^{2+} e, negativamente pelo íon Zn^{2+} .

Spier (2005), na produção de α -amilase e amiloglicosidase fúngicas por fermentação em estado sólido, observou uma máxima produção, utilizando o fungo *Aspergillus niger*, para as seguintes condições de processo: 30-32°C fermentação; proporção de substrato fécula/bagaço (2/1); 90% umidade inicial; 10% fonte de nitrogênio inorgânico (KNO_3); 30% solução salina, $\leq 5\%$ $CaCO_3$; 5% fécula e $1,0\text{--}5,5 \times 10^7$ esporos/gms; 60h de fermentação; pH inicial 4,0. As melhores condições de extração foram: agitador tipo *shaker* a 30°C, 120 rpm e 1h de agitação. Em

comparação com a FES conduzida em erlenmeyers, o autor observou uma produção de amiloglicosidase 22,12% maior e de α -amilase 19,9% maior no processo conduzido em bandejas.

Francis *et al.* (2003), na otimização da temperatura de incubação, umidade inicial do substrato e quantidade de inóculo, pela metodologia de superfície de resposta, para a produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* utilizando fermentação de estado sólido, obtiveram uma temperatura de incubação de 30°C, uma umidade inicial de 70% e uma concentração de inóculo de 1.10^7 esporos/gms. Sob estas condições, observaram também cerca de 20% de aumento no rendimento de produção.

2.2.3.2. Lipase

As lipases são enzimas que catalisam reações de substratos insolúveis em água e a hidrólise de acilgliceróis para ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Alvarez-Macarie *et al.*, 1999; Mahadik *et al.*, 2002, citados por PINHEIRO, 2006). Estima-se que atualmente cerca de 3% das enzimas utilizadas no mundo sejam lipases e o maior mercado produtor de enzimas é a Dinamarca, com cerca de 50% da produção mundial de enzimas comerciais (MALDONADO, 2006).

As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura. A otimização das condições de fermentação para as lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima, bem como na proporção de lipase extracelular e intracelular (WOOLEY & PETERSON, 1994).

In vitro, as lipases também atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (FERNANDES, 2007).

Lipases apresentam grande relevância médica, principalmente em relação à arterosclerose e à hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação –

ácidos graxos livres e diacilgliceróis – têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (FAROOQUI *et al.* 1987).

Segundo Jaeger & Eggert, 2002 e Sharma *et al.*, 2001, a lipase é uma enzima extremamente versátil, sendo amplamente utilizada em aplicações industriais, como na fabricação de derivados do leite e alimentos, indústria de couro e detergentes, produção de cosméticos e produtos farmacêuticos e reações de síntese orgânica, especialmente em meio não aquoso.

De acordo com Sun & Xu (2008), etil ésteres de ácidos graxos de cadeia curta são um grande grupo de compostos de sabor e aroma, amplamente utilizados na indústria de alimentos, bebidas, cosméticos e indústrias farmacêuticas, com uma produção anual de 7000 toneladas e receita de vendas de 100 milhões de yuans. Hoje em dia na China, a maior parte destes ésteres são sintetizados por meio de reação química sob condições extremas de temperatura e pressão, elevando a poluição ambiental e oferecendo riscos operacionais. Usando células de lipase produzidas por *Rhizopus chinensis* como um substituto dos métodos químicos para a obtenção destes ésteres, poder-se-ia resolver o problema, uma vez que o conjunto de células lipolíticas apresentou grande eficiência na síntese de ésteres de sabor, catalisando reações mais específicas com o maior rendimento.

Na produção de lipase por fermentação no estado sólido pela *Burkholderia cepacia*, Fernandes (2007), utilizando farelo de semente de girassol como substrato, obteve 240 U/gms nas condições de 55% (m/m, base úmida) de umidade e 29°C, após 72h de fermentação. Concluiu, então, a viabilidade de utilização de sólidos fermentados diretamente em reações de síntese de ésteres em solventes orgânicos.

Rodriguez *et al.* (2006), na produção de lipase por *Rhizopus homothallicus* por FES, utilizando bagaço de cana como substrato observaram uma produção máxima em 12h de incubação. Estes resultados se mostraram promissores pelo fato da espécie ter produzido lipase em elevada concentração em um meio barato e simples, o que facilita sua recuperação e purificação.

Na produção de lipase por FES utilizando uma espécie brasileira de *Penicillium restrictum* e torta de óleo de babaçu como substrato, Gombert *et al.* (1999) obtiveram uma atividade lipásica de 30,3 U/gms, após 24h de cultivo, com enriquecimento do meio pela adição de 2% de azeite de oliva. Os autores concluíram que a atividade lipásica se mostrou extremamente sensível ao nível de suplementação do meio.

Kempka *et al.* (2008) estudaram a otimização da produção e caracterização da lipase produzida por FES pelo fungo *Penicillium verrucosum*. Observaram que a temperatura e a umidade inicial do substrato foram os principais fatores que afetaram a produção enzimática. A temperatura otimizada do cultivo (27,5°C) e umidade inicial de substrato (55%) foram determinados utilizando a metodologia de superfície de resposta. O extrato bruto enzimático mostrou atividade ótima no intervalo de 30 a 45°C e em pH 7,0. Desta forma, o fungo e o substrato utilizados no processo apresentaram bom desempenho na produção enzimática, segundo os autores.

Cavalcanti *et al.* (2005) estudaram a produção de lipase em reator de leito fixo utilizando *Penicillium simplicissimum* na fermentação em estado sólido. Foi demonstrado que uma maior atividade de lipase pode ser obtida em menores temperaturas e elevadas taxas de fluxo de ar. O valor máximo da atividade de lipase foi obtido à temperatura de 27°C e fluxo de ar de 0,8 L/min.

Investigando a produção de lipase por *Penicillium simplicissimum*, Vargas (2004) observou uma produção ótima por FES a 27,5°C e 55% de umidade do meio, utilizando torta de soja como substrato, onde constatou a atividade ótima do processo. Temperatura e pH foram os principais fatores que afetaram a produção da enzima, segundo o autor.

2.2.3.3. Proteases

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteases catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Uma vez que são fisiologicamente necessárias para organismos vivos, as proteases são ubíquas, sendo encontradas numa ampla diversidade de fontes como plantas, animais e microrganismos (RAO *et al.*, 1998).

Scheuer (1990) e Ikasari & Mitchell (1996) citam que a protease constitui um dos grupos mais importantes comercialmente de enzimas microbianas extracelulares, sendo amplamente usadas em diversos setores industriais, particularmente na indústria alimentícia, farmacêutica, de detergentes, produtos químicos, couro e seda, além da panificação, laticínios, destilação, cervejas,

processamento industrial de proteínas, sínteses orgânicas, dentre outras, estimando cerca de 60% do total de enzimas comercializadas no mundo.

Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de protease microbiana esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção. Recentemente, vários resíduos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção destas enzimas em larga escala (NASCIMENTO & MARTINS, 2006).

Guerra (1991) citado por BALSAN (2004) classificou as proteases microbianas como ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas possuem atividade na faixa de pH 2,0 a 5,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados, onde são utilizadas na produção de alimentos. As proteases neutras possuem atividade entre pH 7,0 a 8,0. São metaloenzimas e necessitam de Ca^{++} para sua estabilidade e 1 mol de Zn/mol de enzima para sua atividade. Já as proteases alcalinas têm pH de atividade entre 9,0 e 11,0, sendo usadas na produção de detergentes industriais, por possuírem serina em seu centro ativo (proteases serínicas). Segundo Chauhan & Gupta (2003), as enzimas utilizadas na indústria de detergentes compreendem cerca de 37% do mercado mundial enzima.

As proteases de origem microbiana têm a maior importância comercial; 75% dessas proteases são usadas em detergentes. Outras aplicações são o curtimento de couros e o processamento de alimentos. Várias proteases apresentam especificidades múltiplas - são ativas em diferentes substratos, em valores de pH diferentes. As proteases serínicas, que são estáveis sob condições alcalinas, são usadas como ingredientes ativos no sabão em pó. A subtilisina Carlsberg, uma protease obtida do *Bacillus licheniformis*, tem sido produzida desde 1960. Não precisa de cálcio para a ativação e a enzima permanece estável na presença de agentes complexantes. As proteases serínicas também podem ser obtidas de fungos, tais como cepas de *Aspergillus*. A maioria das proteases fúngicas técnicas pertencem às proteases alcalinas. As metaloproteases neutras de fungos e bactérias dependem de um ou mais átomos de metal (geralmente zinco) em seu sítio ativo. As suas reações hidrolíticas sobre as cadeias peptídicas são relativamente inespecíficas, mas as cadeias hidrofóbicas laterais são preferíveis. Seu pH ótimo

está por volta de 7. As proteases carboxílicas são proteases ácidas com um sítio ativo dependendo dos grupos carboxílicos, como o ácido aspártico. As proteases carboxílicas exoativas também podem ser produzidas por cepas de *Aspergillus* (BUSCHLE-DILLER, 2003).

Além de sua utilização na indústria de detergentes, a aplicação das proteases alcalinas também pode se estender à indústria de carne, preparação de adubos orgânicos, e também para a recuperação de prata utilizada em filmes de raios-X (CHELLAPPAN *et al.*, 2006).

Na produção e purificação de protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191, Santos (2004) obteve uma maior produção em temperaturas entre 20 e 27°C, após 24h de fermentação. A produção da protease foi aumentada cerca de 36 vezes após a otimização do meio de cultura e das condições de fermentação.

Thys *et al.* (2006) estudaram a otimização da produção de protease por *Micobacterium* sp. por planejamentos experimentais. As condições de processo foram: 37°C, pH inicial 7,0, utilizando farinha de pena como substrato. As melhores condições foram 25 °C, pH inicial 7,0 e concentração de 12,5 g/L de farinha de pena, obtendo assim uma atividade proteásica de 202,7 U/mL. Observaram que a temperatura foi o fator que apresentou maior influência na produção da enzima.

Em um estudo comparativo entre FES e Fsm, sobre a produção de protease neutra, Sandhya *et al.* (2005) observaram que os melhores resultados foram obtidos em FES, com uma umidade inicial do meio de 43,6%, concentração de inóculo do fungo *Aspergillus oryzae* de 8.10^8 esporos, e incubadas a 30°C por 72h, utilizando farelo de trigo como substrato. Pelo processo de Fsm, com um pH do meio de 7,5, contendo 2% (m/m) de farelo de trigo e incubados a 30°C e 180 rpm durante 72h, observaram um rendimento de 8,7 U/gmu. Isto exemplifica a maior produtividade da FES, comparativamente à Fsm.

Utilizando farelo de arroz como substrato para a produção de protease por FES, pelo *Rhizopus* sp., com uma umidade inicial de 44,44%, temperatura de 30°C, durante 72h de incubação, Sumantha *et al.* (2006) obtiveram a máxima produtividade da enzima metaloprotease, ativada por Mn_2^+ , sob condições otimizadas de temperatura (60°C) e pH (7,0). Os autores observaram que a adição de uma fonte extra de carbono (caseína) ocasiona um aumento na produção da enzima.

Prakasham, Rao & Sarma (2006) produziram protease alcalina por FES utilizando *Bacillus* sp. e grama como substrato. Obtiveram a máxima produção enzimática em meio otimizado, o qual foi: pH 9,0, umidade 140% e tempo de incubação de 60h e notaram uma melhora no rendimento do processo pela adição de fontes suplementares de carbono e hidrogênio ao meio fermentativo.

2.2.3.4. Celulases

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. A maioria dos estudos do complexo celulase referem-se a enzimas microbianas devido ao potencial de converter material celulósico insolúvel em glicose. O complexo celulase, oriundo de microrganismos, animais e plantas, é formado por C1-celulase, C2-celobiase e exocelulase.

De acordo com Peixoto (2006) as enzimas do Complexo Celulase podem ser divididas em:

1. Endo- β (1-4) glucanase ou β (1-4) D-glucano-4-glucanohidrolase ou Cx celulase ou CMCase: hidrolisa ligações β (1-4) ao acaso dentro da cadeia de celulose liberando glicose, celobiose e celodextrinas. Atua na região amorfa. A degradação da celulose insolúvel ou microcristalina até celulose solúvel ainda é pouco entendida. Considera-se que a endo- β (1-4) glucanase modifica a parte amorfa da celulose e produz celodextrinas de variadas massas moleculares. Ocorre redução rápida da viscosidade e aumento do poder redutor;
2. Exo- β (1-4) glucanase ou Avicelase ou exo glucana-4-glucanohidrolase ou C1 celulase: hidrolisa as ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade não redutora liberando celobiose;
3. Celobiase ou β (1-4) glicosidase: hidrolisa as ligações do tipo β (1-4) (celobiose, trealose, gentiobiose) e libera glicose;
4. Exo- β (1-4) D-glucana-glicohidrolase: hidrolisa as ligações β (1-4) glicosídicas de celodextrinas e libera glicose. A atividade diminui com a diminuição da cadeia do substrato.

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e

clarificação de sucos de frutas cítricas. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Atualmente, a maioria das celulases microbianas comercialmente utilizadas são produzidas pelas espécies *Trichoderma* e *Aspergillus*. O potencial de mercado destas enzimas tem sido estimado em cerca de 400 milhões de dólares por ano, com crescente aplicação na produção e desenvolvimento de biocombustíveis (ZANG, HIMMEL & MIELENZ, 2006).

A celulase de origem fúngica é produzida quando o microrganismo é inoculado em meios de culturas que contenham celulose, sefarose (polissacarídeo bastante utilizado na produção de resinas para a purificação de proteínas), lactose ou celobiose como fonte de carbono. A glicose, utilizada como fonte de carbono, não serve como indutora da produção de celulases e, ainda, reprime fortemente a produção dessa enzima mesmo na presença de indutores. A maior produtividade é obtida quando se utiliza a celulose na forma pura (cristalina) ou complexada (PEIXOTO, 2006).

Gao *et al.* (2008) citam que a comunidade científica tem forte interesse nas celulases e suas aplicações industriais: extração de suco de frutas, indústria de celulose e papel, indústria têxtil, etc. Entretanto, um grande problema se apresenta, referente ao custo de produção da enzima. Logo, o mesmo autor indica que uma produção de celulases por meio fermentativo sólido seria uma boa alternativa, já que os microrganismos são exímios produtores desta enzima.

Camassola & Dillon (2007), na produção de celulase fúngica por FES, comentam que na produção de bioetanol, é necessário reduzir os custos das enzimas utilizadas para a hidrólise do material cru, e aumentar a sua eficiência, a fim de tornar o processo economicamente viável. Além disso, existe um interesse geral na obtenção de novas enzimas, mais específicas e estáveis, além da possibilidade de reciclar toda ou parte das enzimas. Os autores obtiveram uma máxima atividade da enzima utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato, por FES pelo fungo *Penicillium echinulatum*. Concluíram, então, que a aplicação de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas

lignocelulolíticas por FES diminui os custos do processo de produção, beneficiando economicamente a produção de etanol.

Na produção de celulase bacteriana por FES, Krishna (1999) utilizou resíduo de banana como substrato, abundante em países tropicais e rico em material lignocelulósico. A produção da enzima, realizada pela bactéria *Bacillus subtilis* apresentou valores ótimos de atividade em papel filtro (2,8 U/gmu), CMCase (9,6 U/gmu) e celobiase (4,5 U/gmu), com umidade inicial do meio de 70%, pH 7,0, temperatura de incubação de 35°C, 72h de incubação de tamanho de partícula de 400µm. A produtividade enzimática obtida pelo processo em estado sólido foi 12 vezes maior que a obtida por Fsm, indicando a eficiência do processo.

Heck *et al.* (2002) verificaram a produção de celulase e xilanase por *Bacillus subtilis* por cultivo semi-sólido, utilizando resíduos da indústria da soja como substrato. A maior atividade específica para a celulase foi obtida em 24h de cultivo. Os resultados indicam que os microrganismos selecionados e o processo de cultivo empregado utilizando resíduo da soja apresentam grande potencial biotecnológico.

Csiszar, Szakacs & Koczka (2007) investigaram a biopreparação de tecidos de algodão por FES, utilizando *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus giganteus* e *Trichoderma virens*. As fibras de algodão são ricas em lignicelulose, celulose e hemicelulose, um excelente substrato para a produção de celulases, que podem ser utilizadas para degradar impurezas presentes no tecido. Os ensaios indicaram que o fungo *Aspergillus oryzae* apresentou a maior produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas, bem como grande redução de fragmentos encontrados nos tecidos brutos.

2.2.3.5. Invertase

A invertase (β -D-frutofuranosidase) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais, de glicose e frutose. A mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar o plano de luz polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução aquosa de sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro). É uma enzima que hidrolisa a ligação osídica (tipo $\alpha\beta$) de carboidratos possuidores de um radical β -

fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose seu substrato preferencial (PARAZZI Jr., 2006).

Segundo Shaheen, Bhatti & Ashraf (2008), a invertase é uma das mais importantes enzimas comerciais usada na indústria de alimentos, sendo uma das primeiras proteínas identificada como biocatalisador. A mistura hidrolisada de açúcares obtidos pela invertase apresenta a vantagem de ser incolor, em contraste com o produto obtido por hidrólise ácida. Invertase proveniente de diferentes fontes é utilizada para a síntese de xarope de frutose, com diversas aplicações industriais, como a alimentação de abelhas, biscoitos, produção de ácidos orgânicos, chocolate e produção de álcool. Porém, sua grande aplicação é na fabricação do açúcar invertido, que tem grande importância industrial por possuir poder adoçante superior ao da sacarose.

Existem várias fontes de invertase, tais como, leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, mas a principal fonte de produção industrial são as leveduras. A invertase de levedura apresenta-se em duas formas, sendo 80% externas, localizadas entre a membrana plasmática e a parede celular e os 20% restantes são intracelulares, desprovidas de carboidratos e localizadas no protoplasma (ISIK *et al.*, 2003).

Diferentes metodologias têm sido propostas para aumentar a liberação da enzima no meio de cultura. O uso de indutores enzimáticos, como a rafinose, tem apresentado resultados positivos. A utilização de ultrassom também tem sido empregada com sucesso para a liberação de invertase intracelular.

Montiel-González *et al.* (2004), no estudo da influência de atividade de água na produção de invertase por FES a partir de uma espécie selvagem de *Aspergillus niger* observaram uma maior produção (31,10 U/mL) para a_w de 0,99.

Shaheen, Bhatti & Ashraf (2008) obtiveram uma máxima produção de invertase com adição de fonte de nitrogênio, na produção, purificação e caracterização térmica da enzima utilizando *Fusarium* sp. pelo cultivo em estado sólido. Observaram a inativação da enzima a altas temperaturas (>50°C).

Avaliando a produção de enzimas fúngicas por FES em relação à Fsm, utilizando *Aspergillus niger*, Viniegra-González *et al.* (2003) obtiveram um rendimento de invertase muito superior no processo em estado sólido. A produtividade por FES foi de, aproximadamente, 120 U/h.L, enquanto no processo submerso, observaram uma produtividade de, aproximadamente, 15 U/h.L.

2.2.4. Fatores que afetam a produção enzimática por FES

2.2.4.1. Umidade

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a fermentação em estado sólido. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar.

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado. Além disso, a alta umidade resulta num decréscimo da porosidade, o que impede a penetração do oxigênio. Isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale mencionar que, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado. A umidade na fermentação sólida pode variar de 18 a 85%, variando em função da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (Del Bianchi *et al.*, 2001, citados por LIMA, *et al.*, 2001).

2.2.4.2. Temperatura

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos microrganismos. Uma das grandes dificuldades dos processos de FES é a remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada. Para a FES em larga escala, o problema se agrava e, os equipamentos para refrigeração mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico (HASAN, 2002).

Pode-se contornar este problema com a introdução de ar comprimido através do meio de cultura, para produções industriais, controle de temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.2.4.3. pH

O controle do pH durante a FES, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.2.4.4. Agitação e aeração

O emprego de agitação em FES pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer a exaustão de gases e a troca de calor do meio. Porém, pode interferir na formação dos esporos, devido à fragmentação do micélio. A interface sólido/gás deve permitir a troca de gases, pois o consumo de oxigênio e a formação de dióxido de carbono são muito elevados em FES (SCHMIDELL *et al.*, 2001; SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1992).

2.2.4.5. Tamanho de partícula

Um importante fator, que encontra-se associado à troca de gases e que, por conseqüência, afeta o crescimento microbiano, é o tamanho da partícula do substrato. Geralmente, substratos com menor tamanho de partícula fornecem maior área de contato, favorecendo o crescimento do microrganismo. Por outro lado, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração do meio fermentativo, o que pode afetar a condição respiração/aeração, resultando num baixo crescimento microbiano. Ao mesmo tempo, partículas maiores de substrato oferecem melhores condições de respiração/aeração, mas fornecem também superfície limitada para o crescimento do microrganismo. Logo, é importante determinar o tamanho adequado de partícula para satisfazer a condição respiração/aeração e o crescimento microbiano (HASAN, 2002).

2.2.4.6. Concentração inicial do inóculo

De acordo com Sandhya *et al.* (2005), o tamanho do inóculo é um importante fator biológico, o qual determinará a biomassa produzida pela fermentação.

Uyar & Baysal (2003) avaliaram como um importante fator a concentração do inóculo na produção de protease alcalina por *Bacillus* sp. Concluíram que o aumento do nível de inóculo, variando entre 10 e 35%, diminuiu a produção de enzimas, devido à exaustão dos nutrientes presentes no meio fermentativo.

Logo, uma quantidade adequada de concentração de inóculo em relação à quantidade de substrato utilizado se faz necessária, para garantir a total fermentação do meio e, por outro lado, não esgotar precocemente as fontes de nutrientes necessárias para o desenvolvimento microbiano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram os fungos *Aspergillus niger* sp., *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus casingii*, cedidos pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel. Foram repicados sobre o meio PDA (Potato Dextrose Agar, Acumedia, EUA) e acondicionados em estufa microbiológica (Quimis) a 30°C.

Os substratos utilizados foram as sojas bruta convencional, transgênica e orgânica, e também o farelo de soja convencional, doados à UNIOESTE-Toledo pelas empresas COODETEC e SADIA.

Para o preparo das soluções-tampão foram utilizados os reagentes fosfato de sódio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico heptahidratado, da Nuclear (Brasil), ácido bórico e Bórax, da Dinâmica (Brasil), ácido acético glacial, da Vetec (Brasil) e acetato de sódio trihidratado, da Nuclear (Brasil). Para o preparo da solução nutriente, utilizou-se K_2HPO_4 (Vetec, Brasil), $NaNO_3$ (Nuclear, Brasil), Uréia (Chemco, Brasil), $MgSO_4$ (Dinâmica, Brasil), $ZnSO_4$ (Synth, Brasil), $FeSO_4$ (Synth, Brasil) e $MnSO_4$ (Synth, Brasil).

Para os métodos analíticos foram utilizados os seguintes reagentes: papel filtro Qualy Φ 11,0 (V. prolab, Brasil), ácido bórico (Nuclear, Brasil), NaOH (Dinâmica, Brasil), H_2SO_4 (F. Maia, Brasil), DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Vetec, Brasil), tartarato duplo de sódio e potássio anidro (Cinética, Brasil), glicose (Synth, Brasil), fenol (Vetec, Brasil), metabissulfito de sódio (Synth, Brasil), HCl (F.Maia, Brasil), sacarose (Synth, Brasil), goma arábica, óleo de oliva extra virgem comercial, acetona e etanol (F.Maia, Brasil), amido solúvel (Synth, Brasil), BSA (Bovine Serum Albumine) e ácido tricloroacético (Synth,Brasil).

3.2. Preparo do inóculo

Utilizou-se o meio de cultura PDA para o crescimento do microrganismo (700 mL, para obtenção de maior quantidade de esporos). Este foi gelificado em erlenmeyer de 1L, formando *slant* para maior área de contato para crescimento do fungo, que foi inoculado e mantido por 7 dias em estufa bacteriológica, a 30°C.

A raspagem dos esporos foi realizada adicionando-se ao frasco 100 mL de água deionizada esterilizada e 0,1 mL de solução TWEEN 80 0,01%. A superfície do meio foi raspada assepticamente com bastão de vidro. Após raspagem dos esporos, a solução foi filtrada em funil de vidro com algodão para retirada de micélio vegetativo e acondicionada em frasco âmbar esterilizado, em geladeira. Em seguida, determinou-se o número de esporos em suspensão na solução, utilizando microscópio óptico (marca Bioval) com aumento de 400x e Câmara de Neubauer (Raimbault & Alazard, 1980, citados por HASAN, 1998).

Para a realização da contagem, transferiu-se assepticamente para a superfície da câmara 1 gota da solução de esporos, tomando-se o cuidado de preencher apenas um lado da câmara, sem invadir os canais de cada lado da área de contagem. Após, foram contadas as células nos 4 campos de um lado da câmara, e dividindo-se este valor por 4, para obter-se a média. O cálculo da concentração de esporos foi feito de acordo com a equação 1:

$$C_{\text{esp}} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número médio de esporos contados} \cdot \text{fator de diluição}}{4 \cdot 10^{-4} \text{ mL}} \quad (1)$$

Contaram-se quatro campos em diagonal para cada retículo da câmara de Neubauer, sendo adotada a média aritmética para 3 repetições. O volume de cada campo de contagem da câmara é de 10^{-4} mL.

3.3. Preparo dos substratos

As sojas (grãos) foram fragmentadas em moinho de facas (marca TRAPP 3400), cedido pelo grupo de pesquisas Gemaq, UNIOESTE – Toledo. Em seguida, realizou-se uma classificação dos substratos em diferentes tamanhos de partícula usando peneiras Tyler de 12, 16, 28 e 48 MESH, que correspondem a 1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm, respectivamente. Após esta classificação, determinou-se o teor de umidade dos substratos. Os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em *freezer*. Para a caracterização das sojas, as mesmas foram submetidas ao processo de extração dos seus componentes, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 (DEUTSCHER, SIMON & ABELSON, 1990) na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão), a 35°C e 130 rpm, durante 2h

em incubadora tipo *shaker*. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 2500 rpm, para a remoção dos sólidos suspensos. Após, realizou-se a caracterização das amostras, onde determinou-se os perfis de açúcares redutores, açúcares redutores totais, proteína e gordura, além da atividade enzimática da amilase e das atividades enzimática e enzimática específica da protease.

3.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Para a realização dos experimentos foram utilizados os substratos (sojas e farelo) citados anteriormente, a solução de esporos obtida dos fungos *Aspergillus niger* sp., *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus casingii*, além da fonte de nutrientes, com intuito de fornecer compostos suplementares necessários ao desenvolvimento do microrganismo no meio fermentativo. As soluções-tampão foram utilizadas com o intuito de garantir o pH desejado do meio fermentativo, de acordo com as variáveis especificadas em cada experimento.

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados os substratos e, em seguida, esterilizados em autoclave a 121°C. Após, foram adicionadas a solução de esporos, a solução-tampão e os nutrientes, de acordo com as quantidades especificadas em cada experimento. O meio fermentativo de cada frasco foi misturado com o auxílio de bastões de vidro, para que se atingisse uma homogeneidade entre substrato, solução de esporos e solução nutriente, visando uma fermentação mais eficiente da soja. Os frascos foram acondicionados em estufa bacteriológica (Quimis), sendo o tempo de fermentação estimado de acordo com cada experimento. A temperatura de incubação foi de 30°C (*Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus*) e 28°C (*Aspergillus casingii*), de acordo com as características de cada fungo. As massas de substrato e os volumes de solução de esporos e nutrientes foram calculados por balanços de massa, de forma a garantir uma umidade inicial do meio fermentativo pré-determinada para cada ensaio.

3.4.1. Preparo de soluções-tampão e solução nutriente

Diferentes soluções-tampão com diferentes valores de pH foram feitas para o preparo final das soluções nutrientes, de acordo com cada experimento realizado.

Para pH's 3,0 e 3,9 foi utilizado o tampão acetato 0,05M e para pH's 6,0 e 8,1 foi utilizado o tampão fosfato de sódio 0,2M. Para pH 9,0 foi utilizado o tampão ácido bórico-Borax. Todos os tampões foram preparados conforme Deutscher, Simon & Abelson (1990). As quantidades de nutrientes utilizados para o preparo das soluções foram baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para um volume final de líquido (solução-tampão) de 500 mL, e são apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição da solução nutriente.

Nutriente	Massa (g)
K ₂ HPO ₄	6,25
NaNO ₃	1,00
Uréia	1,50
MgSO ₄	0,40
ZnSO ₄	0,25
FeSO ₄ (Synth, Brasil)	0,25
MnSO ₄ (Synth, Brasil)	0,10

3.5. Extração das enzimas

Após o término da fermentação, realizou-se a extração das enzimas contidas no sólido fermentado. À amostra sólida, foi adicionado solução-tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão). A solubilidade das enzimas depende de interações polares com a fase aquosa e, portanto, diminui próximo ao ponto isoeletrico da enzima (IKASARI & MITCHELL, 1996). Desta forma, priorizou-se a utilização de tampão neutro para a extração, para se evitar possíveis deslocamentos de equilíbrio de reação no caso de utilização da água, que não garante um pH estável durante o processo.

Em seguida, os frascos contendo o sólido e a solução-tampão foram acondicionados em incubadora *shaker* (Hydrosan) por 2h, a 35°C e agitação de 130 rpm. O sólido foi removido por processo de filtração, sendo posteriormente centrifugado (centrífuga Parsec CT-0603) por 20 min em rotação de 2500 rpm, para remoção de sólidos particulados. Após, armazenou-se o extrato em frascos plásticos e *freezer* para posterior análise das atividades enzimáticas.

3.6. Métodos analíticos

A seguir são descritas as metodologias usadas na determinação dos principais componentes da soja e aqueles resultantes da fermentação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.6.1. Determinação de gorduras

O método de determinação da concentração de gorduras no material sólido foi baseado no método citado por Silva & Queiroz (2002), o qual está fundamentado no princípio de diferença de massas (gordura extraída do material sólido). Fez-se a extração com éter em um período de 8 horas.

3.6.2. Determinação de proteínas

Para a determinação das proteínas presentes nas amostras sólidas de soja e meio fermentado, utilizou-se o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984), que consistiu em três etapas:

- 1) Digestão, em que o nitrogênio orgânico é transformado em amônia e os compostos são convertidos em CO₂, água e outros compostos;
- 2) Destilação, em que a amônia é separada e recolhida em uma solução receptora.
- 3) Titulação, onde é feita a determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

Na etapa da digestão, as amostras foram aquecidas em um bloco digestor até 450°C, com um aumento gradual de temperatura de 50°C em intervalos de tempo de 30 min. Após, as amostras foram resfriadas e a estas foram adicionados 15 mL de água deionizada. Para a destilação, 10 mL de solução receptora (ácido bórico 2% massa/volume) foram colocados em um frasco erlenmeyer de 125 mL. Utilizou-se para este processo 15 mL de solução NaOH 18N. A titulação da amostra destilada foi realizada num tempo máximo de 2h após o fim da destilação. Utilizou-se como solução titulante, H₂SO₄ 0,05N.

3.6.3. Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR)

O método de determinação da concentração de açúcares redutores usado neste trabalho foi adaptado do método proposto por Miller (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), que possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/L de açúcar redutor expresso como glicose.

A análise foi realizada misturando-se 0,2 mL da amostra de extrato enzimático, convenientemente diluída, com 0,2 mL do reagente DNS e levando ao banho aquecido a 100°C por 5 min. Após o resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 3,2 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro 12,3 g/L. O branco foi preparado pela adição de 0,2 mL de água deionizada substituindo a amostra. Mediu-se, então, a absorbância em espectrofotômetro (UV-Vis) em um comprimento de onda de 540 nanômetros. A curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, foi construída nas mesmas condições da amostra, gerando um modelo de regressão linear, bem como o coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida.

O reagente DNS foi preparado obedecendo a seguinte seqüência: 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de NaOH, 1416 mL de água destilada. Dissolveu-se em aquecimento brando 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 gramas de metabissulfito de sódio. Em seguida, adicionou-se o fenol e o metabissulfito de sódio à solução de DNS, NaOH e água destilada.

Para a medida dos açúcares redutores totais (ART), foi realizada uma hidrólise ácida da amostra, onde uma alíquota de 2,0 mL do extrato enzimático foi misturada a 2,0 mL de HCl 2N, sendo a hidrólise ácida dos carboidratos realizada em banho aquecido a 100°C por 5 min. Após resfriamento em banho de gelo, a mistura foi neutralizada pela adição de 2,0 mL de NaOH 2N e os açúcares redutores totais quantificados pelo método do reagente DNS, como descrito no método para AR. O branco foi preparado pela reação de 2,0 mL de água deionizada substituindo a amostra. A curva padrão para a análise de ART foi construída com solução de sacarose com concentrações na faixa de 0 a 3,0 g/L, sendo construída nas mesmas condições de hidrólise e neutralização da amostra.

3.6.4. Determinação de AE e AE_{esp} da lipase

Para a determinação da atividade enzimática da lipase, a metodologia utilizada foi adaptada de Freire *et al.*, (1997), citados por GOMBERT *et al.*, (1999).

Para realizar esta análise, foi preparado em frasco erlenmeyer de 125 mL, 9 mL de uma emulsão de goma arábica (5% massa/volume) e óleo de oliva (5% massa/volume) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. A esta emulsão foi adicionado 1 mL de extrato enzimático e, posteriormente, levados a incubadora *shaker* com agitação constante de 120 rpm e temperatura de 37°C por 60 min. Após este tempo, a reação que ocorria no interior dos frascos foi interrompida pela adição de 10 mL de uma mistura acetona/etanol na proporção 1:1. Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 minutos para que ocorresse a extração total dos ácidos graxos. Depois, titulou-se estas amostras com uma solução de NaOH 0,05N, até pH 11,0. O branco foi preparado substituindo o extrato enzimático pela mistura acetona/etanol.

Uma unidade da atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 micromol de ácidos graxos equivalentes por minuto por grama de massa seca da amostra sólida, sob as condições de análise, ($U = \mu\text{mol}/\text{min.gms}$). A atividade enzimática específica da lipase foi determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína da amostra.

3.6.5. Determinação de AE e AE_{esp} da amilase

Em tubos de ensaio de 30 mL foram colocados 25 mL de uma solução de amido solúvel recém preparada e 1 mL de extrato enzimático. As amostras foram aquecidas em banho a uma temperatura de 60°C por 1h e, posteriormente, em água fervente por 5 min. Após este período de tempo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e seu volume completado em balão volumétrico a 50 mL com água deionizada (HASAN, 1998).

Mediram-se então, os açúcares redutores pelo método do DNS (Miller, 1959), citado anteriormente. Para esta análise, o branco da amostra foi preparado substituindo o extrato enzimático por água deionizada. Uma unidade de atividade amilolítica (U) é definida como a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por minuto por grama de massa seca pela enzima, sob as condições de ensaio descritas, ($U = \mu\text{mol AR}/\text{min.gms}$). A atividade enzimática específica da

amilase é determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína da amostra.

Para a solução de amido, dissolveu-se 40g de amido solúvel (P.A.) em cerca de 40 mL de água deionizada. Homogeneizou-se e transferiu-se quantitativamente para um frasco tipo Béquer de 1000 mL, adicionando 600 mL de água deionizada. Levou-se à ebulição e ferveu-se brandamente durante 2 min, resfriando em seguida em água corrente até temperatura ambiente e adicionando 60 mL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5). Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se volume com água deionizada.

3.6.6. Determinação de AE e AE_{esp} da protease

A determinação da atividade enzimática da protease foi realizada após adaptação do método descrito por Germano *et al.*, (2003). Foram colocados em tubos de ensaio de 10 mL, 0,5 mL de solução 0,5% BSA (Bovine Serum Albumine), 0,25 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 e 0,25 mL de extrato enzimático. A mistura foi mantida sob agitação de 100 rpm por 20 min a 50°C em incubadora *shaker*. Após este período, adicionou-se 2,5 mL de solução TCA (ácido tricloroacético) 10% e 0,7 mL de solução NaOH 1N. Centrifugaram-se as amostras por 20 min a 3000rpm e, posteriormente, o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 440 nanômetros. O branco desta análise foi preparado pela substituição do extrato enzimático por água deionizada.

Uma unidade de atividade proteolítica (U), foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma variação na medida de absorbância (em relação ao branco) nas condições da análise, para 20 min de incubação por 1 grama de massa seca (gms) da amostra sólida ($U = \text{Abs}/\text{min.gms}$). A atividade enzimática específica da protease é determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína da amostra.

3.6.7. Determinação de AE e AE_{esp} da celulase

Para a análise de atividade enzimática da celulase, foram cortados, para cada ensaio, pedaços de papel filtro Qualy Φ 11,0 de 12 cm² (1 x 12 cm). Em seguida, o papel filtro foi enrolado e colocado no fundo de um tubo de ensaio de 20 mL, e ao

tubo adicionados 2 mL de solução-tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 1 mL de extrato enzimático. As amostras foram levadas a banho aquecido a 50°C por 1h, com agitação manual dos tubos em intervalos de tempo de 10 min (adaptado de MANDELS, ANDREOTTI & ROCHE, 1976).

Após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a atividade enzimática medida pelo método do DNS (Miller, 1959), que possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/L de açúcar redutor expresso como glicose. Desta forma, 1,4 mL da amostra foram adicionados a 1,4 mL do reagente DNS, em tubos de ensaio de 25 mL. Os tubos contendo a amostra e o DNS foram levados a um banho com água fervente por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo. Na sequência, transferiu-se o conteúdo dos tubos para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro 12,3 g/L. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-Vis), com um comprimento de onda de 540 nanômetros. O branco foi preparado pela adição de 1,0 mL de água deionizada substituindo o extrato enzimático. A curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, foi construída nas mesmas condições da amostra, gerando um modelo de regressão linear, bem como o coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida.

Uma unidade de atividade celulásica (U) é definida como a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por minuto por grama de massa seca da amostra, sob as condições de ensaio descritas ($U = \mu\text{mol AR}/\text{min.gms}$). A atividade enzimática específica da celulase é determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína da amostra.

3.6.8. Determinação de AE e AE_{esp} da invertase

Para a análise da invertase, em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de uma solução de sacarose 0,6M, preparada em solução-tampão Macllvaine 50 mM pH 4,0, conforme Deutscher *et al.* (1990). Para o preparo desta solução, a massa necessária de sacarose foi pesada e dissolvida diretamente na solução-tampão. Os tubos contendo o extrato e a solução de sacarose foram levados a banho aquecido a 40°C por 15 min. Após este período, 0,25 mL da amostra foi adicionado a 0,25 mL de reagente DNS (Miller, 1959) em tubos de ensaio de 10 mL, e mediu-se então os açúcares redutores, com um

comprimento de onda de 540 nanômetros. O branco foi preparado com a substituição do extrato enzimático por água deionizada.

Uma unidade de atividade da invertase é definida como a quantidade de micromoles de açúcares totais liberados por volume da amostra enzimática, sob as condições de ensaio descritas ($U = \mu\text{mol ART/mL}$). A atividade enzimática específica da invertase é determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína da amostra.

3.6.9. Determinação de umidade

O teor umidade foi determinado por método gravimétrico, baseado na perda de massa após secagem em estufa, à temperatura de 105°C, por 3h ou mais, até massa constante, medido em balança analítica após resfriamento das amostras em dessecador (A.O.A.C., 1995).

3.7. Otimização das condições do processo fermentativo

Realizou-se estudo da otimização da FES por planejamentos estatísticos experimentais. Em uma primeira etapa, foi feito um planejamento experimental completo 2^3 com quadruplicata no ponto central, totalizando 12 ensaios, para avaliar a umidade inicial do meio (U), o diâmetro de partícula do substrato (dp) e a concentração inicial de inóculo (C_0), para verificação das variáveis mais significativas para o processo.

Na sequência, empregou-se um planejamento composto central rotacional com 11 ensaios, para a otimização das variáveis mais significativas do processo, onde utilizou-se a metodologia de superfície de resposta. As respostas estudadas em ambos os casos foram as AE e AE_{esp} das enzimas. Foi usado o programa computacional STATISTICATM (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos à Análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições da FES e fornecer um modelo matemático adequado para a AE e AE_{esp} do processo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos substratos

Os extratos líquidos obtidos das sojas orgânica, transgênica e convencional foram caracterizados quanto à composição bioquímica pelas análises de açúcares redutores, açúcares redutores totais, proteínas, gorduras e atividades de amilase e protease. As análises foram realizadas em diferentes frações granulométricas da soja moída. As frações mais finas contêm preferencialmente camadas mais intermediárias do grão (cotilédone), enquanto as frações mais grossas contêm maior quantidade de casca e camadas mais externas (tegumento).

A figura 4.1 apresenta os perfis de açúcares redutores nos extratos das sojas para os diferentes diâmetros de partícula dos substratos utilizados.

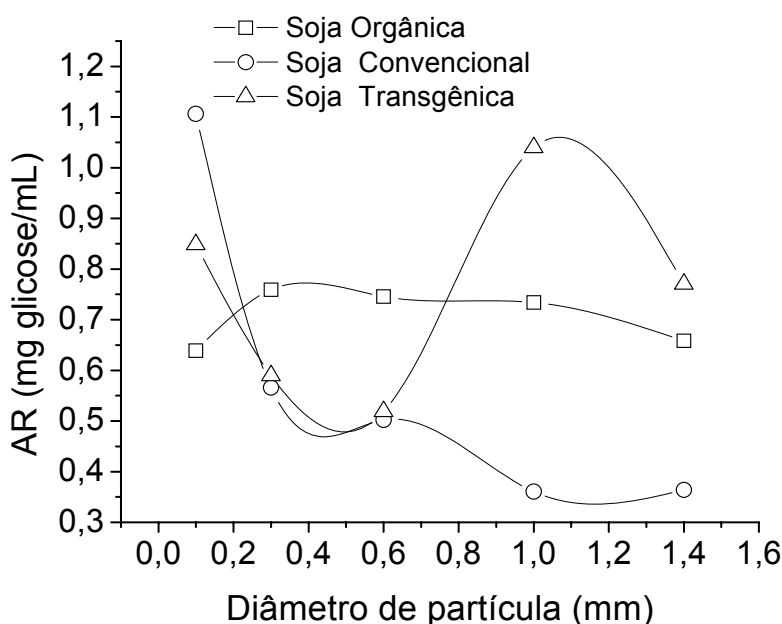


Figura 4.1. Perfis de açúcares redutores para as frações granulométricas das três sojas

Pode-se observar que não há um comportamento semelhante para os três tipos de soja. A soja orgânica apresenta um perfil quase constante de açúcares redutores para os diferentes diâmetros de partícula, com valores médios próximos a 0,75 mg de glicose/mL, enquanto para a soja convencional verificou-se um perfil decrescente de concentração de AR com o aumento do diâmetro da partícula do substrato. A soja transgênica apresenta um perfil fortemente variável com o aumento

do diâmetro de partícula, dificultando assim sua caracterização de AR em relação à variação do tamanho de partícula.

Da mesma forma como na determinação dos açúcares redutores, observou-se, para os açúcares redutores totais (figura 4.2), que não há um comportamento semelhante para os três tipos de soja. A soja orgânica apresenta um perfil quase constante de açúcares redutores totais para diâmetros de partícula a partir de 0,4 mm, com valores médios próximos a 3,25 mg de glicose/mL. As sojas convencional e transgênica apresentaram grande oscilação de concentração de ART com a variação do diâmetro de partícula.

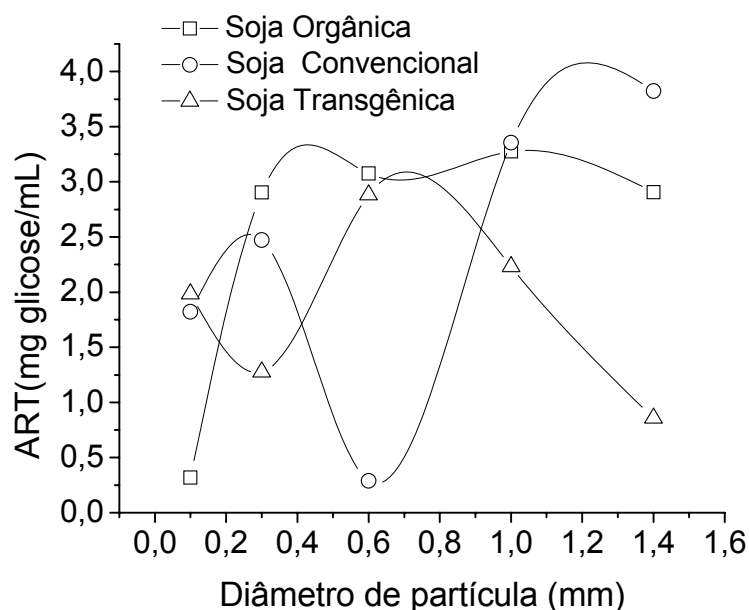


Figura 4.2. Perfis de açúcares redutores totais para as frações granulométricas das três sojas

Os perfis de proteína para diferentes frações granulométricas são apresentados na figura 4.3. Observa-se, para os três tipos de soja, presença maior de proteína nas frações de diâmetro intermediário (0,6 mm). Porém, nota-se que a soja convencional apresenta um maior teor, aproximadamente 43% de proteína para 0,6 mm de diâmetro de partícula, valores estes que conferem com a composição estabelecida por Moraes & Silva (1996), como descrito na tabela 2.1.

Wang, Law & Webb (2005) utilizaram mistura de farinhas de soja e trigo como substrato, encontrando na farinha de soja um teor de proteína de 34,44% e na farinha de soja desengordurada, 43,32%, com um diâmetro de partícula de 0,5 mm, para a produção de protease por Fsm com *Aspergillus oryzae*.

Mahanta, Gupta & Khare (2008) utilizaram como substrato torta de semente de noz de Barbados (*Jatropha curcas*), que apresentou um teor de proteína de 25% na produção de protease e lipase por FES com *Pseudomonas aeruginosa*. Kempka *et al.* (2008) utilizaram farelo de soja com um teor de proteína de 35,8% (m/m) na produção e caracterização da lipase por FES com *Penicillium verrucosum*.

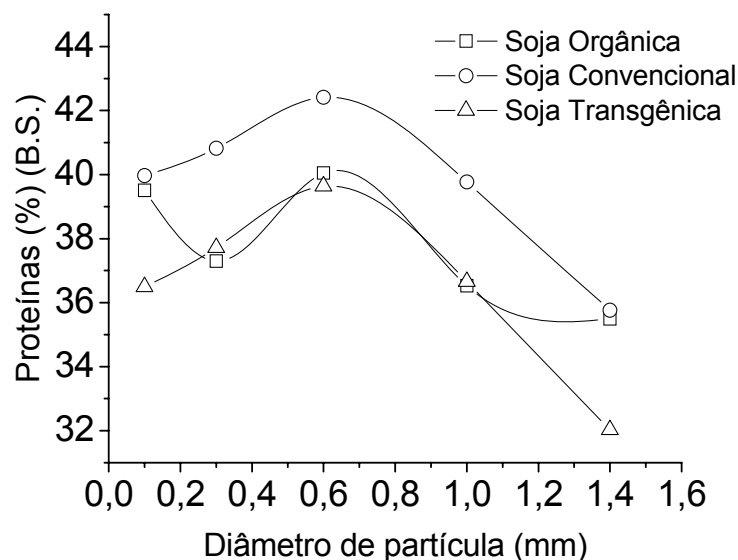


Figura 4.3. Perfis de proteína para as frações granulométricas dos três tipos de soja

O teor de proteína encontrado na soja convencional bruta é maior do que os valores mencionados pelos autores, o que a caracteriza como um substrato em potencial para a produção de enzimas proteolíticas.

No que se refere ao teor de gordura, observa-se na figura 4.4 uma tendência ao decréscimo, com o aumento do diâmetro da partícula para as sojas orgânica e convencional. A soja transgênica apresentou teor semelhante para dois diâmetros diferentes de partícula (0,1 e 1 mm).

Espera-se que nas frações mais finas se observe maior teor de gordura, como indicado na figura 4.4, e nas frações mais grossas (camadas externas do grão) se tenha maior teor de carboidratos e polissacarídeos, para que se tenha concordância com os dados referidos na Tabela 2.1. Nas frações intermediárias esperam-se teores mais altos de proteína, como observado na figura 4.3. Para a produção de proteases, por exemplo, as análises de proteína indicaram que a utilização da soja convencional, com diâmetro de partícula médio de 0,6 mm, talvez seja a mais indicada como substrato devido ao seu maior teor de proteína, o que estimularia o fungo a produzir maiores quantidades desta enzima.

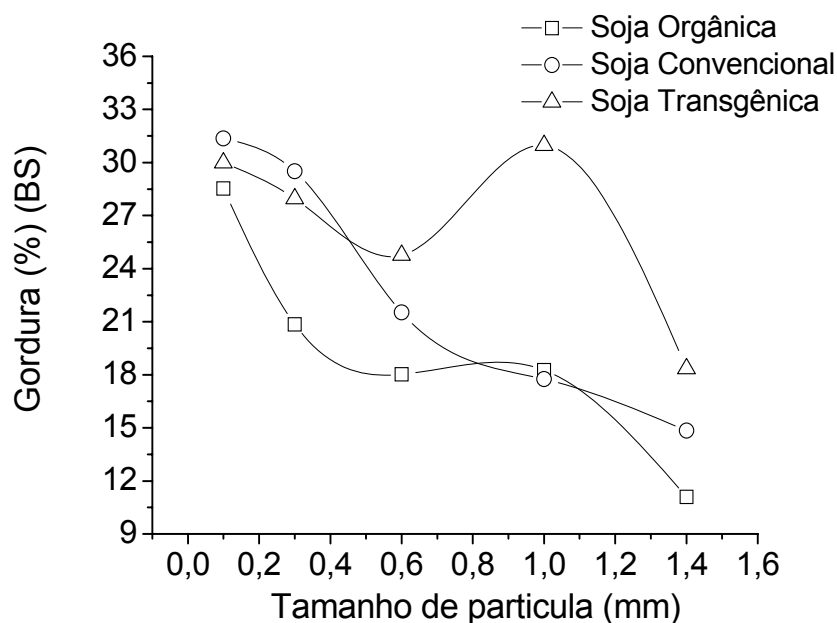


Figura 4.4. Perfis de gordura para as frações granulométricas dos três tipos de soja

Mahanta, Gupta & Khare (2008) utilizaram como substrato, torta de semente de noz de Barbados (*Jatropha curcas*) com um teor de gordura de 47%, na produção de protease e lipase por FES com *Pseudomonas aeruginosa*. Kempka *et al.* (2008) utilizaram farelo de soja com um teor de gordura de 2,4% (m/m), na produção e caracterização da lipase por FES com *Penicillium verrucosum*.

Observando os perfis de atividade amilásica (figura 4.5), nota-se que para os três tipos de soja, há um nível mais elevado de atividade na fração que contém partículas em torno de 0,6 mm, com um resultado um pouco inferior para a soja orgânica. Já para a atividade enzimática especificada protease (figura 4.6), verifica-se que a soja transgênica apresentou valor mínimo e constante de atividade específica para todas as faixas de diâmetro de partícula. Por outro lado, observou-se que as sojas orgânica e convencional tiveram valores reduzidos de atividade específica para a fração de 0,3 mm e valores mais altos encontrados para a fração correspondente a 1,0 mm de diâmetro de partícula.

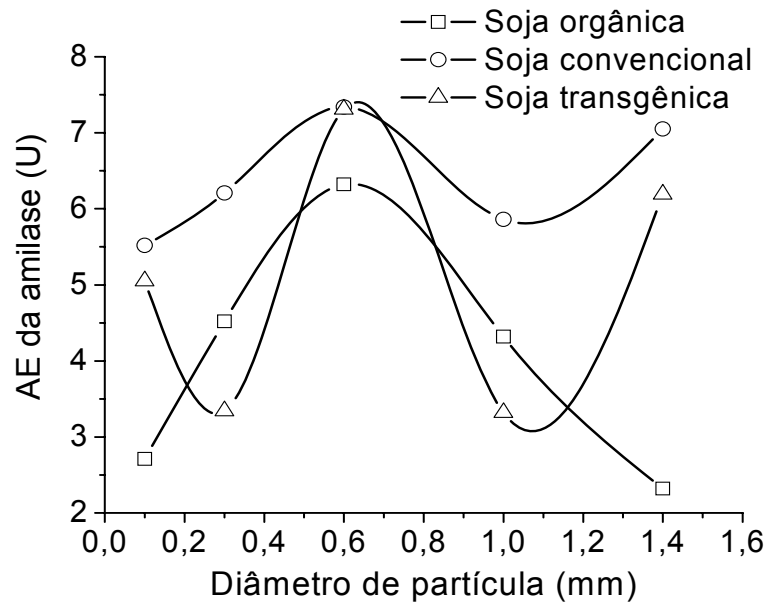


Figura 4.5. Perfis de AE amilásica para as frações granulométricas dos três tipos de soja

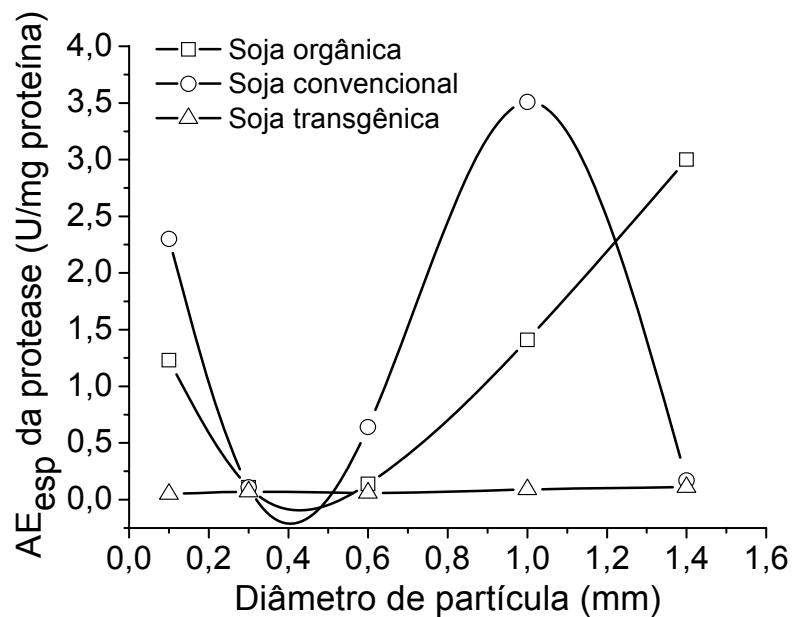


Figura 4.6. Perfis de AE_{esp} proteolítica para as frações granulométricas das três sojas

4.2. Curvas de crescimento do *Aspergillus niger* para os três tipos de soja

Foram construídas curvas de crescimento obtidas a partir da fermentação dos três tipos de soja utilizadas como substratos, com diâmetro de partícula de 0,6 mm, e temperatura de 30°C, pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* sp., para a produção das enzimas lipase, amilase e protease. De acordo com os perfis de AR e ART, obtidos no sólido fermentado e apresentados nas figuras 4.7 e 4.8,

respectivamente, nota-se o consumo dos substratos pelo microrganismo ao longo da fermentação. Este resultado é esperado, já que os açúcares fermentescíveis presentes nas sojas são alguns dos componentes bioquímicos que servem de fonte nutricional e de energia para o fungo.

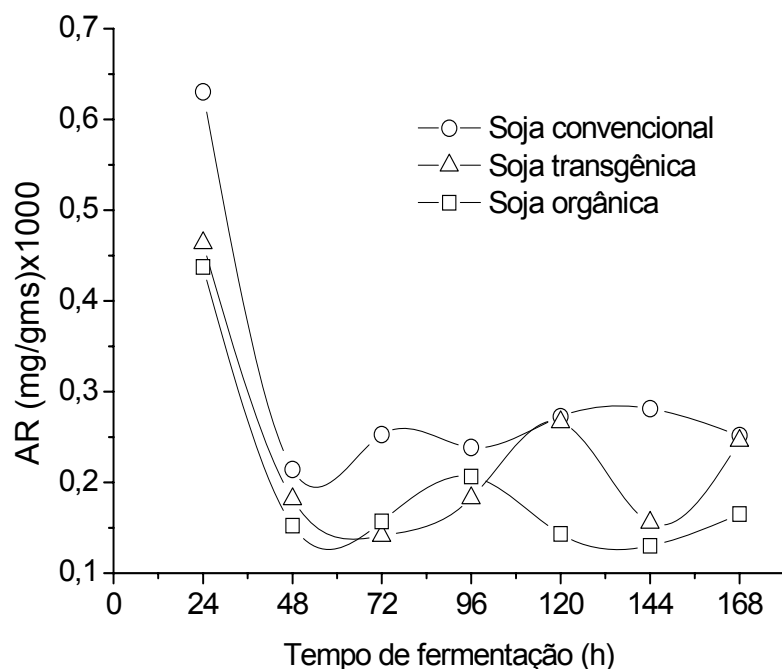


Figura 4.7. Perfis de AR dos três tipos de soja fermentada

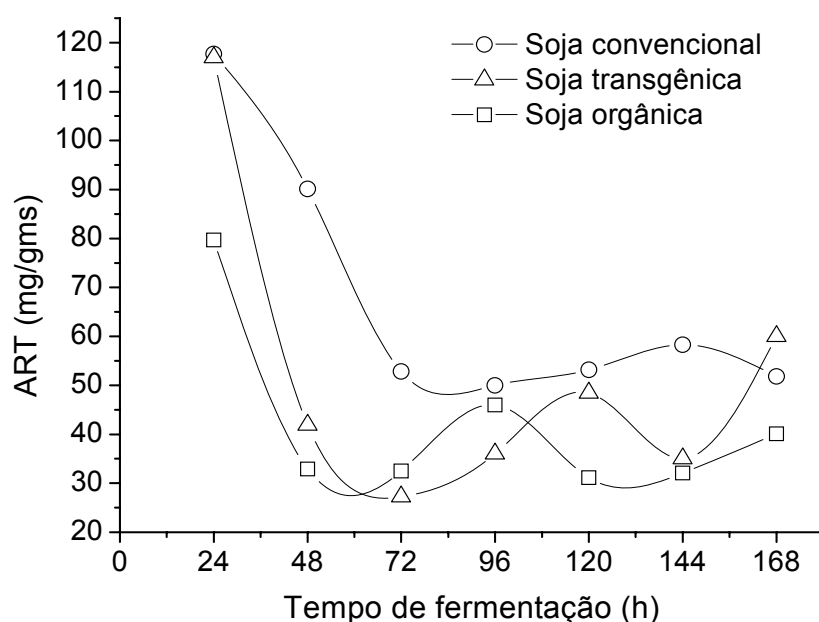


Figura 4.8. Perfis de ART dos três tipos de soja fermentada

Na figura 4.9 verificam-se perfis diferenciados para a variação temporal da biomassa, para os três tipos de soja. O conteúdo de proteína evidencia, de forma

indireta, o conteúdo de biomassa fúngica ao longo do processo fermentativo. Para a soja orgânica observa-se um comportamento quase semelhante ao de uma curva característica de crescimento do fungo, onde de 24 a 48h tem-se uma redução do teor de proteína (biomassa) e, posteriormente um crescimento até 144h, quando passa a diminuir. Para as sojas convencional e transgênica não foi possível estabelecer um comportamento padrão, onde se observa aumento e diminuição do teor de proteína, que podem estar associados ao crescimento da biomassa e produção de enzimas e, simultaneamente, ao consumo de aminoácidos, peptídeos e proteínas pelo fungo, ou mediante hidrólise enzimática.

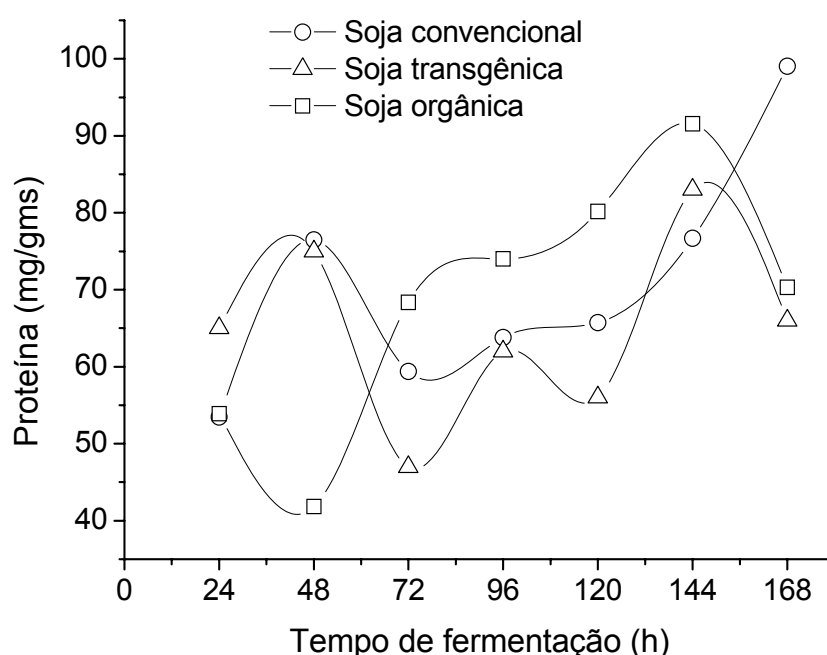


Figura 4.9. Perfis de proteína dos três tipos de soja fermentada.

A figura 4.10 apresenta as curvas de atividade para a protease, para os diferentes tipos de soja. Nota-se que os valores mais altos de atividade enzimática foram obtidos nos tempos 96 e 168h para a soja orgânica, 120h para a soja transgênica e 144h para a soja convencional. Os melhores resultados de produtividade do processo foram os seguintes: $0,375 \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a soja orgânica no tempo de 96h e $0,283 \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a soja transgênica no tempo de 120h. A soja convencional apresentou produtividade de $0,264 \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para 144h de incubação, observando-se também a maior atividade enzimática (aproximadamente 0,642 U).

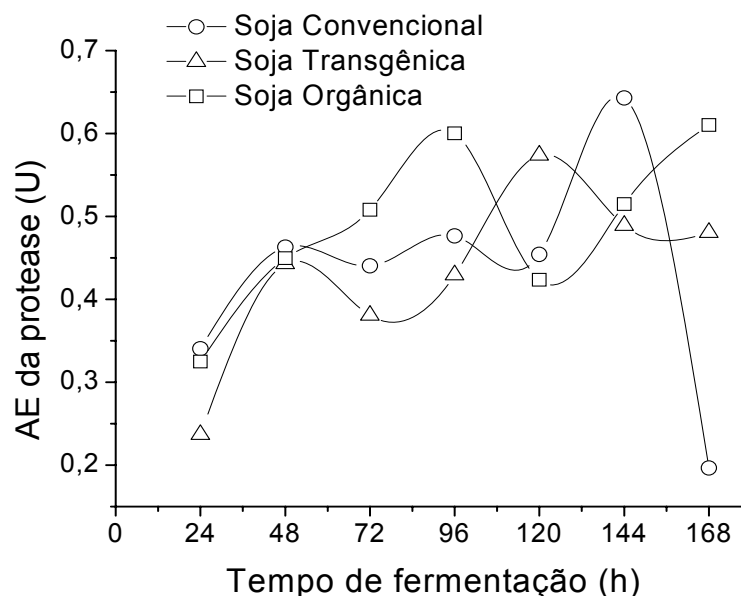


Figura 4.10. Perfis de atividade proteásica dos fermentados.

Menezes *et al.* (2006) observaram uma atividade enzimática da protease de 5,78 U/mL, utilizando como substratos resíduo de maracujá (33,25%) e farelo de trigo (66,75%), com umidade de 62,5%, após 64h de fermentação, na produção de poligalacturonase por fermentação semi-sólida pelo fungo *Aspergillus niger*, concluindo que a composição de substratos utilizada neste resultado foi a mais adequada. Coelho *et al.* (2001), na produção de enzimas a partir da casca de coco verde por fermentação semi-sólida, utilizando o fungo *Aspergillus niger*, obtiveram uma produtividade máxima de protease de $26 \text{ U.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, ou $1,56.10^6 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para um diâmetro de partícula do substrato de 0,59 mm. Os autores validaram a hipótese do aproveitamento do resíduo da casca do coco verde para a produção enzimática. Com relação ao uso da soja, o melhor resultado obtido neste estudo foi observado para um tamanho de partícula de substrato de 0,6 mm e 50% de umidade para a soja orgânica.

Nas curvas de atividade enzimática da lipase (figura 4.11) para os três diferentes tipos de soja, nota-se que para a soja convencional o ponto de máxima atividade da lipase foi obtida em torno de 72h, para a soja orgânica obteve-se os resultados mais altos de atividade na faixa entre 120 e 168h e para a soja transgênica o pico de atividade foi obtido no tempo de 144h.

Observou-se uma dificuldade em estabelecer um padrão de comportamento cinético para os diferentes tipos de soja, o que poderia sugerir uma eventual diferença nas rotas metabólicas seguidas pelo fungo, em função do tipo de soja

usado. Com base nos valores de produtividade para o processo, obteve-se um melhor resultado para a soja convencional no tempo de 72h com produtividade de $0,0069.10^{-3} \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$, seguido da soja orgânica ($0,00625.10^{-3} \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e da soja transgênica no tempo de 144h com produtividade de $0,0045.10^{-3} \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

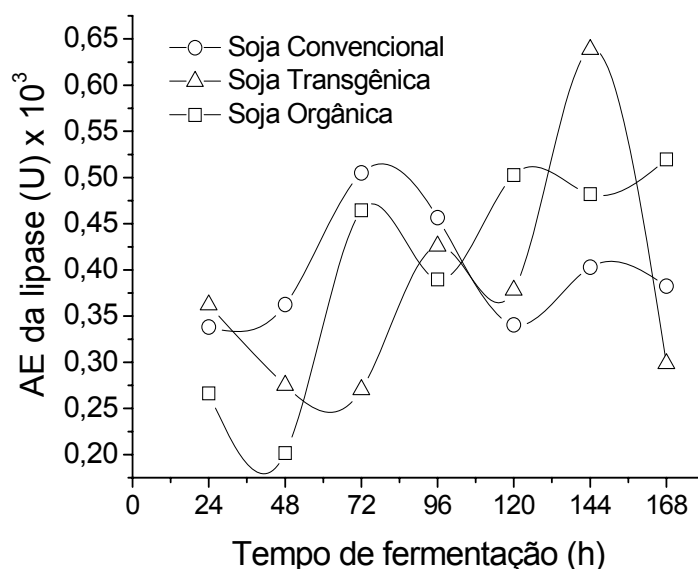


Figura 4.11. Perfis de atividade lipásica dos fermentados.

Vargas (2004), na produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato, obteve uma produtividade de $0,375 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em ensaios realizados em béqueres, com parâmetros operacionais ótimos ($T=27,5^{\circ}\text{C}$ e $U=55\%$). O autor constatou que umidade e temperatura foram os principais fatores na obtenção da enzima. De maneira semelhante, Kempka *et al.* (2008), na produção e caracterização da lipase por FES com *Penicillium verrucosum* utilizando farelo de soja como substrato, obtiveram uma atividade enzimática de 40 U/g em 48h de fermentação e 52 U/g em 72h de fermentação, em condições ótimas de operação de $27,5^{\circ}\text{C}$ e 55% de umidade inicial do substrato. O pico de produtividade da enzima foi alcançado em 72h de fermentação, $0,74 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os autores afirmam que os diferentes indutores usados para a produção da enzima não afetaram o processo, que foi influenciado pela temperatura e umidade inicial do meio. Comparativamente aos valores encontrados pelos autores mencionados, os quais usaram torta e farelo de soja, com os valores obtidos neste trabalho pode-se supor que o fungo da espécie *Aspergillus* não apresenta características favoráveis à produção de enzimas lipolíticas a partir da soja ou seu resíduo.

Os perfis de atividade amilásica são apresentados no gráfico da figura 4.12, onde pode-se observar um maior nível de AE para as sojas orgânica e convencional após 96h de fermentação (aproximadamente 1,5 U). Um valor de atividade semelhante é observado para a soja convencional com 144h de fermentação. No entanto, como os valores de atividade são próximos e, em termos de rendimento, o melhor tempo de fermentação é 96h.

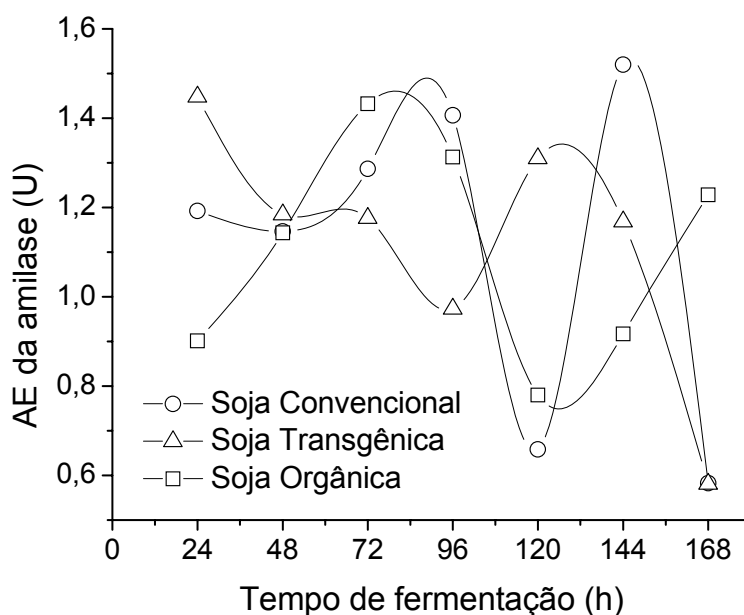


Figura 4.12. Perfis de atividade amilásica dos fermentados.

Kunamneni, Permaul & Singh (2005) obtiveram uma atividade enzimática de 534 U/g de farelo de trigo, na produção de amilase por FES, utilizando o fungo *Thermomyces lanuginosus*, após um período de 120h de fermentação, com 90% de umidade inicial a 50°C. Verificaram que a produção de amilase dobrou com a suplementação do meio fermentativo com 1% de amido solúvel (m/m) e 1% de peptona (m/m). Anto, Trivedi & Patel (2006) observaram uma máxima produção da enzima de 271,2 U/gmu, utilizando farelo de trigo como substrato, com pH e temperatura ótimos de 5,0 e 55°C, respectivamente, por FES pelo fungo da espécie *Aspergillus*, onde notaram um aumento da produção da enzima pela adição de nitrogênio orgânico (extrato de levedura e peptona, 0,02g/gmu). Os resultados obtidos neste estudo e comparados aos autores mencionados podem evidenciar que uma otimização do meio fermentativo pela adição de fonte de nutrientes à soja poderia ocasionar uma melhor produção da amilase fúngica.

Nota-se, para cada tipo de soja, uma produção simultânea das enzimas amilase, lipase e protease pelo fungo, denotando um comportamento diferente para cada enzima nos diferentes tempos de fermentação. Para o caso da produção de lipases, a soja não seria um substrato ideal, devido ao fato da mesma apresentar polissacarídeos e proteínas em quantidades consideráveis em sua composição, fato que foi comprovado pela baixíssima produção pelo fungo, evidenciando a preferência do mesmo na produção de enzimas proteolíticas e amilolíticas que resultem na obtenção final de glicose como fonte de energia, além de peptídeos e aminoácidos. Na tabela 4.1 são apresentados os melhores resultados para os três tipos de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* utilizando diferentes tipos de soja.

Tabela 4.1. Melhores resultados para as curvas de crescimento do *Aspergillus niger*.

Enzima	Tipo de soja	Tempo de fermentação (h)	AE (U)
Protease	Convencional	144	0,64
Lipase	Transgênica	144	$0,65 \cdot 10^{-3}$
Amilase	Convencional	144	1,5

4.3. Avaliação dos parâmetros operacionais da FES com *Aspergillus niger*

Realizou-se neste estudo fermentação com o fungo *Aspergillus niger* com base nos melhores resultados obtidos para a enzima protease, previamente estabelecidos na fermentação anterior. O planejamento fatorial completo 2^3 foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: umidade inicial do meio (U), diâmetro de partícula do substrato (dp) e concentração inicial do inóculo (C_0). O tipo de soja utilizado (convencional) e o tempo de fermentação (144h) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da temperatura ótima de crescimento do fungo, de 30°C. Na tabela 4.2 são apresentadas as especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento. A tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (AE) e atividade enzimática específica (AE_{esp}) após o processo fermentativo.

Tabela 4.2. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento completo 2^3 .

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
Umidade inicial do meio (U) (%)	35	50	65
Diâmetro de partícula do substrato (dp) (mm)	0,3	0,6	1,0
Concentração inicial do inóculo (C_0) (esporos/gms)	$5 \cdot 10^4$	$5,25 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$

Tabela 4.3. Matriz do planejamento completo 2^3 .

Ensaio	U	dp	C ₀	AE (U)	AE _{esp} (U/g proteína)
1	-1	-1	-1	4,437	7,536
2	+1	-1	-1	0,691	1,250
3	-1	+1	-1	2,637	4,994
4	+1	+1	-1	-	-
5	-1	-1	+1	6,815	10,524
6	+1	-1	+1	-	-
7	-1	+1	+1	6,666	14,383
8	+1	+1	+1	5,435	8,603
9	0	0	0	10,811	17,585
10	0	0	0	9,903	15,348
11	0	0	0	10,877	15,858
12	0	0	0	9,485	19,168

Neste planejamento foram medidas a AE e AE_{esp} da enzima, sendo que esta última representa o valor da AE dividido pelo teor de proteína presente no sólido fermentado. Observa-se na tabela que os melhores resultados foram obtidos no ponto central (0,0,0), que corresponde a 50% de umidade, diâmetro de partícula de 0,6 mm e $5,25 \cdot 10^5$ esporos/gms.

Os ensaios 4 e 6 não puderam ser analisados, devido ao aspecto leitoso (turvo) do extrato enzimático, com sólidos suspensos. Desta forma, as etapas de filtração e centrifugação do extrato enzimático não puderam ser realizadas com eficiência. Assim, fez-se a análise estatística do experimento usando a matriz do planejamento acima, porém excluindo os ensaios 4 e 6. Os ensaios 9, 10, 11 e 12 são replicatas realizadas no ponto central do experimento, com intuito de verificar a reprodutibilidade e o erro experimental.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento são apresentadas nas tabelas 4.4 e 4.5 para AE e AE_{esp}, onde observou-se também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância. Estes resultados foram obtidos pelo software STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc). Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 4.4. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento completo 2³.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	10,2690	0,3430	0,000082	10,2690
U	10,2607	0,9702	0,001806	5,1303
dp	0,2828	0,6860	0,707872	0,1414
C₀	3,2037	0,6860	0,018543	1,6018
U x dp	1,2575	0,6860	0,164190	0,6287
dp x C₀	-11,9235	0,9702	0,001160	-5,9617
U x dp x C₀	-12,7492	0,9702	0,000952	-6,3746

R² = 0,987 ; R = 0,993**Tabela 4.5.** Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da protease para o planejamento completo 2³.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	16,9898	0,8696	0,000293	16,9898
U	15,2610	2,4597	0,008437	7,6305
dp	0,9115	1,7392	0,636486	0,4558
C₀	6,1885	1,7392	0,037872	3,0943
U x dp	0,2530	1,7392	0,893569	0,1265
dp x C₀	-18,0935	2,4597	0,005193	-9,0468
U x dp x C₀	-21,2940	2,4597	0,003242	-10,6470

R² = 0,970 ; R = 0,985

Nota-se que a umidade (U), a concentração inicial do inóculo (C₀), a interação entre diâmetro de partícula e concentração inicial do inóculo, bem como a interação entre todas as variáveis avaliadas no experimento foram significativas no intervalo de confiança de 95% para ambos os casos.

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (figuras 4.13 (a) e (b)), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado. Observa-se que U e C₀ têm influência positiva na resposta; aumentando estas variáveis haverá um aumento no valor da AE e AE_{esp}. Já para dp x C₀ e U x dp x C₀, observa-se uma influência negativa; se os valores de dp, C₀ e U aumentarem simultaneamente, haverá uma diminuição no valor da resposta desejada.

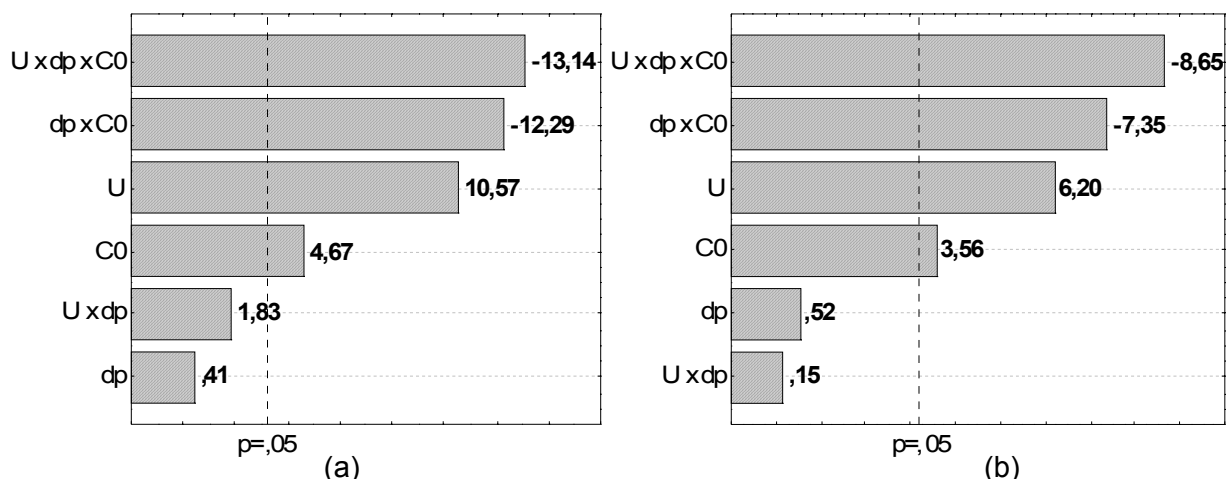


Figura 4.13. Gráficos de Pareto para o modelo obtido do planejamento completo 2^3 , (a) AE e (b) AE_{esp}

Pelo teste F, se F calculado (tabela 4.6) for maior que o valor de F tabelado, o modelo é válido e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais. Assim, tem-se que, segundo BARROS NETO *et al.* (2007), o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade, para AE e AE_{esp} é: $F(6;3;0,05) = 8,94$.

Tabela 4.6. Análise de variância obtida para o planejamento completo 2^3 para AE e AE_{esp}.

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F _{calc}	
	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}
Regressão	110,25	301,30	6	6	18,38	50,22	39,04	16,60
Resíduos	1,41	9,08	3	3	0,47	3,03		
Total	111,66	310,38	9	9				

Desta forma, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, para ambos os casos, portanto o modelo linear proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente os modelos matemáticos de AE e AE_{esp} em função das variáveis significativas (equações 2 e 3), uma vez que os mesmos apresentam um coeficiente de correlação satisfatório ($R^2 = 0,987$ e $0,993$, respectivamente).

$$AE(U) = 10,2690 + 5,1303.U + 1,6018.C_0 - 5,9617.dp.C_0 - 6,3746.U.dp.C_0 \quad (2)$$

$$AE_{\text{esp}}(U/\text{g de prot.}) = 16,9898 + 7,6305.U + 3,0943.C_0 - 9,0468.dp.C_0 - 10,6470.U.dp.C_0 \quad (3)$$

Constata-se este fato observando-se os gráficos da figura 4.14 (a) e (b), onde os resíduos do modelo distribuem-se sobre o ponto zero e de forma aleatória.

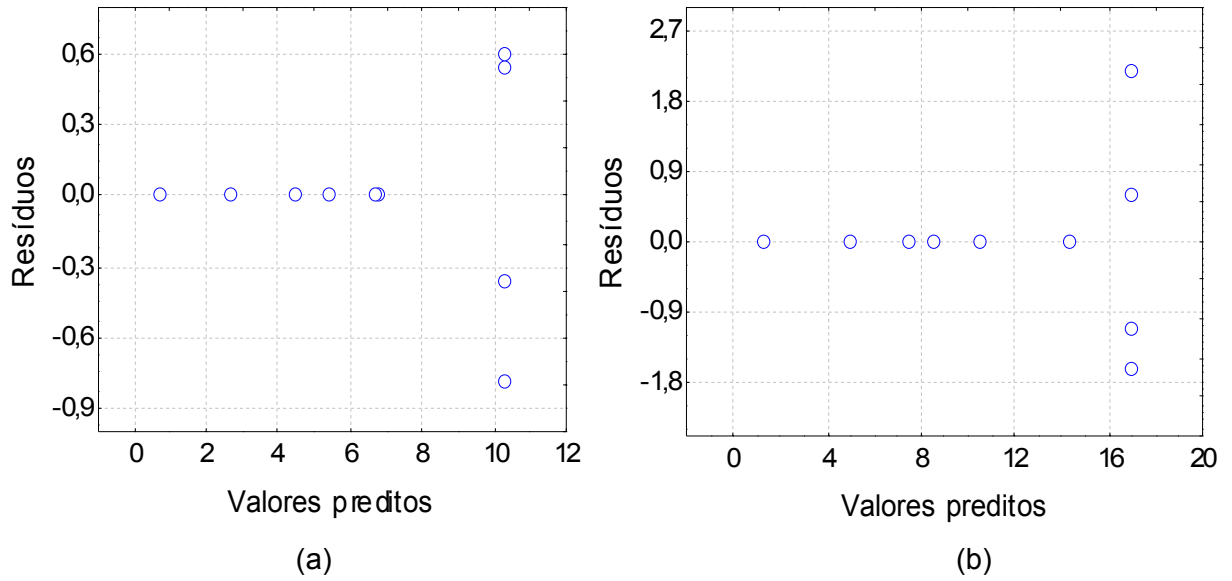


Figura 4.14. Resíduos do modelo obtido pelo planejamento completo 2^3 , (a) AE e (b) AE_{esp}

As superfícies de resposta obtidas para os modelos lineares são apresentadas nos gráficos da figura 4.15 (a) e (b). Como mencionado anteriormente, se forem desejados maiores valores de AE e AE_{esp} , deve-se conduzir os experimentos na direção dos maiores valores de umidade e concentração inicial de inóculo.

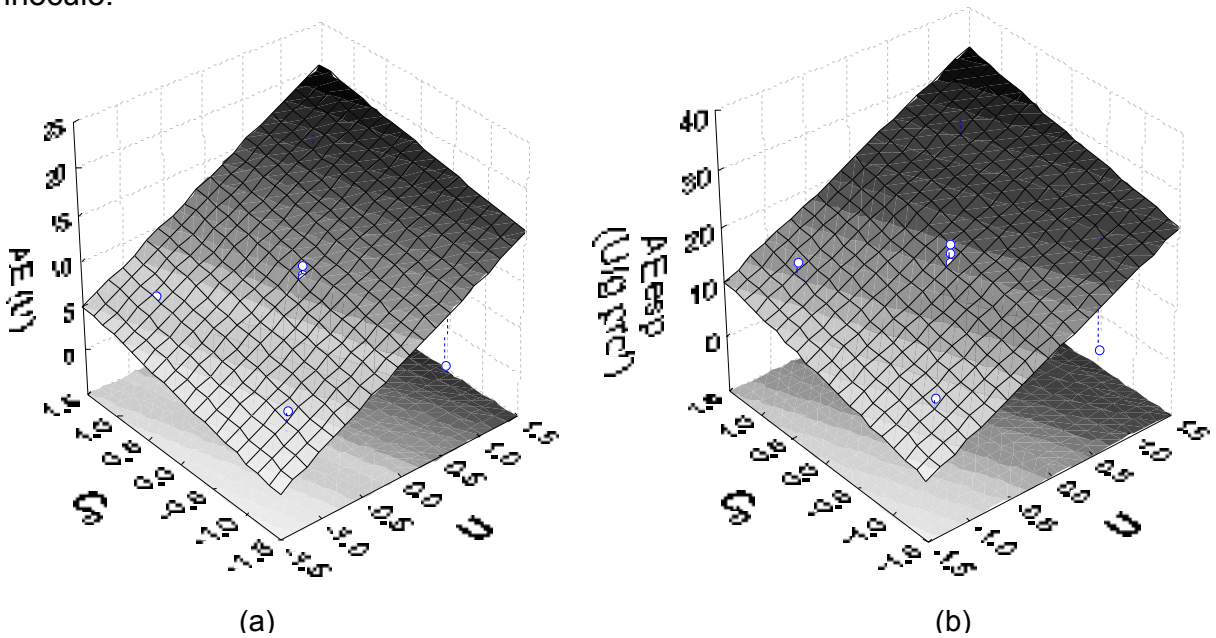


Figura 4.15. Superfícies de resposta: (a) AE e (b) AE_{esp} da protease em função de C_0 e U

Assim, como parâmetros fixos para a realização do próximo experimento, foram usados uma umidade (U) de 50% e valor mais alto para a C_0 , ou seja $4 \cdot 10^6$

esporos/gms. Os valores mais altos de AE e AE_{esp} encontrados foram de 10,877 U e 19,168 U/g de proteína, respectivamente.

Han, Rombouts & Nout (2003), analisando os efeitos da temperatura e umidade relativa no crescimento e produção de enzimas por *Actinomucor elegans* e *Rhizopus oligosporus* na preparação de queijo de soja, observaram uma produtividade de protease de 108 U/g de substrato após 48h de incubação e 25°C, com umidade relativa entre 95-97%, para *Actinomucor elegans*. Para *Rhizopus oligosporus*, observaram uma produtividade de 104 U/g de substrato após 48h de incubação e 35°C, com umidade relativa de 95-97%. Concluíram que *Rhizopus oligosporus* é uma boa alternativa ao *Actinomucor elegans*, para a produção de queijo de soja em estações climáticas com temperaturas elevadas. Agrawal *et al.* (2004) obtiveram uma máxima atividade da protease (8500 U/gmu) em pH 9,0 a 45 °C, na produção de protease alcalina por *Penicillium* sp., por FES utilizando farelo de soja. Comparando aos resultados dos autores, os resultados obtidos neste estudo para a atividade enzimática apresentaram-se inferiores, o que pode indicar que além da umidade e concentração inicial de inóculo, a espécie do microrganismo utilizado e o pH do meio podem exercer influência significativa na produção da protease.

4.4. Estudo de otimização da FES

Para a realização deste estudo, para avaliar a produção da enzima protease por fermentação com o fungo *Aspergillus niger*, os melhores parâmetros obtidos nos estudos anteriores foram repetidos: soja convencional como substrato, concentração inicial de inóculo de 4.10^6 esporos/gms, tempo de fermentação de 144h, umidade do meio fermentativo de 50% e temperatura de incubação de 30°C.

Utilizou-se um planejamento experimental do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional), com duas variáveis a serem avaliadas: diâmetro de partícula do substrato (dp) e pH da solução nutriente (pH), utilizando soluções-tampão com diferentes valores de pH para o preparo das soluções nutrientes. Neste tipo de planejamento é possível, por meio da análise de regressão dos pontos experimentais, gerar modelos quadráticos, resultando em superfícies de resposta curvas (Rodrigues & Iemma, 2005). As especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR são apresentadas na tabela 4.7.

Tabela 4.7. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR.

Variável	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
dp (mm)	0,3	0,4	0,6	0,9	1,0
pH solução nutriente	3,0	3,9	6,0	8,1	9,0

A tabela 4.8 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos para AE e AE_{esp} da protease.

Tabela 4.8. Matriz do planejamento DCCR

Ensaio	Dp	pH	AE (U)	AE _{esp} (U/g de proteína)
1	-1	-1	11,189	17,155
2	1	-1	8,376	14,778
3	-1	1	9,732	15,946
4	1	1	12,590	19,795
5	0	0	11,515	20,457
6	0	0	11,281	17,919
7	0	0	11,505	17,454
8	0	1,414	11,498	15,385
9	0	-1,414	13,429	21,400
10	1,414	0	8,866	14,008
11	-1,414	0	9,677	15,533

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE e AE_{esp} estão apresentadas nas tabelas 4.9 e 4.10, onde (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em negrito e *italico* indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 4.9. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento DCCR.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<i>Intercepto</i>	<i>11,4337</i>	<i>0,5347</i>	<i>0,000004</i>	<i>11,4337</i>
dp (L)	-0,2754	0,6550	0,691541	-0,1377
<i>dp (Q)</i>	<i>-2,3607</i>	<i>0,7797</i>	<i>0,029162</i>	<i>-1,1803</i>
pH (L)	0,0066	0,6550	0,992301	0,0033
pH (Q)	0,8322	0,7797	0,334640	0,4161
<i>dp (L) x pH (L)</i>	<i>2,8355</i>	<i>0,9262</i>	<i>0,028065</i>	<i>1,4177</i>

R² = 0,821 ; R = 0,906

Tabela 4.10. Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da protease para o planejamento DCCR.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente regressão
Intercepto	18,6099	1,3179	0,000032	18,6099
dp (L)	-0,1711	1,6143	0,919705	-0,0855
dp (Q)	-3,6717	1,9216	0,114282	-1,8358
pH (L)	-1,1744	1,6143	0,499519	-0,5872
pH (Q)	-0,0486	1,9216	0,980786	-0,0243
dp (L) x pH (L)	3,1130	2,2828	0,230856	1,5565

$R^2 = 0,560$; $R = 0,748$

Nota-se que apenas o diâmetro de partícula quadrático e a interação entre diâmetro de partícula e pH lineares foram significativos para AE, ao passo que, para AE_{esp} , nenhuma variável avaliada foi significativa. Observa-se que a interação dp(L) x pH(L) influencia positivamente a atividade enzimática. O diâmetro de partícula quadrático influencia a atividade enzimática da protease negativamente, ou seja, se o valor de dp for aumentado, haverá uma diminuição do valor da resposta (AE). Nos Gráficos de Pareto (figuras 4.16 a e b), constata-se a influência das variáveis avaliadas no processo ($p < 0,05$).

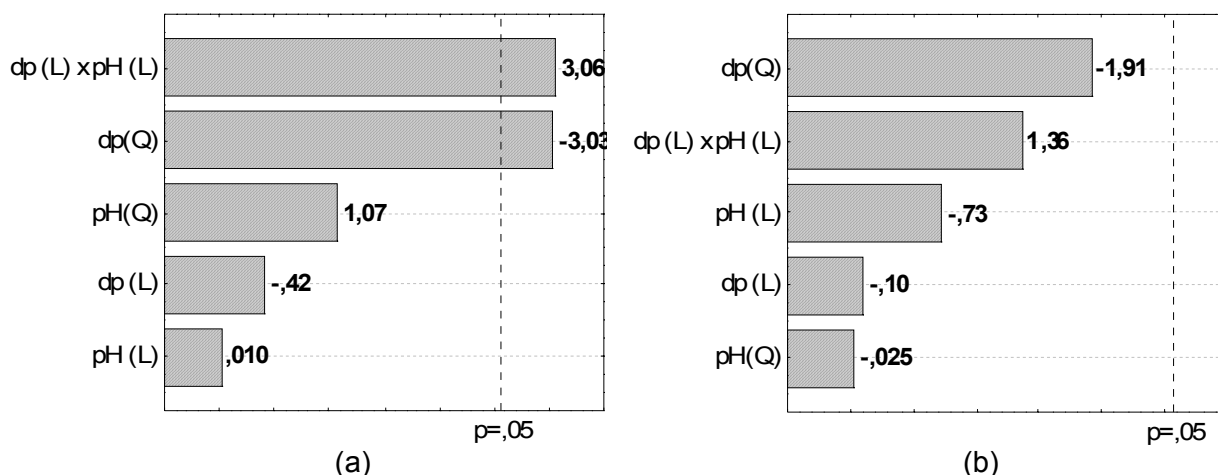


Figura 4.16. Gráficos de Pareto para o modelo obtido do planejamento DCCR, (a) AE (b) AE_{esp}

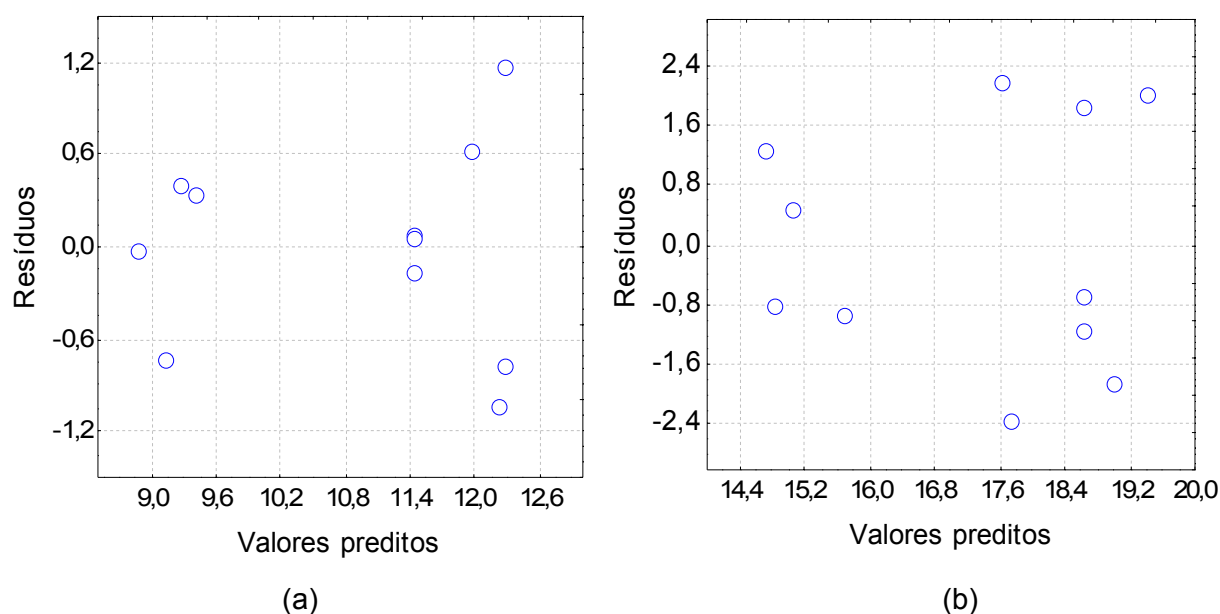
A análise de variância para o planejamento, obtida para AE e AE_{esp} , é apresentada na tabela 4.11. Nos dois casos, para um intervalo de confiança de 95%, tem-se o valor tabelado de F, com os respectivos graus de liberdade: $F_{tab}(5;5;0,05)=5,05$.

Tabela 4.11. Análise de variância obtida para o planejamento DCCR para AE e AE_{esp}.

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F _{calc}	
	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}	AE	AE _{esp}
Regressão	19,66	33,17	5	5	3,93	6,64	4,58	1,27
Resíduos	4,29	26,06	5	5	0,86	5,21		
Total	23,94	59,23	10	10				

Assim sendo, $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, logo, o modelo não é válido para prever o comportamento do processo. Entretanto as superfícies de resposta podem ser usadas no sentido de verificar a direção a ser tomada nos próximos planejamentos visando a otimização do processo.

Nos gráficos dos resíduos (figura 4.17 a e b), nota-se uma distribuição aleatória em torno do zero. As superfícies de resposta para AE e AE_{esp} são apresentadas na figura 4.18 (a) e (b). Como observado nos resultados apresentados para o planejamento, os efeitos negativos das variáveis para AE e AE_{esp} podem sugerir que melhores resultados são obtidos para valores mais baixos de pH e dp.

**Figura 4.17.** Resíduos do modelo obtido pelo planejamento DCCR, (a) AE e (b) AE_{esp}

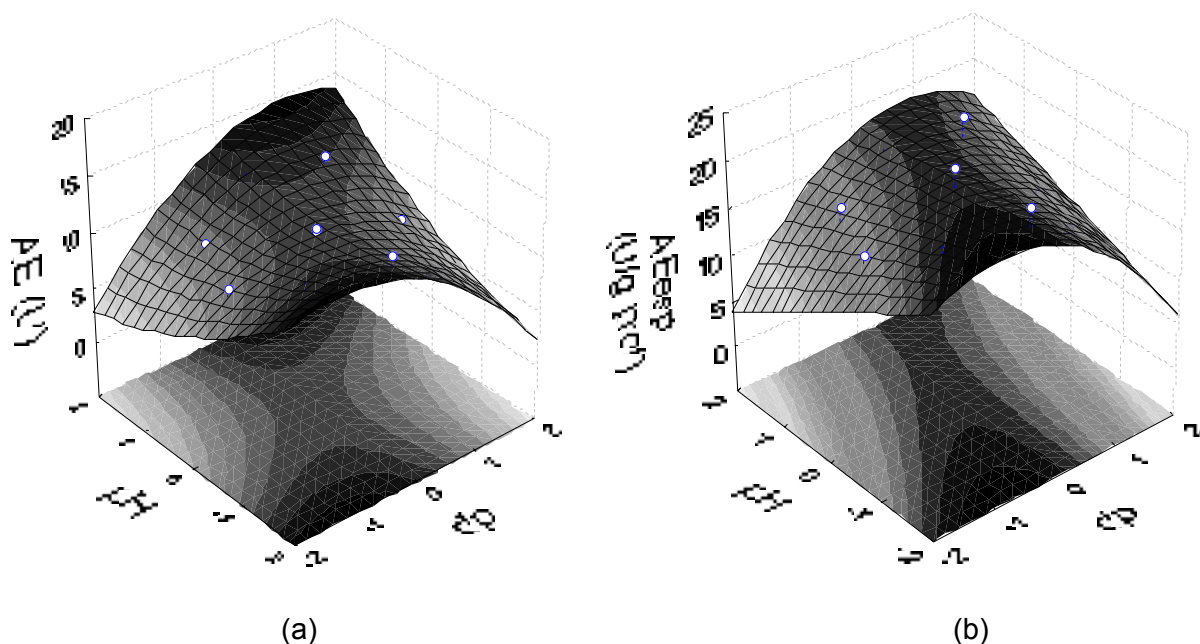


Figura 4.18. Superfícies de resposta: (a) AE e (b) AE_{esp} da protease em função de dp e pH

A matriz de dados (tabela 4.8) indica, para o melhor resultado ($AE = 13,43$ U e $AE_{esp} = 21,40$ U/g de proteína) que o pH 3,0 e dp 0,6 mm foram os melhores parâmetros de processo para este planejamento, juntamente com o uso da soja convencional, U 50%, C_o $4 \cdot 10^6$ esporos/gms, tempo de fermentação de 144h e temperatura de incubação de 30°C.

Li, Harvey & McNeil (2008) obtiveram uma atividade enzimática de protease de aproximadamente 30 U/mL, em pH ácido a 45°C, no estudo da protease extracelular por *Aspergillus niger* B1-D recombinante. Observaram um aumento significativo na atividade da enzima em temperaturas elevadas (em torno de 45°C), ao passo que, na produção de protease extracelular por *Aspergillus niger* AB₁₀₀ mutante, Basu, Banik & Das (2008) notaram uma máxima produção de protease de 2,776 $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$, utilizando farelo de soja como substrato, com pH e temperatura ótimos de 7,0 e 30°C, respectivamente. Concluíram que a atividade máxima da enzima foi encontrada quando o meio fermentativo foi enriquecido com 5% de glucose (m/v) e 2,5% de uréia (m/v). Observando os resultados obtidos da fermentação com soja e os resultados dos autores anteriormente citados, nota-se que este substrato pode ser considerado viável para a produção de protease, utilizando o fungo *Aspergillus niger*, sendo que os parâmetros otimizados no processo fermentativo, neste caso, conferem à enzima uma característica ácida.

4.5. Avaliação da influência do pH inicial da FES

Foram feitas fermentações utilizando o fungo *Aspergillus niger* e os parâmetros otimizados, indicados pelas fermentações anteriores, fixados em: tipo de soja (convencional), umidade do meio (50%), diâmetro da partícula do substrato (0,6 mm), concentração inicial do inóculo ($4 \cdot 10^6$ esporos/gms), tempo de fermentação (144h) e temperatura de incubação (30°C). Avaliou-se como variável o pH da solução nutritiva. Para isso, foram preparados três diferentes soluções-tampão, com pH's 3,0; 6,0 e 9,0, para o preparo das soluções nutritivas. Além da protease, foram avaliadas a atividade enzimática da lipase, amilase e celulase.

A figura 4.19 apresenta a AE e AE_{esp} da protease, em função da variação de pH do meio, onde verificou-se uma maior produção de protease alcalina (pH 9,0), com os maiores valores de AE e AE_{esp} em 20,0 (U) e 31,2 (U/g de proteína), respectivamente.

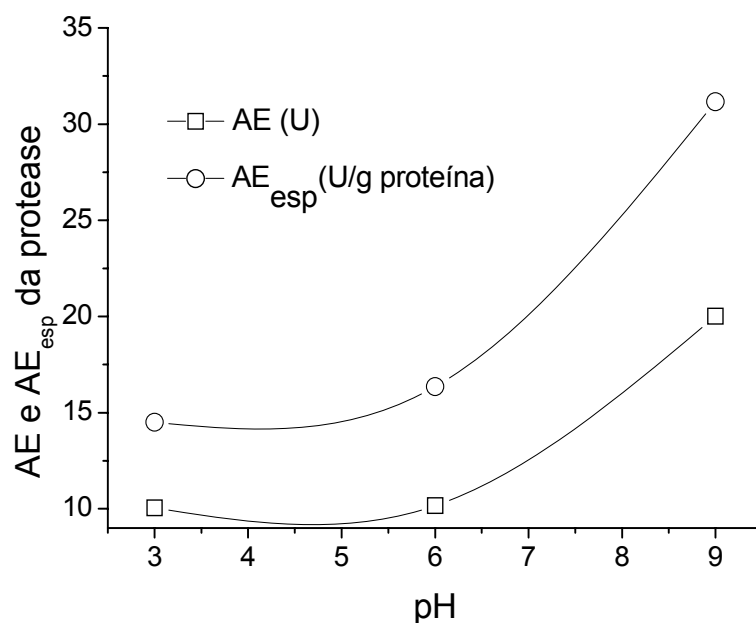


Figura 4.19. Perfis de AE e AE_{esp} para a protease em função do pH

Na caracterização da protease a partir do fungo *Thermoascus aurantiacus*, Merheb *et al.* (2007) obtiveram uma atividade de 248 U/mL, utilizando farelo de trigo como substrato, a 60°C e pH 5,5. Os autores estudaram a atividade da enzima na hidrólise da caseína bovina em leite desnatado, concluindo que a enzima não apresenta a mesma especificidade que a quimosina bovina. Dunaesvkii *et al.* (2008),

no estudo de proteases extracelulares de fungos miceliais em processos patogênicos, observaram uma atividade enzimática de, aproximadamente 500 U/gmu, com o microrganismo mais patogênico *Fusarium sporotrichioides*, em meio líquido contendo nutrientes e 1% de caseína, com pH 7,3 a 24 °C. Concluíram que, em alguns casos, o meio patogênico pode ser evidenciado pela atividade enzimática. Observou-se que, para a produção de protease utilizando soja, mantidas as demais condições experimentais fixas, houve produção da enzima nos diferentes valores de pH avaliados. Porém, em pH mais elevado há uma maior atividade enzimática. Comparativamente aos resultados obtidos pelos autores, a protease oriunda da fermentação da soja com *Aspergillus niger* apresentou resultados inferiores. Entretanto, se comparado ao estudo anterior, onde os melhores resultados foram obtidos em pH ácido, nota-se que o meio fermentativo otimizado apresentou maior produção de protease alcalina pelo fungo. Logo, nota-se que a soja apresenta características favoráveis à produção da enzima pelo fungo nos três valores de pH.

A variação de produção da lipase em relação ao pH do meio fermentativo é apresentada no gráfico da figura 4.20. Nota-se que, semelhante à protease, o maior valor de atividade específica encontra-se em pH alcalino (9,0).

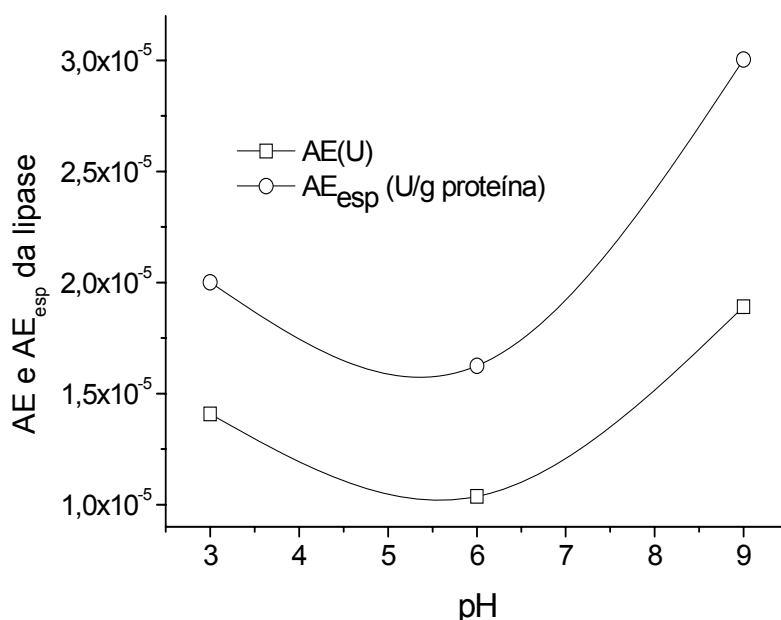


Figura 4.20. Perfis de AE e AE_{esp} para a lipase em função do pH

Pinheiro (2006), na produção de lipase por FES, utilizando *Penicillium verrucosum* e farelo de soja como substrato, obteve AE de 52 U/g de substrato em

72h de fermentação em pH 7,0. O autor observou que, em comparação com o processo submerso, a FES apresentou maiores valores de produtividade e atividade enzimática. Gutarra (2003) apresentou uma produção de lipase de 18,5 U/g de substrato em 72h de fermentação com *Penicillium verrucosum*, utilizando como substrato torta de babaçu, e observou superioridade no processo em estado sólido comparativo ao processo submerso, além de constatar a viabilidade do substrato estudado na obtenção da enzima. Ao comparar estes resultados com os resultados dos autores citados e obtidos nas curvas de crescimento (figura 4.10), onde o pH do meio fermentativo não foi controlado, nota-se novamente uma baixa produtividade da enzima pelo fungo *Aspergillus niger*, onde pressupõe-se que há preferência do fungo em produzir enzimas amilolíticas e proteolíticas, que atuarão na hidrólise de proteínas e polissacarídeos para a obtenção de glicose, que é a principal fonte de energia para o seu crescimento.

Na figura 4.21, são mostradas a AE e AE_{esp} da amilase, em função do pH do meio de cultivo, onde novamente observa-se uma maior produção da enzima para um valor alcalino de pH, o que pode evidenciar a característica do fungo em relação à produção enzimática, relacionada às condições de pH do meio fermentativo.

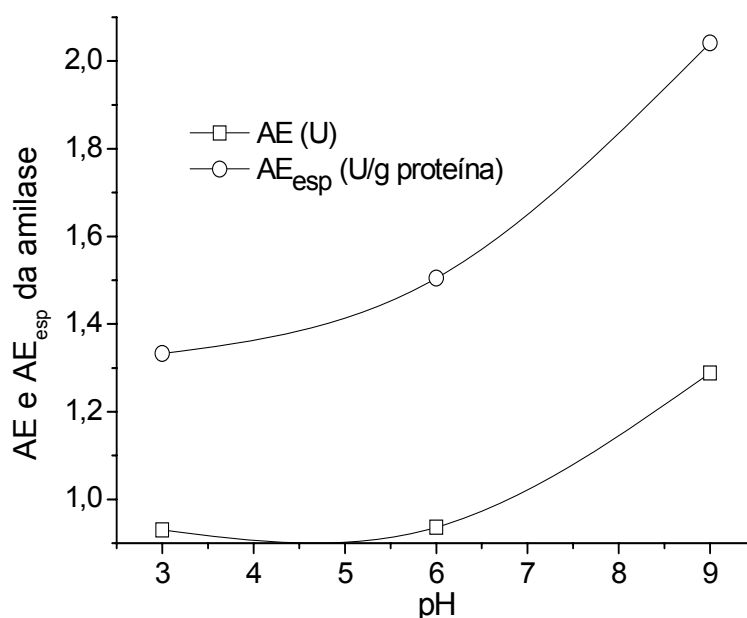


Figura 4.21. Perfis de AE e AE_{esp} para a amilase em função do pH

O valor de AE observado na figura 4.21 (cerca de 1,35 U) é semelhante ao valor da AE apresentada nas curvas de crescimento (cerca de 1,5 U, figura 4.12). A AE_{esp} apresentou valor um pouco superior. Desta forma, pode-se concluir que a

variação do pH do meio fermentativo não apresenta grande influência na produtividade de amilases, já que no primeiro experimento não houve um controle do pH do meio. Os maiores valores de AE da amilase em relação aos valores obtidos para a lipase confirmam a preferência do fungo em produzir enzimas amilolíticas.

Estudando a produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens, Peixoto (2006) observou uma AE da amilase em cultura submersa de 10,41 U/mL, a 30°C e 150 rpm. Spier (2005), estudando a produção de enzimas amilolíticas fúngicas por FES utilizando fungo da espécie *Aspergillus* e bagaço-de-cana como substrato, obteve uma máxima produção de α -amilase com pH do meio de cultura igual a 4,0, obtendo maior atividade enzimática utilizando fermentadores do tipo bandejas, ao passo que, na produção de amilase por FES pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*, Kunamneni, Permaul & Singh (2005) observaram uma atividade enzimática máxima de 543 U/g de farelo de trigo, em pH 6,0, em erlenmeyer de 250 mL. Embora não seja possível realizar um comparativo entre os resultados apresentados pelos autores e os obtidos neste estudo, constata-se a produção da enzima por *Aspergillus niger*, detectada pelo método analítico utilizado. Pode-se observar ainda que o fungo apresenta capacidade de produzir amilase em diferentes condições de pH, porém, ao se utilizar a soja como substrato, há uma tendência à maior produção da enzima com característica alcalina.

As atividades enzimática e enzimática específica da celulase e amilase são apresentadas, comparativamente, nos gráficos das figuras 4.22 e 4.23. Os resultados indicam comportamentos semelhantes tanto para a produção de amilase como para a produção de celulase, com maiores valores de produção em pH's mais altos do meio de fermentação e com produção mais acentuada de amilase, devido à natureza amilácea do substrato usado (soja bruta moída). A amilase apresentou valores superiores à celulase para os perfis de AE_{esp} . A celulase não apresentou variação em sua AE_{esp} , tendo seu valor próximo de zero, caracterizando a baixa produção da enzima.

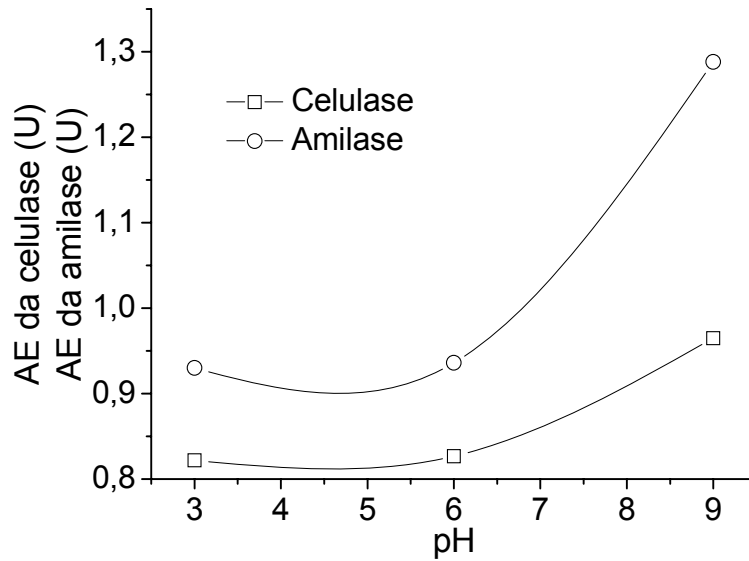


Figura 4.22. Perfis de AE para a celulase comparativo à amilase função do pH

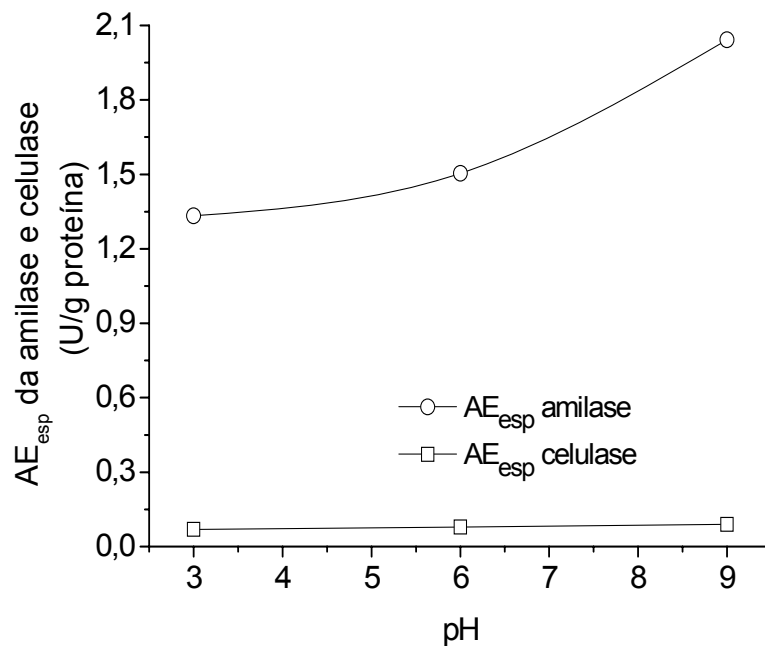


Figura 4.23. Perfis de AE_{esp} para a celulase comparativo a amilase função do pH

Coelho *et al.* (2001) observaram uma AE_{esp} de, aproximadamente, 225 U.mg⁻¹.min⁻¹ de celulase após 96h de fermentação, na produção de enzimas a partir da casca de coco verde por *Aspergillus niger*, com um diâmetro de partícula de substrato de 1,19 mm. Aguiar & Menezes (2000) obtiveram uma produção enzimática de 0,25 U/mL após 168h de fermentação, na produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9, utilizando Fsm. Camassola & Dillon (2007) apresentaram uma atividade de celulase de 32,89 U/gmu na produção de celulasas e hemicelulasas por *Penicillium echinulatum* utilizando FES e bagaço de cana como

substrato, verificando a viabilidade do emprego deste resíduo de baixo custo como substrato para a produção destas enzimas. Pode-se supor que os resultados mais elevados de AE e AE_{esp} da amilase em relação à celulase se devem ao fato de que a maior quantidade de material celulósico encontra-se presente na casca da soja (maior diâmetro de partícula, 1mm), sendo que para este experimento utilizou-se uma granulometria intermediária de substrato (0,6 mm). Nota-se também que os baixos valores de celulase obtidos na fermentação com soja por *Aspergillus niger* indicam pouca viabilidade para a produção desta enzima utilizando este substrato.

4.6. FES da soja convencional bruta e seu farelo com *Aspergillus clavatus*

Realizou-se a FES com o fungo *Aspergillus clavatus*, com o intuito de comparar a produtividade deste fungo à produtividade das fermentações anteriores, onde foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*. Como substrato, utilizou-se a soja convencional bruta devidamente fracionada e seu respectivo farelo desengordurado. Foram avaliadas as curvas de crescimento para o microrganismo.

Os parâmetros utilizados para a realização dos experimentos, obtidos das fermentações anteriores, foram: diâmetro de partícula do substrato (0,6 mm), concentração inicial de inóculo ($4 \cdot 10^6$ esporos/gms), umidade do meio fermentativo (50%). O pH do meio (6,0) e temperatura de incubação (30°C) foram determinados de acordo com as características de desenvolvimento do microrganismo.

Para as curvas de crescimento, espera-se que o substrato seja consumido pelo microrganismo ao longo do processo, para que haja produção de metabólitos. Isto fica evidenciado pelo gráfico da figura 4.24, que apresenta os perfis de ART ao longo da fermentação com a soja bruta e separadamente, com o farelo da mesma soja. O teor de ART diminui até 48h, o que implica que houve consumo por parte do fungo. Entretanto o aumento do ART após 48h pode ser um indício de que o fungo tenha buscado rotas alternativas onde se pressupõe a ocorrência de liberação de gases, concentrando os teores de ART. O perfil de proteína é apresentado na figura 4.25, onde nota-se um maior conteúdo para o farelo de soja em relação à soja bruta, porém com perfis variáveis para ambos os substratos. Pressupõe-se uma ocasional discrepância nas rotas metabólicas tomadas pelo fungo, em função de características particulares de cada substrato. Não se observa um perfil característico de crescimento do fungo, relacionado ao teor de proteína. Isto pode

ser explicado pela produção crescente de protease (figuras 4.26 e 4.27), a qual pode estar degradando as formas protéicas produzidas.

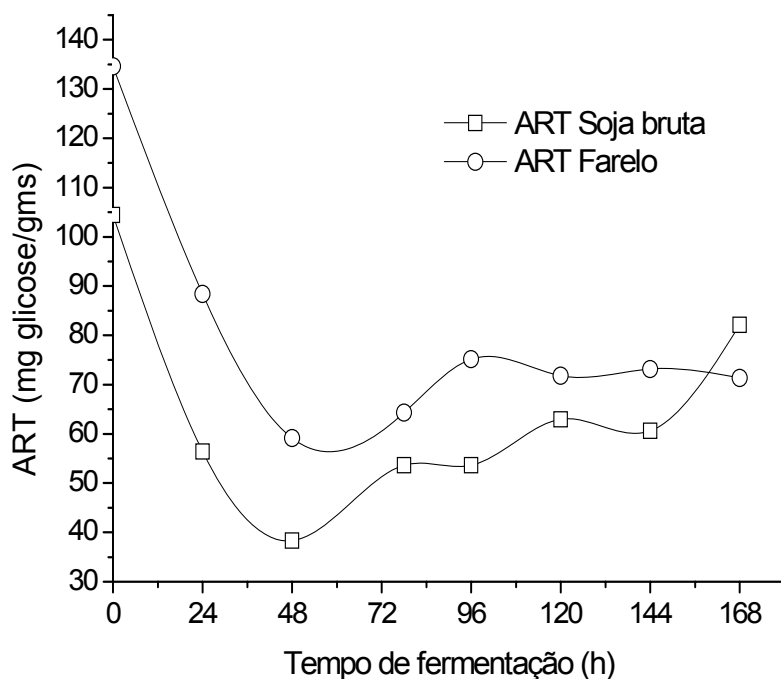


Figura 4.24. Perfis de ART para a soja convencional bruta e seu farelo

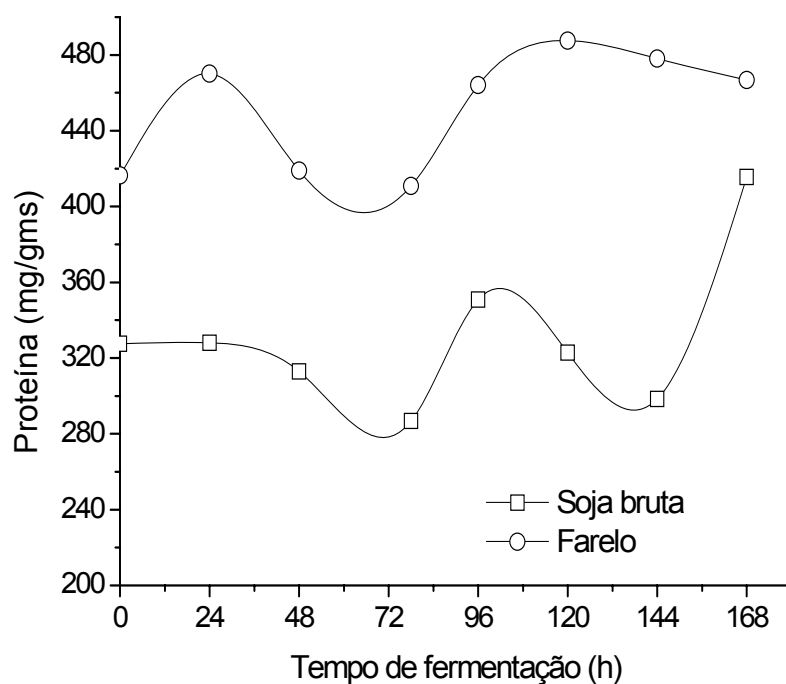


Figura 4.25. Perfis de proteína para a soja convencional bruta e seu farelo

Nos perfis de AE e AE_{esp} da protease, nota-se que a atividade enzimática aumentou com o tempo de fermentação, atingindo o maior valor para 168h de fermentação, tanto para soja bruta quanto para o farelo. Entretanto, para a atividade

específica da protease, a soja bruta apresenta valor mais alto em comparação ao farelo de soja. A maior produção se encontra no tempo de fermentação de 144h. Este resultado se assemelha ao resultado obtido quando da utilização do fungo *Aspergillus niger* sob condições ótimas do processo. Logo, supõe-se que a produção da enzima protease acontece em condições semelhantes para os diferentes fungos utilizados.

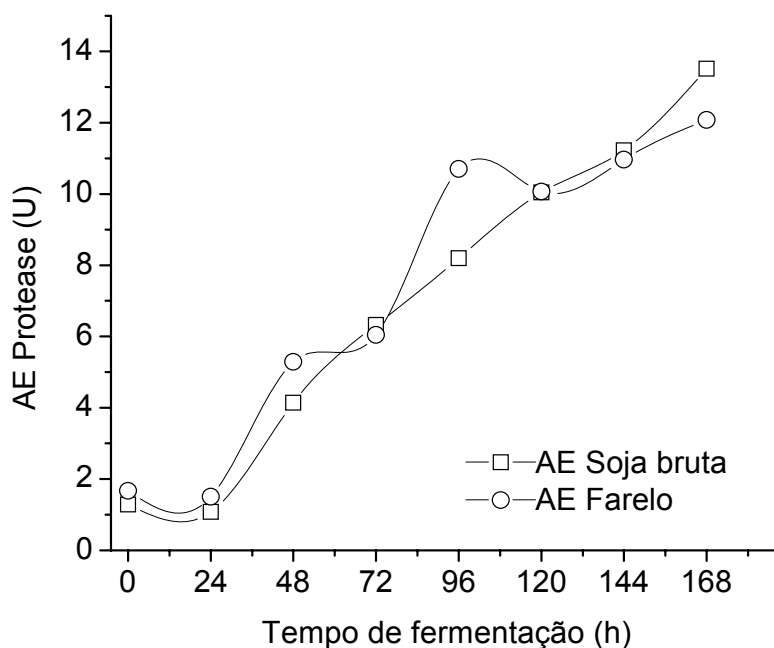


Figura 4.26. Perfis de AE da protease para a soja convencional bruta e seu farelo

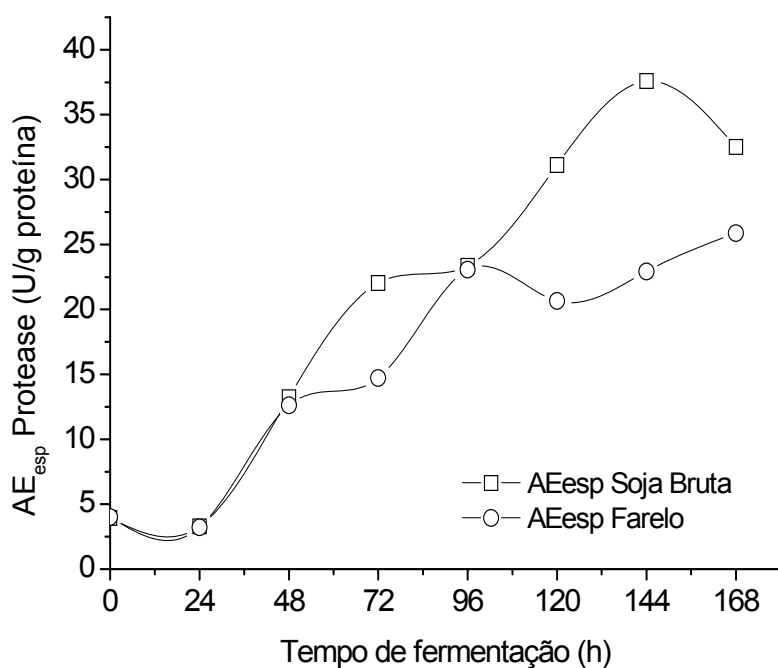


Figura 4.27. Perfis de AE_{esp} da protease para a soja convencional bruta e seu farelo

Os melhores resultados para a protease, para os experimentos utilizando *Aspergillus niger*, comparativamente ao experimento utilizando *Aspergillus clavatus*, são apresentados na tabela 4.12.

Tabela 4.12. Comparativo das produções de protease obtidas neste trabalho

Experimento	Fungo	AE (U)	AE _{esp} (U/g de prot.)
Curva de crescimento	<i>Aspergillus niger</i>	0,64	1,48
Avaliação dos parâmetros da FES	<i>Aspergillus niger</i>	10,88	19,17
Otimização da FES	<i>Aspergillus niger</i>	13,43	21,40
Variação de pH do meio (pH 9,0)	<i>Aspergillus niger</i>	20,00	34,40
Curva de crescimento	<i>Aspergillus clavatus</i>	13,51	37,60

Observa-se que, para o fungo *Aspergillus niger*, a maior produção ocorreu na variação do pH do meio (pH 9,0). Entretanto, o fungo *Aspergillus clavatus*, em pH do meio igual a 6,0 (curva de crescimento) apresentou a maior atividade dentre todos os experimentos, para a soja convencional bruta. Desta maneira, observa-se que os dois tipos de microrganismos utilizados apresentam atividade enzimática semelhante, em diferentes condições de pH do meio. Na produção de protease ácida por *Aspergillus clavatus* em culturas com diferentes quantidades de carbono e nitrogênio, Tremacoldi, Watanabe & Carmona (2004) observaram uma atividade de 80 U/mL, com pH e temperatura ótimos de 2,0 e 40°C, respectivamente. Notaram que culturas com 2% de glicose (m/v) apresentaram cerca de 45% da atividade proteolítica observada nas culturas contendo 1% do mesmo açúcar. Estudando a purificação e as propriedades da protease alcalina produzida por *Aspergillus clavatus*, Tremacoldi *et al.* (2007) obtiveram uma atividade específica no extrato bruto de 32,5 U/mg de proteína, utilizando Fsm com 4 dias de incubação a 25°C. Este resultado apresentado pelo autor é semelhante ao resultado obtido da fermentação da soja com *Aspergillus clavatus*, o que indica que o processo utilizando este substrato torna-se interessante para a produção de protease.

Na figura 4.28 são apresentadas as curvas para a variação temporal de AE e AE_{esp} da lipase. Para a atividade enzimática, pode-se observar um maior valor para a soja bruta em um tempo de fermentação de 96h. Após, os valores decrescem. O farelo de soja apresenta um pico de produção da lipase em 48h, ocorrendo uma oscilação posteriormente. As atividades enzimáticas específicas apresentaram valores mais elevados, comparados às AE, entretanto, alcançando valores pouco expressivos, em ambos os casos.

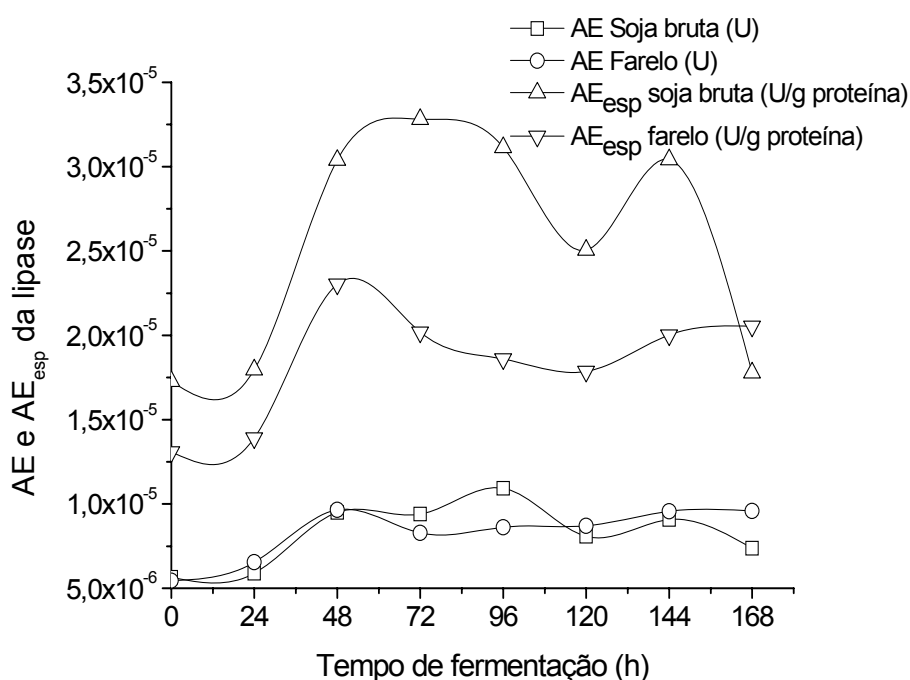


Figura 4.28. Perfis de AE e AE_{esp} da lipase para a soja convencional bruta e seu farelo

A tabela 4.13 mostra os melhores resultados das atividades enzimáticas para a lipase utilizando *Aspergillus niger*, comparativamente ao experimento utilizando *Aspergillus clavatus*. Pode-se observar maior atividade para a lipase na curva de crescimento do *Aspergillus niger*, porém com pequena variação nos valores de AE. Isto caracteriza o processo como não sendo o ideal para produção desta enzima, visto que sua atividade manteve-se baixa em todos os experimentos realizados.

Tabela 4.13. Comparativo das produções de lipase obtida neste trabalho.

Experimento	Fungo	AE (U)
Curva de crescimento	<i>Aspergillus niger</i>	$6,4 \cdot 10^{-4}$
Variação de pH do meio	<i>Aspergillus niger</i>	$1,89 \cdot 10^{-5}$
Curva de crescimento	<i>Aspergillus clavatus</i>	$1,09 \cdot 10^{-5}$

Maldonado (2006) apresentou uma atividade enzimática de 24 U/mL da produção de lipase por *Geotrichum candidum* em reator *airlift*, e concluiu que a utilização deste equipamento proporcionou a obtenção de níveis mais altos de atividade enzimática, provocando menos danos ao micélio celular. Já na produção de lipase sintética por *Rhizopus chinensis* utilizando FES, Sun & Xu (2008) observaram uma produtividade de 0,0244 U/g de substrato, com umidade inicial do meio de 70% e pH inicial de 6,5, utilizando farinha e farelo de trigo como substrato. A

produção com o meio de cultura otimizado (2% de azeite de oliva e peptona) aumentou 15 vezes em relação ao meio inicial. Azeredo *et al.* (2007) apresentaram uma máxima atividade de 17,4 U/g na produção de lipase a partir de *Penicillium restrictum* em FES. Observou a máxima atividade com adição de glicose ao meio fermentativo como fonte extra de carbono. Estudando a purificação e caracterização da lipase por *Aspergillus niger* F044, Shu, Yang & Yan (2007) obtiveram uma atividade específica, no extrato bruto, de 26,37 U/mg de proteína. Mesmo sendo difícil estabelecer um comparativo entre os resultados dos autores e os obtidos neste trabalho utilizando o fungo *Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus* (figuras 4.10 e 4.20), observa-se uma tendência de pouca produtividade da lipase. Este fato confirma a suposição de que o fungo da espécie *Aspergillus* apresenta uma preferência em produzir enzimas amilolíticas e proteolíticas utilizando a soja como substrato, não possuindo uma boa capacidade de produção de enzimas lipolíticas para este substrato, rico em proteínas e polissacarídeos.

Os gráficos das figuras 4.29 e 4.30 apresentam os perfis de AE e AE_{esp} para a amilase, onde nota-se que a AE apresentou picos para a soja bruta nos tempos de 72 e 144h, após, a atividade enzimática decresce. Para a atividade enzimática específica da amilase, os maiores valores encontrados estão nos tempos de fermentação de 72 e 144h para a soja bruta. O farelo apresentou resultados inferiores.

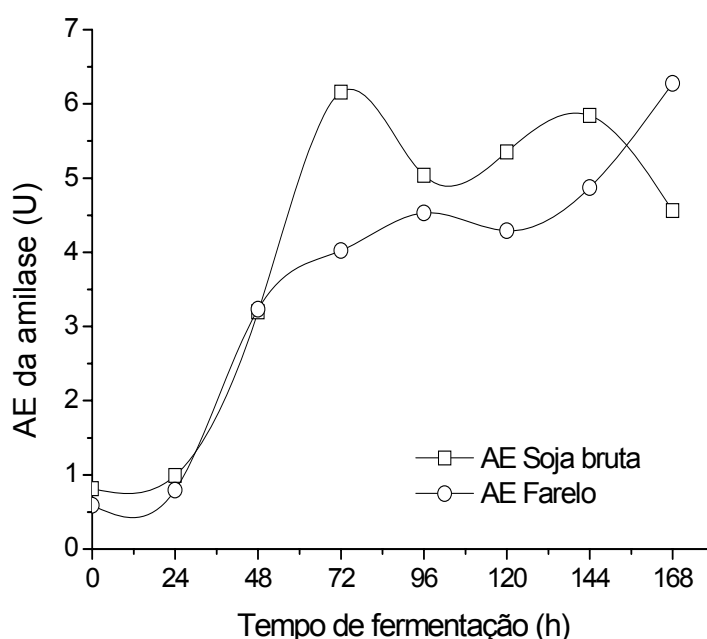


Figura 4.29. Perfis de AE da amilase para a soja convencional bruta e seu farelo.

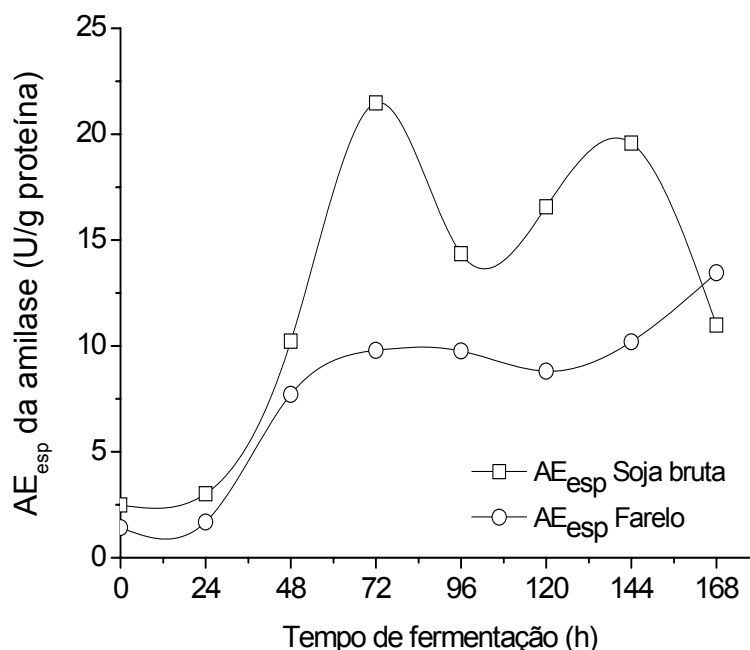


Figura 4.30. Perfis de AE_{esp} da amilase para a soja convencional bruta e seu farelo

Tanyildizi, Özer & Elibol (2005) obtiveram uma atividade máxima de 16,42 U para a α -amilase a 33°C, na otimização e produção por *Bacillus sp* usando farinha de glúten como substrato, onde destacaram a temperatura como principal fator na produção da enzima. No estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando como substrato farelo e casca de arroz, Guandalini (2007) observou uma máxima produtividade de amilase de, aproximadamente, 136 U/g, com uma umidade de 60% e pH 5,5, sendo estes os principais fatores que afetaram a produção da enzima, segundo o autor. Cordeiro, Martins & Luciano (2002), avaliando a produção de α -amilase por *Bacillus sp.* termofílico, notaram uma atividade máxima de 57 U/mL, em meio líquido, após 48h, em pH 7,5.

O comportamento da soja convencional bruta nesta fermentação é análogo ao comportamento do mesmo tipo de soja fermentada com *Aspergillus niger*, onde também verificou-se um pico de produção em 144h. Porém, observa-se a maior atividade específica para esta enzima na fermentação utilizando *Aspergillus clavatus* (figura 4.31), com 72h de fermentação. Destaca-se, então, a amilase produzida por este fungo com soja convencional bruta (aproximadamente 21,5 U/g proteína). O resultado obtido apresenta-se satisfatório, em termos de atividade enzimática, se comparado aos autores mencionados, o que indica que o processo de FES utilizando soja convencional como substrato e o fungo da espécie *Aspergillus* pode ser viável para a produção de amilase.

Nos perfis de AE e AE_{esp} da celulase (figuras 4.31 e 4.32) nota-se que há uma produção exponencial da celulase até 24h, seguida de variação nos valores de atividade, fato que poderia ser atribuído à existência de protease, visto que o fungo também produz esta enzima, uma vez que a soja apresenta elevado teor de proteína. Neste caso, a celulase, sendo uma proteína pode ser eventualmente desnaturada pela protease, o que causaria uma alteração de sua concentração no meio. Também fica evidente que o melhor ponto de atividade tanto para a soja bruta quanto para o farelo é o tempo de 144h.

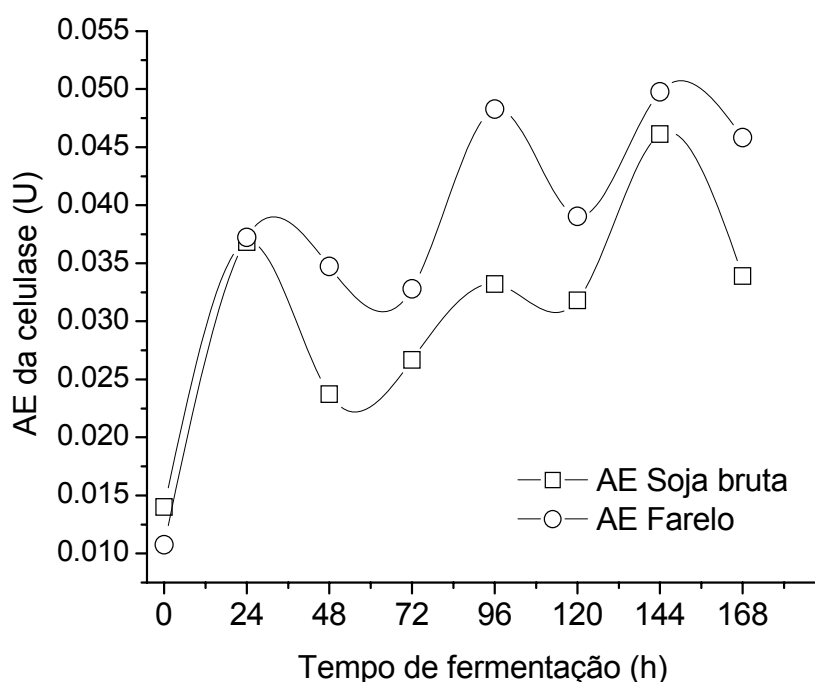


Figura 4.31. Perfis de AE da celulase para a soja convencional bruta e seu farelo

Pressupõe-se que os valores superiores de AE para o farelo evidenciam maior quantidade de material celulósico presente, não degradado pelo processo de extração do óleo. Comparativamente aos resultados obtidos para produção de celulase com *Aspergillus niger*, onde o pH do meio foi variado, o estudo conduzido com *Aspergillus clavatus* apresentou maior valor de AE_{esp} (aproximadamente 0,16 U/g proteína).

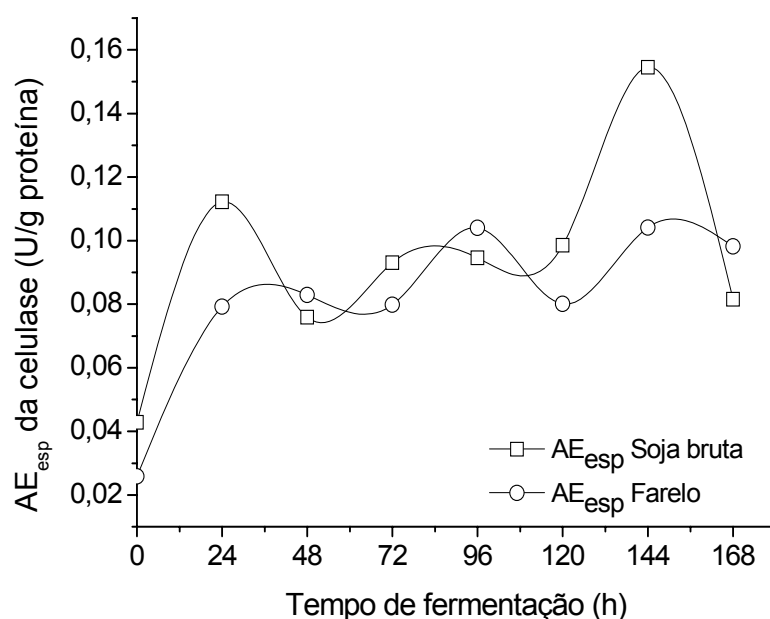


Figura 4.32. Perfis de AE_{esp} da celulase para a soja convencional bruta e seu farelo

Na produção de enzimas lignocelulolíticas por FES utilizando *Fomes sclerodermeus*, Papinutti & Forchiassin (2007) observaram uma máxima atividade enzimática de celulases de 16,5 U/g de farelo de soja, após 12 dias de fermentação. Desta forma, consideraram vantajosa a aplicação do processo em estado sólido para a produção das enzimas, juntamente o substrato, que apresenta um baixo custo de obtenção. De maneira semelhante, Heck, Hertz & Ayub (2002), na produção de celulase e xilanase por FES com resíduo industrial de soja, utilizando espécies amazônicas de *Bacillus*, obtiveram máxima atividade de celulase de 1,08 U/mg de proteína após 24h de cultivo com *Bacillus subtilis*. Na produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aspergillus terreus* por FES utilizando milho como substrato, Gao *et al.*, (2008) observaram um meio ótimo de produção com 80% de umidade contendo milho e 0,8% de extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio. O pH ótimo avaliado foi de 3,0. Os autores concluíram que o fungo avaliado apresenta um grande potencial para a produção da enzima em um curto período de tempo. Com base nos resultados apresentados pelos autores citados, em um comparativo com os valores inferiores obtidos neste estudo, pode-se inferir que a soja e seu resíduo utilizados como substrato para a fermentação, com diâmetro de partícula de 0,6 mm, não apresentam características favoráveis à produção de celulase. Isto pode ser relacionado com o fato de a maior quantidade de material celulósico presente na soja estar nas camadas mais externas do grão, incluindo a casca (tamanho de partícula maior).

No caso da enzima invertase, observam-se perfis de crescimento semelhantes para os dois substratos (figura 4.33). Os maiores valores de AE estão entre 72 e 96h de cultivo (aproximadamente 7 U/mL). Este valor se apresenta quase constante até o fim do período fermentativo. Para a AE_{esp} , o maior valor é observado para a soja bruta com 72h de fermentação (aproximadamente 24 U/mL.g proteína), o que indica uma boa produção da enzima. Os valores de AE e AE_{esp} encontrados indicam que as condições indicadas pelas fermentações anteriores, e aplicadas neste estudo, favorecem a produção da invertase por *Aspergillus clavatus*.

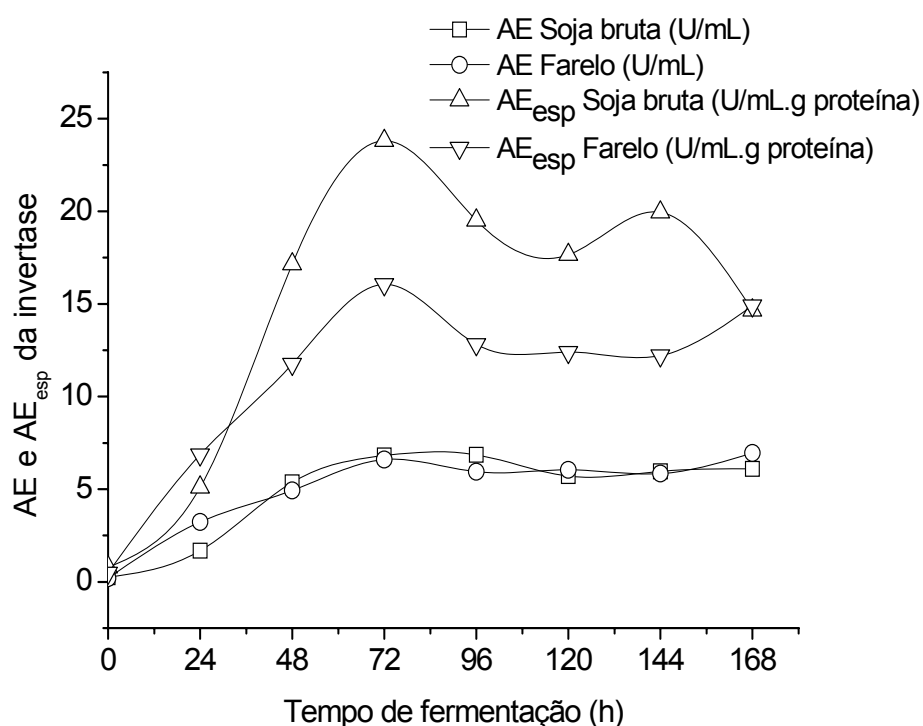


Figura 4.33. Perfis de AE e AE_{esp} da invertase para a soja convencional bruta e seu farelo

Dos estudos apresentados pelos autores citados na referência bibliográfica, na produção e purificação de invertase por FES utilizando *Fusarium* sp. recém isolado, Shaheen, Bhatti & Ashraf (2008) observaram uma máxima atividade de 47,2 U/gmu, a 50°C e pH 5,0, onde constataram a inativação da enzima acima desta temperatura. Na produção de invertase por espécies mutantes de *Aspergillus niger*, Montiel-González *et al.* (2004) notaram uma máxima AE de 48,91 U/mL, por FES, e concluíram que o processo apresentou resultados satisfatórios com a utilização do fungo em questão. No estudo e caracterização de uma nova subfamília de invertase intracelular (SucB), Goosen *et al.* (2007) obtiveram uma máxima atividade específica de, aproximadamente, 4,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, em meio contendo sacarose.

4.7. Estudo da variação do pH e de fontes de nutrientes da FES com *Aspergillus casingii*

Para realização deste estudo, que avaliou a produção das enzimas amilase, protease e invertase, a fermentação foi conduzida utilizando-se os seguintes parâmetros fixos: farelo de soja convencional como substrato, tempo de fermentação de 144h, temperatura de 28°C, diâmetro de partícula do substrato de 0,6 mm, concentração inicial do inóculo de $4 \cdot 10^6$ esporos/gms e umidade inicial do meio de 50%.

O planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}_v , de resolução v, foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste estudo, as quais foram: fonte de carbono inorgânica (glicose), fonte de nitrogênio (NaNO_3), fonte de carbono e nitrogênio (peptona de carne) e fonte de minerais (fonte orgânica de carbono), baseada no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para a variação inicial de nutrientes do meio. A variação inicial do pH foi obtida pela utilização de soluções-tampão com o valor de pH adequado. Na tabela 4.14 são apresentadas as especificações dos níveis das variáveis utilizadas no planejamento, que resultou em 19 ensaios, incluindo uma triplicata no ponto central, que permite o cálculo do erro padrão com maior número de graus de liberdade.

Tabela 4.14. Especificações nos níveis das variáveis usadas no planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Níveis		
	-1	0	1
Fonte de Carbono (glicose), (C_C) %	0	1	2
Fonte de Nitrogênio (NaNO_3), (C_N) %	0	1	2
Fonte de Carbono e Nitrogênio (peptona de carne), (C_{CeN}) %	0	1	2
Fonte de Minerais, (C_{MIN}) %	0	1	2
pH solução tampão	3,0	6,0	9,0

As tabelas 4.15 e 4.16 mostram a matriz do planejamento, com suas variáveis nas suas formas codificadas e os resultados obtidos para AE e AE_{esp} da protease, amilase e invertase, respectivamente. A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE e AE_{esp} da protease são apresentadas nas tabelas 4.17 e 4.18, onde os valores destacados em negrito e *italico* indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 4.15. Matriz do planejamento 2^{5-1}_v

Ensaio	Fonte de C	Fonte de N	Fonte de C e N	Fonte de Minerais	pH
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 4.16. Resultados para AE e AE_{esp} da protease, amilase e invertase

Ensaio	Protease		Amilase		Invertase	
	AE (U)	AE_{esp} (U/g prot.)	AE (U)	AE_{esp} (U/g prot.)	AE (U/mL)	AE_{esp} (U/mL.g prot.)
1	14,7387	25,3896	0,6931	1,1939	5,9551	10,2585
2	51,2833	87,8891	4,2491	7,2822	5,0526	8,6592
3	18,4486	37,4591	5,3350	10,8325	4,5389	9,2161
4	5,8085	11,0702	0,6136	1,1695	7,2758	13,8666
5	27,4114	58,6339	1,5588	3,3343	4,8182	10,3064
6	44,4387	79,1428	0,8863	1,5784	5,6365	10,0383
7	6,0423	12,4379	0,4804	0,9889	6,4351	13,2464
8	34,2715	64,8468	5,3063	10,0404	5,0456	9,5470
9	29,8591	66,8288	2,5744	5,7619	4,2793	9,5777
10	41,3514	80,8907	1,4091	2,7565	5,8625	11,4680
11	2,8880	5,2980	0,2698	0,4950	6,8982	12,6550
12	41,2657	76,1219	5,2399	9,6659	5,7642	10,6331
13	17,9887	35,7985	0,7406	1,4738	4,5937	9,1417
14	53,2671	104,0577	2,6840	5,2433	3,8596	7,5398
15	16,4570	40,4251	2,2468	5,5190	4,3368	10,6530
16	12,2720	22,9512	0,3908	0,7308	6,5881	12,3211
17	26,5564	59,7445	6,1053	13,7353	4,8463	10,9028
18	24,4181	43,1796	6,7097	11,8650	4,7495	8,3987
19	27,7595	53,8496	6,6786	12,9556	4,6260	8,9737

Tabela 4.17. Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	26,1329	0,3182	0,000004	26,1329
Fonte de C	18,7655	0,6936	0,000111	9,3822
Fonte de N	-17,8606	0,6936	0,000128	-8,9303
Fonte de C e N	0,8132	0,6936	0,325643	0,4066
Fonte de Minerais	1,6133	0,6936	0,102527	0,8066
pH	-15,8419	0,6936	0,000184	-7,9210
Fonte de C x Fonte de N	-6,3201	0,6936	0,002793	-3,1600
Fonte de C x Fonte de C e N	0,3219	0,6936	0,674150	0,1609
Fonte de C x Fonte de Minerais	1,4753	0,6936	0,123359	0,7376
Fonte de C x pH	-3,2123	0,6936	0,018961	-1,6062
Fonte de N x Fonte de C ver	-0,6552	0,6936	0,414544	-0,3276
Fonte de N x Fonte de Minerais	0,4647	0,6936	0,550841	0,2323
Fonte de N x pH	-5,0161	0,6936	0,005452	-2,5080
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-4,6580	0,6936	0,006739	-2,3290
Fonte de C e N x pH	3,1756	0,6936	0,019558	1,5878
Fonte de Minerais x pH	-0,7453	0,6936	0,361318	-0,3726

$R^2 = 0,998$; $R = 0,999$

Tabela 4.18. Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da protease para o planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	50,8429	1,6121	0,000070	50,8429
Fonte de C	30,5874	3,5134	0,003190	15,2937
Fonte de N	-33,5026	3,5134	0,002446	-16,7513
Fonte de C e N	3,4183	3,5134	0,402350	1,7092
Fonte de Minerais	6,9378	3,5134	0,142799	3,4689
pH	-32,9104	3,5134	0,002577	-16,4552
Fonte de C x Fonte de N	-10,7449	3,5134	0,055069	-5,3725
Fonte de C x Fonte de C e N	0,3383	3,5134	0,929356	0,1692
Fonte de C x Fonte de Minerais	3,3303	3,5134	0,413118	1,6652
Fonte de C x pH	-1,8047	3,5134	0,642928	-0,9024
Fonte de N x Fonte de C ver	-0,7404	3,5134	0,846605	-0,3702
Fonte de N x Fonte de Minerais	-2,1923	3,5134	0,576878	-1,0961
Fonte de N x pH	-8,8635	3,5134	0,085970	-4,4317
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-9,8950	3,5134	0,066941	-4,9475
Fonte de C e N x pH	3,5022	3,5134	0,392332	1,7511
Fonte de Minerais x pH	-2,7133	3,5134	0,496212	-1,3567

$R^2 = 0,989$; $R = 0,994$

Pelos resultados apresentados na tabela 4.17, nota-se que as variáveis fonte de C, fonte de N e pH e as interações entre fonte de C x fonte de N, fonte de C x pH, fonte de N x pH, fonte de C e N x fonte de minerais e fonte de C e N x pH foram significativas para a atividade enzimática da protease. Para a atividade enzimática

específica, a tabela 4.18 mostra que as variáveis fonte de C, fonte de N e pH foram significativas. Verifica-se que com um aumento do valor da fonte de C ou da interação entre e fonte C e N x pH, a AE da protease será aumentada. Por outro lado, se a fonte de N, o pH e as interações entre fonte de C x fonte de N, fonte de C x pH, fonte de N x pH e fonte de C e N x fonte de minerais forem aumentadas, haverá diminuição de AE. Já para AE_{esp} , se a fonte de C for aumentada, ocorrerá um aumento da resposta. Em contrapartida, com um aumento da fonte de N ou do pH haverá uma diminuição da atividade específica.

Na tabela 4.19 são apresentados os resultados da análise de variância para AE e AE_{esp} da protease. Em ambos os casos, para um intervalo de confiança de 95%, têm-se o valor tabelado de F, com os respectivos graus de liberdade: $F_{tab}(15;3;0,05)=8,7$, e $F_{calc}>F_{tab}$, portanto o modelo linear proposto é válido.

Tabela 4.19. Análise de variância obtida para o planejamento 2^{5-1}_v para AE e AE_{esp} .

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F _{calc}	
	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}
Regressão	4144,25	14129,21	15	15	276,28	941,95	143,9	19,08
Resíduos	5,77	148,13	3	3	1,92	49,38		
Total	4150,02	14277,34	18	18				

Pode-se então escrever empiricamente os modelos matemáticos de AE e AE_{esp} em função das variáveis significativas (equações 4 e 5), uma vez que os mesmos apresentam um coeficiente de correlação satisfatório ($R^2 = 0,998$ e $0,989$, respectivamente).

$$AE \text{ (U)} = 26,1329 + 9,3822.C_C - 8,9303.C_N - 7,9210.pH - 3,1600.C_C.C_N - 1,6062.C_C.pH - 2,5080.C_N.pH - 2,3290.C_{CeN}.C_{Min} + 1,5878.C_{CeN}.pH \quad (4)$$

$$AE_{esp} \text{ (U/g de proteína)} = 50,8429 + 15,2937.C_C - 16,7513.C_N - 16,4552.pH \quad (5)$$

Nos gráficos da figura 4.34 (a) e (b) os resíduos do modelo distribuem-se sobre o ponto zero e de forma aleatória.

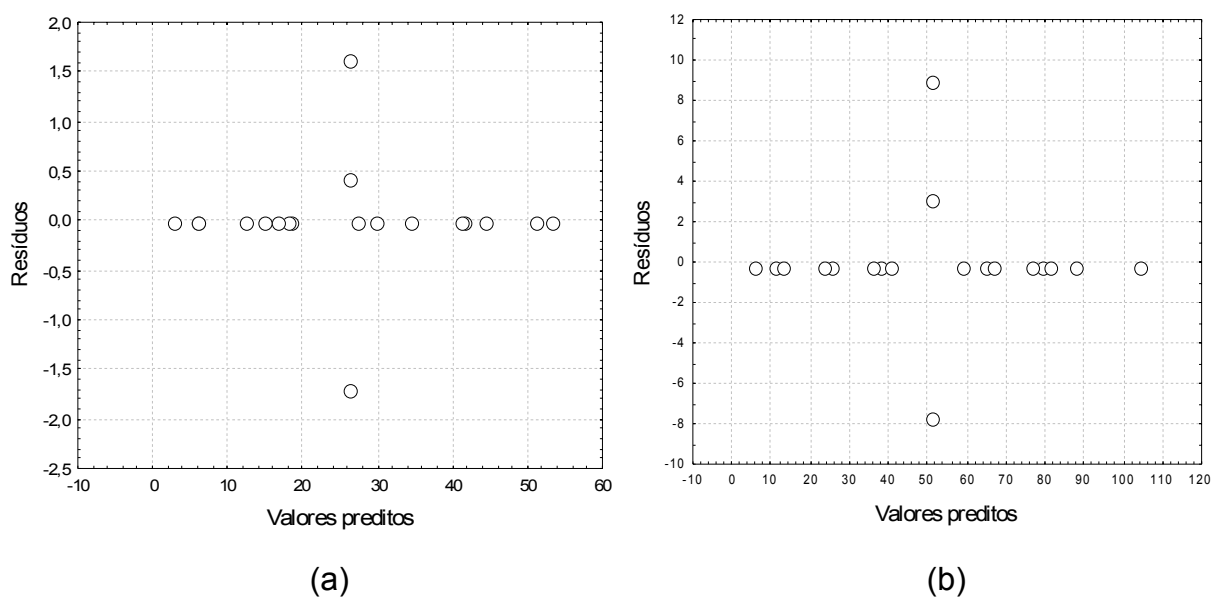


Figura 4.34. Resíduos do modelo do planejamento 2^{5-1}_v para a protease, (a) AE e (b) AE_{esp}

As superfícies de resposta para a AE da protease são apresentadas na figura 4.35, e, como visto nos resultados para o planejamento, indicam que valores mais altos podem ser obtidos com o aumento da fonte de carbono e diminuição da fonte de nitrogênio e pH.

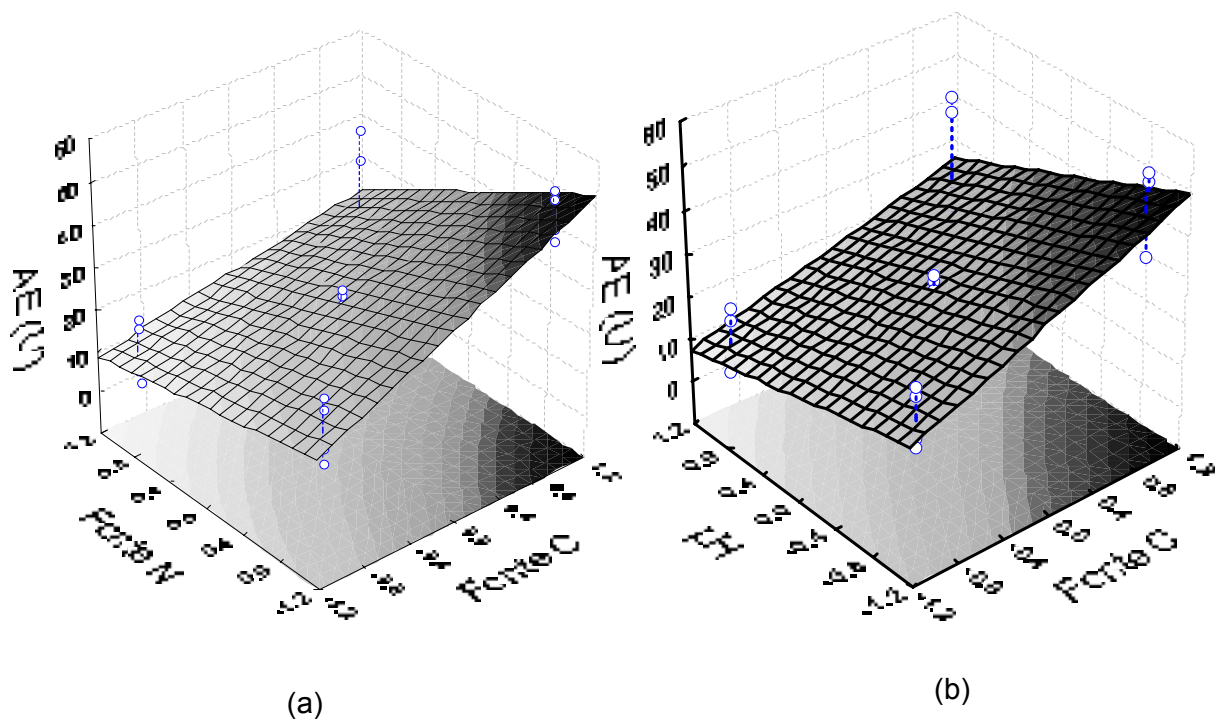


Figura 4.35. Superfícies de resposta: (a) e (b) AE da protease

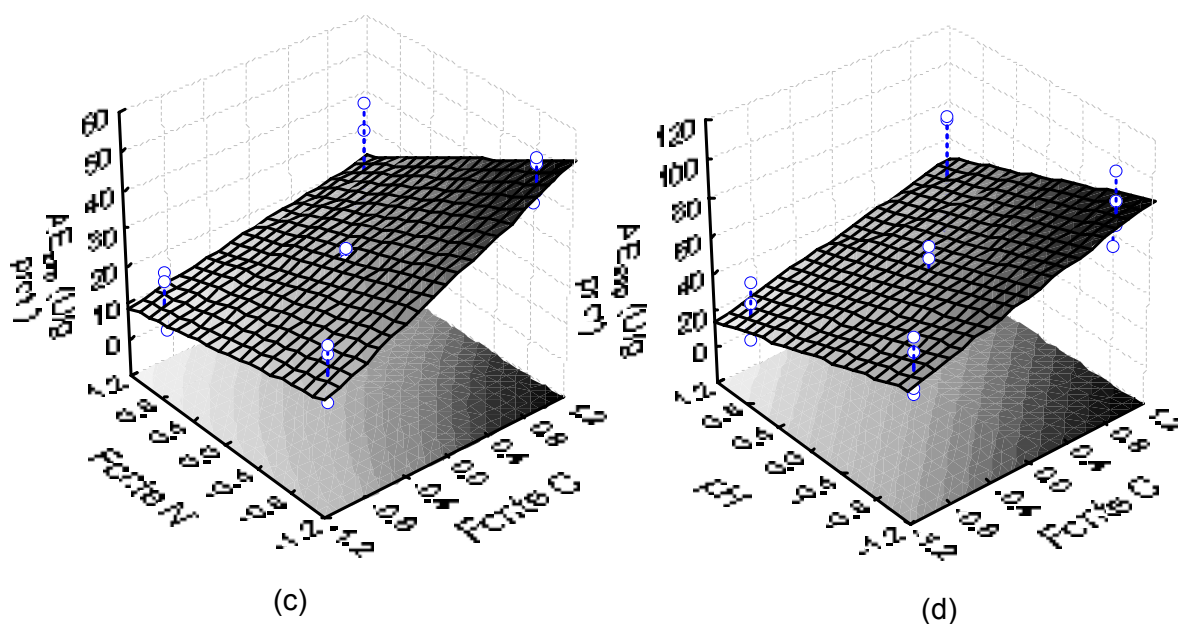


Figura 4.35 (cont.). Superfícies de resposta: (c) e (d) AE_{esp} da protease

Na tabela 4.16, onde são apresentados os resultados para o planejamento, os melhores de valores de AE e AE_{esp} para a protease (53,2671 U e 104,0577 U/g de proteína, respectivamente), foram obtidos para a maior quantidade de fonte inorgânica de carbono presente no meio fermentativo (2%) e para a menor quantidade de fonte de nitrogênio (0%) e menor valor de pH (3,0). Estes valores são superiores aos valores obtidos nas fermentações com *Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus*, indicando que o meio fermentativo com adição de nutrientes apresenta melhores condições para a produção de maiores quantidades de protease. Na produção de protease por processo submerso utilizando *Aspergillus terreus*, Wu *et al.* (2006) observaram máxima atividade da enzima de 129 U/mL após 4 dias de fermentação do meio, que utilizou resíduo de óleo de palma como substrato. Concluíram que a adição de nutrientes e controle do pH não afetaram significativamente o rendimento do processo, porém, a diluição do meio de 75% para 100% diminuiu a atividade em 40%. Na obtenção de extratos proteolíticos por meio de FES pelo fungo *Aspergillus oryzae* utilizando farinha de peixe como substrato, García-Gómez *et al.* (2008) obtiveram uma atividade da protease alcalina (pH 10,0) de 120 U/L. Após estudos, puderam verificar que a enzima produzida no experimento apresentou maior grau de hidrólise, comparando-se com a enzima obtida comercialmente (22,2% contra 9,1%, respectivamente).

Apesar de não ser possível a comparação dos resultados apresentados pelos autores mencionados com os resultados deste estudo, pode-se verificar que a produção de protease por soja convencional e adição de nutriente por FES com fungo *Aspergillus casingii* apresentou o maior valor dentre os estudos realizados neste trabalho, confirmando a viabilidade do substrato e a capacidade do fungo da espécie *Aspergillus* de produzir a enzima.

Para a análise dos resultados obtidos para a amilase, a estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento referentes à AE e AE_{esp} são apresentadas nas tabelas 4.20 e 4.21, onde os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95%.

Logo, observa-se que nenhum dos efeitos principais e interações entre as variáveis apresentou significância para ambos os casos de AE e AE_{esp}. Assim, as variáveis empregadas neste estudo não apresentaram relevância na produção de amilase por *Aspergillus casingii* por FES utilizando farelo de soja convencional como substrato.

Tabela 4.20. Estimativa dos efeitos para AE da amilase para o planejamento 2⁵⁻¹_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	2,8511	0,9139	0,052483	2,8511
Fonte de C	0,8600	1,9918	0,695047	0,4300
Fonte de N	0,6359	1,9918	0,770470	0,3179
Fonte de C e N	-0,7612	1,9918	0,727784	-0,3806
Fonte de Minerais	-0,4459	1,9918	0,837241	-0,2229
pH	-2,9638	1,9918	0,233484	-1,4819
Fonte de C x Fonte de N	-0,0554	1,9918	0,979558	-0,0277
Fonte de C x Fonte de C e N	0,2001	1,9918	0,926290	0,1000
Fonte de C x Fonte de Minerais	0,1130	1,9918	0,958322	0,0565
Fonte de C x pH	-0,5810	1,9918	0,789510	-0,2905
Fonte de N x Fonte de C ver	0,0027	1,9918	0,998983	0,0013
Fonte de N x Fonte de Minerais	-0,4511	1,9918	0,835378	-0,2255
Fonte de N x pH	-1,1295	1,9918	0,610322	-0,5647
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-0,0965	1,9918	0,964403	-0,0482
Fonte de C e N x pH	0,6393	1,9918	0,769278	0,3196
Fonte de Minerais x pH	0,4801	1,9918	0,825049	0,2400

R² = 0,526 ; R = 0,726

Tabela 4.21. Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da amilase para o planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	5,6116	1,8186	0,053894	5,6116
Fonte de C	1,1084	3,9635	0,797909	0,5542
Fonte de N	1,3522	3,9635	0,755478	0,6761
Fonte de C e N	-1,2810	3,9635	0,767754	-0,6405
Fonte de Minerais	-0,5967	3,9635	0,889879	-0,2983
pH	-5,9115	3,9635	0,232637	-2,9557
Fonte de C x Fonte de N	-0,1656	3,9635	0,969287	-0,0828
Fonte de C x Fonte de C e N	0,4607	3,9635	0,914800	0,2303
Fonte de C x Fonte de Minerais	0,1782	3,9635	0,966958	0,0891
Fonte de C x pH	-0,5875	3,9635	0,891556	-0,2937
Fonte de N x Fonte de C ver	0,0601	3,9635	0,988852	0,0300
Fonte de N x Fonte de Minerais	-1,0584	3,9635	0,806746	-0,5291
Fonte de N x pH	-2,2568	3,9635	0,608933	-1,1284
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-0,1470	3,9635	0,972738	-0,0735
Fonte de C e N x pH	1,0703	3,9635	0,804641	0,5351
Fonte de Minerais x pH	0,7280	3,9635	0,865967	0,3640

$R^2 = 0,507$; $R = 0,712$

As tabelas 4.22 e 4.23 apresentam a estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE e AE_{esp} da invertase, para o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.22. Estimativa dos efeitos para AE da invertase para o planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	5,3243	0,1473	0,000047	5,3243
Fonte de C	0,4037	0,3212	0,297821	0,2018
Fonte de N	0,8532	0,3212	0,076609	0,4266
Fonte de C e N	-0,5391	0,3212	0,191886	-0,2696
Fonte de Minerais	-0,3219	0,3212	0,390110	-0,1610
pH	1,4437	0,3212	0,020562	0,7218
Fonte de C x Fonte de N	0,2125	0,3212	0,555634	0,1062
Fonte de C x Fonte de C e N	-0,1672	0,3212	0,638709	-0,0836
Fonte de C x Fonte de Minerais	0,0879	0,3212	0,802138	0,0439
Fonte de C x pH	-0,0335	0,3212	0,923505	-0,0168
Fonte de N x Fonte de C ver	0,0212	0,3212	0,951470	0,0106
Fonte de N x Fonte de Minerais	0,3949	0,3212	0,306567	0,1975
Fonte de N x pH	0,4342	0,3212	0,269360	0,2171
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-0,3174	0,3212	0,396011	-0,1587
Fonte de C e N x pH	-0,1454	0,3212	0,681468	-0,0727
Fonte de Minerais x pH	-0,0181	0,3212	0,958678	-0,0090

$R^2 = 0,927$; $R = 0,963$

Tabela 4.23. Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da invertase para o planejamento 2^{5-1}_v

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
Intercepto	10,38964	0,3442	0,000080	10,3896
Fonte de C	-0,12271	0,7503	0,880482	-0,0614
Fonte de N	1,89359	0,7503	0,085892	0,9468
Fonte de C e N	-0,44256	0,7503	0,596772	-0,2213
Fonte de Minerais	-0,14364	0,7503	0,860405	-0,0718
pH	2,10791	0,7503	0,067325	1,0539
Fonte de C x Fonte de N	0,27204	0,7503	0,740963	0,1360
Fonte de C x Fonte de C e N	-0,85261	0,7503	0,338366	-0,4263
Fonte de C x Fonte de Minerais	0,10636	0,7503	0,896254	0,0532
Fonte de C x pH	0,72081	0,7503	0,407574	0,3604
Fonte de N x Fonte de C ver	0,29174	0,7503	0,723358	0,1459
Fonte de N x Fonte de Minerais	0,24016	0,7503	0,769899	0,1201
Fonte de N x pH	0,90206	0,7503	0,315501	0,4510
Fonte de C e N x Fonte de Minerais	-0,72699	0,7503	0,404050	-0,3635
Fonte de C e N x pH	-0,43259	0,7503	0,604656	-0,2163
Fonte de Minerais x pH	-0,31236	0,7503	0,705169	-0,1562

$R^2 = 0,870$; $R = 0,933$

Nota-se apenas a variável pH para AE apresentou influência significativa no processo, ao passo que para a AE_{esp} , nenhuma das variáveis e interações avaliadas foi significativa. Entretanto, com o intuito de verificar uma possível direção a ser tomada na condução de experimentos futuros, observa-se que, para ambos os casos de AE e AE_{esp} , o pH e a fonte de nitrogênio, que são as variáveis que mais se aproximaram do intervalo de confiança de 95% ($p\text{-valor} < 0,05$), influenciaram as respostas de forma positiva; têm-se um aumento de AE e AE_{esp} com o aumento do valor destas variáveis.

A análise de variância para as duas respostas referentes à invertase é apresentada na tabela 4.24. Nos dois casos, para um intervalo de confiança de 95%, têm-se o valor tabelado de F, com os respectivos graus de liberdade: $F_{tab} (15;3;0,05)=8,7$.

Tabela 4.24. Análise de variância obtida para o planejamento 2^{5-1}_v para AE e AE_{esp} .

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F_{calc}	
	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}
Regressão	15,67	45,45	15	15	1,04	3,03	2,53	1,35
Resíduos	1,24	6,75	3	3	0,41	2,25		
Total	16,91	52,20	18	18				

Desta forma, pelo teste F nota-se que $F_{calc} < F_{tab}$, logo, o modelo linear proposto não é válido para prever o comportamento do processo. Porém, as

superfícies de resposta para AE e AE_{esp} que são apresentadas na figura 4.36, podem ser avaliadas a fim de verificar a direção a ser tomada para a realização de estudos subseqüentes com a finalidade de aumentar os valores de AE e AE_{esp} . Nos dois casos observa-se que se houver um aumento nos valores de pH e fonte de nitrogênio, serão obtidos maiores valores das respostas, conforme os resultados apresentados do planejamento.

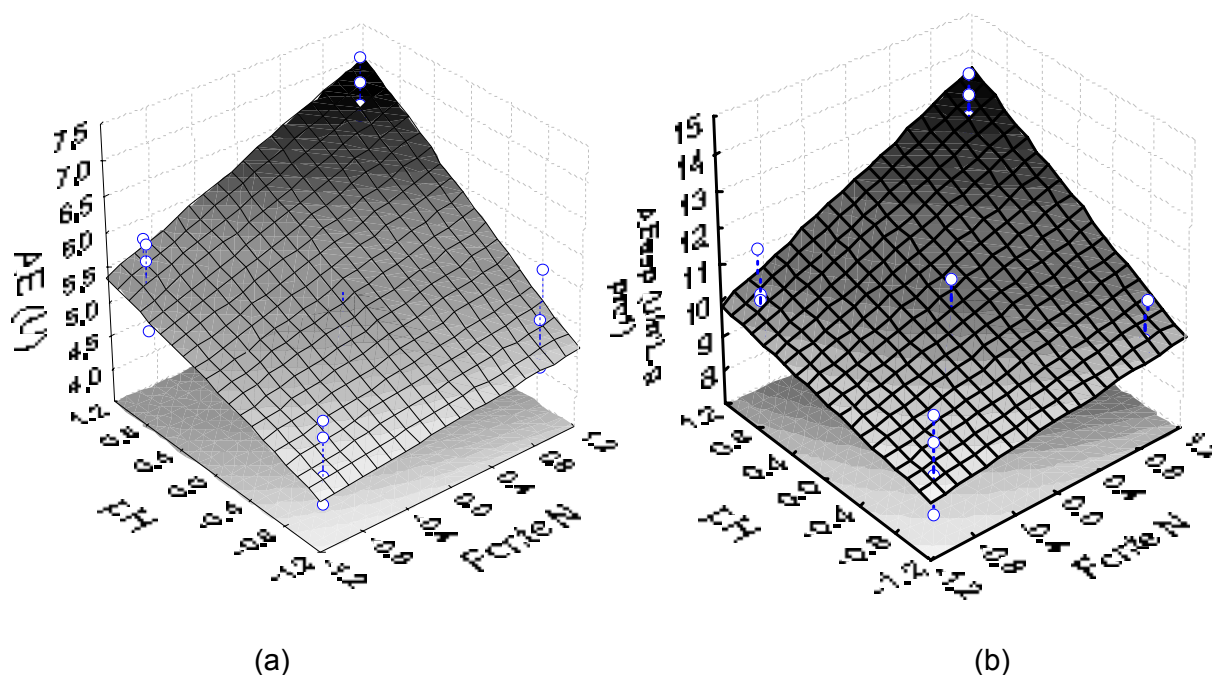


Figura 4.36. Superfícies de resposta: (a) AE e (b) AE_{esp} da invertase

Na tabela 4.16, que apresenta os resultados para o planejamento, os melhores valores de AE e AE_{esp} para a invertase (7,2758 U e 13,8666 U/mL.g de proteína, respectivamente), foram obtidos para a maior quantidade de fonte de nitrogênio presente no meio fermentativo (2%) e para o maior valor de pH (9,0), confirmando assim a orientação indicada pelas superfícies de resposta.

Investigando a otimização dos meios de cultura para a produção de invertase por *Aspergillus niger* utilizando FES e FSm, Balasubramaniam, Kayalvizhi & Gunasekaran (2001) observaram máxima produtividade no processo em estado sólido, utilizando bagaço de cana como substrato, de 149,1 U/L.h. Concluíram que este processo favorece a produção da enzima em maior quantidade, se comparado com o processo submerso (58,3 U/L.h). No estudo da regulação da síntese da invertase por *Aspergillus niger*, Rubio & Navarro (2006) obtiveram máxima atividade da enzima de 4,0 U/mL, em meio nutriente com adição de sacarose (10g/L), em

fermentação sólida. Ao observar os resultados obtidos para a invertase com farelo de soja convencional e adição de nutrientes, utilizando *Aspergillus casingii*, pode-se constatar que este processo torna-se interessante para a produção da enzima, pois apresentou resultados de AE superior ao mencionado por Rubio & Navarro (2006). Nota-se também que a produção da invertase por *Aspergillus casingii* foi semelhante à produção pelo fungo *Aspergillus clavatus*, o que pode indicar uma característica favorável à obtenção da enzima por fungo da espécie *Aspergillus* utilizando soja como substrato.

4.8. Otimização dos parâmetros da FES com *Aspergillus casingii*

Para a realização deste estudo, que avaliou a produção da enzima invertase, foram utilizados os melhores parâmetros obtidos no estudo anterior: farelo de soja convencional como substrato, concentração inicial de inóculo de 4.10^6 esporos/gms, tempo de fermentação de 144h, umidade inicial do meio fermentativo de 50%, diâmetro de partícula de 0,6 mm e temperatura de 28°C.

Os efeitos negativos obtidos para fonte de C, fonte de C e N e fonte de minerais (tabela 4.23) indicam que atividades maiores de invertase são obtidas para concentrações mais baixas dessas fontes. Assim, estas fontes foram suprimidas do estudo de otimização, que por sua vez utilizará apenas as variáveis pH inicial do meio e fonte de N. Para isso será usado um planejamento do tipo DCCR com duas variáveis, as quais estão especificadas na tabela 4.25.

Tabela 4.25. Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR.

Variável	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Fonte de nitrogênio (NaNO ₃), (C _N) %	1,0	1,6	3,0	4,4	5,0
pH	6,0	6,7	8,5	10,3	11,0

A tabela 4.26 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos para AE e AE_{esp} da invertase.

Tabela 4.26. Matriz do planejamento DCCR para a invertase

Ensaio	Fonte de N	pH	AE (U/mL)	AE _{esp} (U/mL.g proteína)
1	-1	-1	5,5885	11,0905
2	+1	-1	5,9992	12,6218
3	-1	+1	5,2592	10,2121
4	+1	+1	5,4014	10,0342
5	-1,414	0	5,6700	11,2345
6	+1,414	0	6,9492	13,7254
7	0	-1,414	5,4689	9,4178
8	0	+1,414	5,7041	10,2225
9	0	0	6,3078	11,9579
10	0	0	6,5121	17,4121
11	0	0	6,4480	12,0953
12	0	0	6,5556	11,9476

Nas tabelas 4.27 e 4.28 são apresentadas as estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE e AE_{esp} da invertase, onde (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 4.27. Estimativa dos efeitos para AE da invertase para o planejamento DCCR.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<i>Intercepto</i>	6,4559	0,1742	0,000000	6,4559
Fonte de N (L)	0,5904	0,2464	0,053550	0,2952
Fonte de N (Q)	-0,3394	0,2755	0,264124	-0,1697
pH (L)	-0,1486	0,2464	0,568464	-0,0743
<i>pH (Q)</i>	-1,0627	0,2755	0,008391	-0,5313
Fonte de N (L) x pH (L)	-0,1343	0,3484	0,713312	-0,0671

$R^2 = 0,781$; $R = 0,884$

Tabela 4.28. Estimativa dos efeitos para AE_{esp} da invertase para o planejamento DCCR.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<i>Intercepto</i>	13,3532	1,0261	0,000013	13,3532
Fonte de N (L)	1,2191	1,4512	0,433070	0,6096
Fonte de N (Q)	-0,9535	1,6227	0,578255	-0,4767
pH (L)	-0,5821	1,4512	0,702214	-0,2911
pH (Q)	-3,6141	1,6227	0,067530	-1,8070
Fonte de N (L) x pH (L)	-0,8546	2,0522	0,691568	-0,4273

$R^2 = 0,500$; $R = 0,707$

Observa-se que, para a AE no intervalo de confiança de 95%, apenas o pH quadrático foi significativo. Já para a AE_{esp} , nenhuma das variáveis e interações avaliadas foi significativa. A análise de variância para o planejamento para AE e AE_{esp} é apresentada na tabela 4.29. Para ambos os casos, com um intervalo de confiança de 95%, o valor tabelado de F, com seus respectivos graus de liberdade é: $F_{tab}(5;6;0,05)=4,39$.

Tabela 4.29. Análise de variância obtida para o planejamento DCCR para AE e AE_{esp} .

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F_{calc}	
	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}	AE	AE_{esp}
Regressão	2,59	25,36	5	5	0,52	5,07	4,33	1,20
Resíduos	0,73	25,27	6	6	0,12	4,21		
Total	3,32	50,63	11	11				

Pelo teste F nota-se que $F_{calc} < F_{tab}$ para as atividades enzimática e enzimática específica da invertase, logo, o modelo linear proposto não é válido para prever o comportamento do processo em ambos os casos. Entretanto pode-se utilizar as superfícies de resposta com o intuito de verificar a direção a ser tomada para a realização de estudos subseqüentes com a finalidade de aumentar os valores de AE e AE_{esp} , que são apresentadas na figura 4.37.

Nota-se que um aumento da AE é alcançado se o valor da fonte nitrogênio for aumentado e o valor do pH inicial for diminuído. Para a AE_{esp} a superfície de resposta apresenta um comportamento semelhante à superfície da AE, desta maneira, evidenciando que o pH quadrático deve ser diminuído para se alcançar maiores valores de atividade específica.

Observando os resultados da tabela 4.26, os melhores valores de AE e AE_{esp} da invertase encontram-se nos pontos centrais do planejamento; os pontos extremos (-1,414 e +1,414) apresentam os piores resultados. Assim, avaliando estas respostas de acordo com os resultados apresentados na análise estatística do planejamento, que indicam valores maiores para fonte de nitrogênio e valores menores para pH, pode-se concluir que o melhor pH e a melhor quantidade de fonte de nitrogênio para a produção da enzima por *Aspergillus casiellus* é 6,7 e 3%, respectivamente.

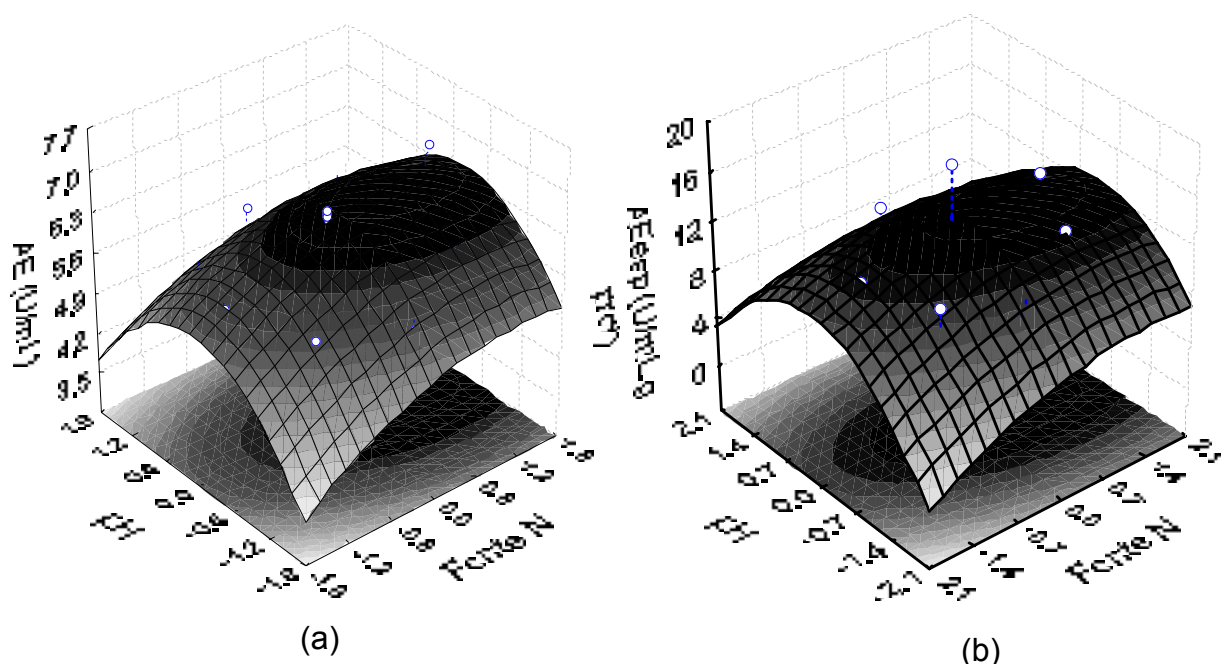


Figura 4.37. Superfícies de resposta: (a) AE e (b) AE_{esp} da protease

Mamma, Kourtoglou & Christakopoulos (2008) observaram uma máxima atividade da invertase de 72,5 U/g de substrato com 90% de umidade e pH 5,0, utilizando *Aspergillus niger*, na produção de enzimas para a indústria de processamento de cítricos, obtendo resultados satisfatórios na degradação de polissacarídeos da laranja. Também utilizando *Aspergillus niger*, L'Hocine *et al.* (2000) obtiveram máxima atividade da invertase no extrato cru de 72U/g de substrato, utilizando sacarose, na purificação e caracterização da enzima. Os resultados obtidos neste estudo para AE e AE_{esp} da invertase (6,9492 U/mL e 13,7254 U/mL.g de proteína, respectivamente), embora sejam de difícil comparação com os resultados apresentados pelos autores, são semelhantes aos obtidos nas fermentações anteriores com *Aspergillus clavatus*, o que indicam que o processo fermentativo utilizando soja produz a enzima, viabilizando seu uso como substrato. Nota-se também, para a invertase, que os valores encontrados de AE e AE_{esp} em meio otimizado com fonte de nutrientes não diferem muito dos valores obtidos em meio sem adição de nutrientes, o que pode sugerir que esta variável do processo não apresenta grande relevância na produção da enzima.

4.9. Curvas de crescimento do *Aspergillus casingii*

A partir dos resultados da otimização fez-se as curvas de crescimento do *Aspergillus casingii* para verificar o comportamento do processo. A FES foi conduzida utilizando-se farelo de soja convencional como substrato, 50% de umidade inicial do meio, temperatura de 28°C, tempo de fermentação de 168h, diâmetro de partícula de 0,6 mm, concentração inicial do inóculo de $4 \cdot 10^6$ esporos/gms, pH 6,7 e 3% de fonte de nitrogênio (NaNO_3).

Com relação às curvas de crescimento, espera-se observar um consumo do substrato pelo microrganismo ao longo do processo, o que proporcionará a produção de metabólitos. Este comportamento é observado na figura 4.38, onde o perfil de ART decresce entre 0 e 48h e após, apresenta-se constante.

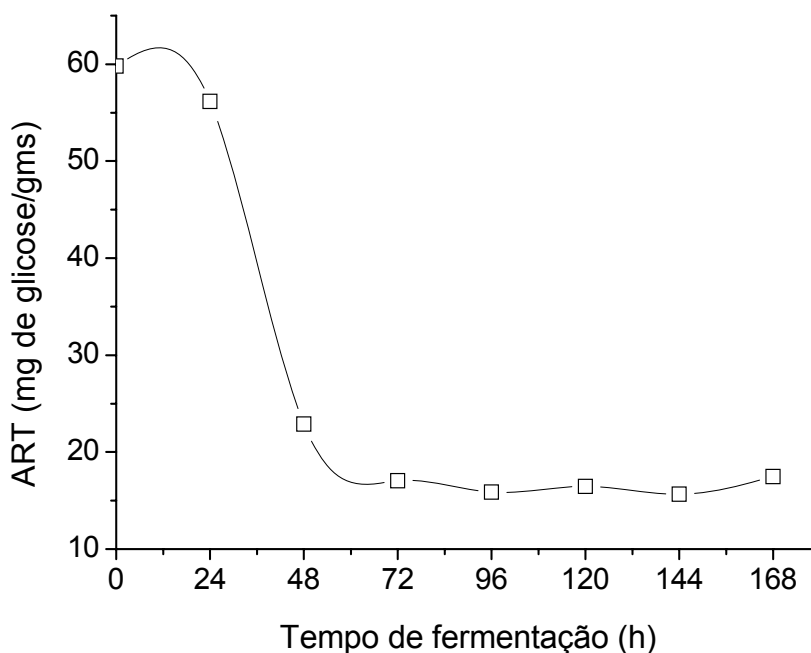


Figura 4.38. Perfil de ART para o farelo de soja convencional

A variação temporal de proteína é apresentada na figura 4.39, onde seu conteúdo pode evidenciar, de forma indireta, a produção de biomassa fúngica ao longo do processo de fermentação. Nota-se o perfil crescente da proteína entre 0 e 72h de fermentação. Após, ocorre uma variação em 120h.

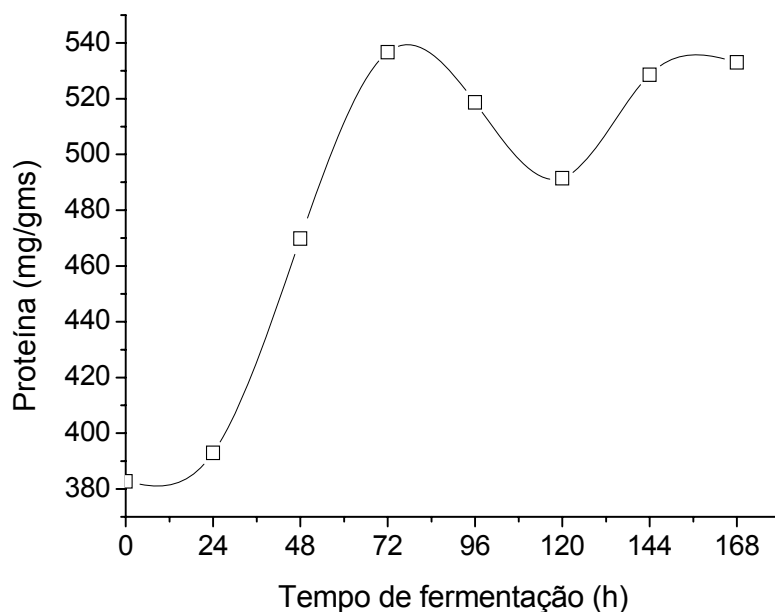


Figura 4.39. Perfil de proteína para o farelo de soja convencional

Na figura 4.40 são apresentadas as curvas para a AE e AE_{esp} da amilase, onde os maiores valores para ambos os casos foram observados em 72h de fermentação, com valor superior para a atividade específica (4,29 U/g de proteína). Comparativamente aos estudos realizados anteriormente, este valor é superior aos resultados obtidos para a mesma enzima com o fungo *Aspergillus niger*. Por outro lado, seu valor é inferior ao resultado obtido na FES com *Aspergillus clavatus*, utilizando o mesmo substrato, o que indica que este último pode ser o microrganismo mais adequado para produção da enzima em questão, dentro das condições ótimas pré-estabelecidas.

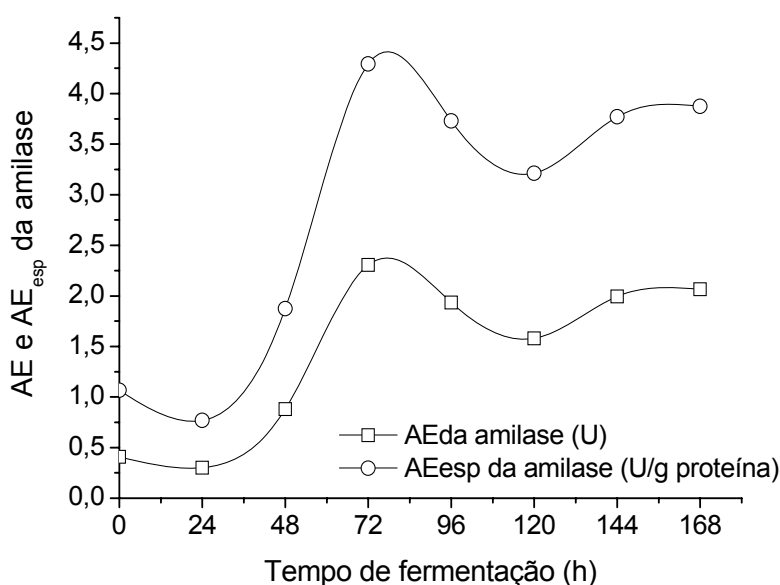


Figura 4.40. Perfis de AE e AE_{esp} da amilase para o farelo de soja convencional

No estudo comparativo dos perfis de α -amilase produzida em reator convencional de bandeja e em biorreator modificado, Bhanja *et al.* (2007) obtiveram máxima atividade enzimática de 19,665 U/g de substrato seco, com pH 6,0 a 32°C, após 54h de fermentação sólida por *Aspergillus oryzae*, utilizando farelo de trigo como substrato e 1% de fonte de N, utilizando o biorreator modificado. Observaram maior atividade para este equipamento, sendo que o reator convencional de bandejas apresentou atividade de 15,48 U/g de substrato, nas mesmas condições. Já Kammoun, Naili & Bejar (2008) obtiveram máxima atividade de α -amilase de 151,1 U/mL em meio de cultura otimizado com nutrientes e hidrolisados de soja e caseína, utilizando trigo moído como substrato, encontrando um aumento na atividade de 73,2%, em relação ao meio não otimizado. Nota-se, igualmente às fermentações realizadas anteriormente, que houve produção de amilase com utilização da soja como substrato. Porém, dentre todos os estudos realizados, o que apresentou melhor resultado foi o conduzido com o fungo *Aspergillus clavatus* em meio sem adição de fonte de nutrientes, sugerindo assim que a otimização do meio fermentativo com estas fontes não apresenta grande influência na produção da enzima.

Nos perfis de atividade da protease (figura 4.41), há um crescimento ao longo do processo fermentativo, onde os maiores valores de AE e AE_{esp} são observados após 144h de fermentação, sendo que a atividade específica apresentou o maior valor (25,92 U/g de proteína). Este comportamento foi semelhante em todos os estudos realizados neste trabalho, para a protease.

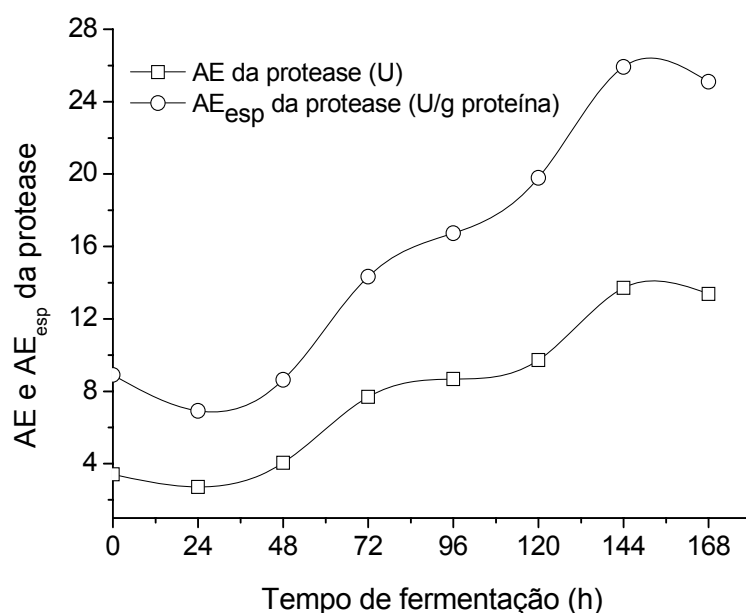


Figura 4.41. Perfis de AE e AE_{esp} da protease para o farelo de soja convencional

Na produção de amilase e protease por uma linhagem de *Aspergillus oryzae* mutante, Biesebeke *et al.* (2005) obtiveram máxima atividade proteásica de 61 U/g de substrato, utilizando trigo, em pH 5,5 após 6 dias de fermentação. Já Su *et al.* (2005) observaram máxima atividade de protease de 1150,0 U/g de substrato em molho de soja fermentado por *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, a 55°C, por um período de incubação de 48h. Apesar de apresentar resultados inferiores de AE (13,70 U) em relação aos resultados mencionados pelos autores, a produção de protease por *Aspergillus casingii* com farelo de soja convencional, 50% de umidade inicial e pH 6,7 apresentou-se satisfatória, bem como em todos os estudos realizados neste trabalho, em diferentes condições de fermentação, com diferentes tipos de microrganismos e substratos.

Na figura 4.42 são apresentados os perfis de atividades para a invertase. Os valores mais altos foram obtidos para 48h de fermentação (AE 6,48 U/mL e AE_{esp} 14,6 U/mL.g de proteína). Após, mantiveram um comportamento constante, com uma pequena oscilação em 120h. Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos na FES utilizando *Aspergillus clavatus* com o mesmo substrato, o que pode evidenciar características semelhantes para a produção da enzima pelos dois tipos de microrganismo.

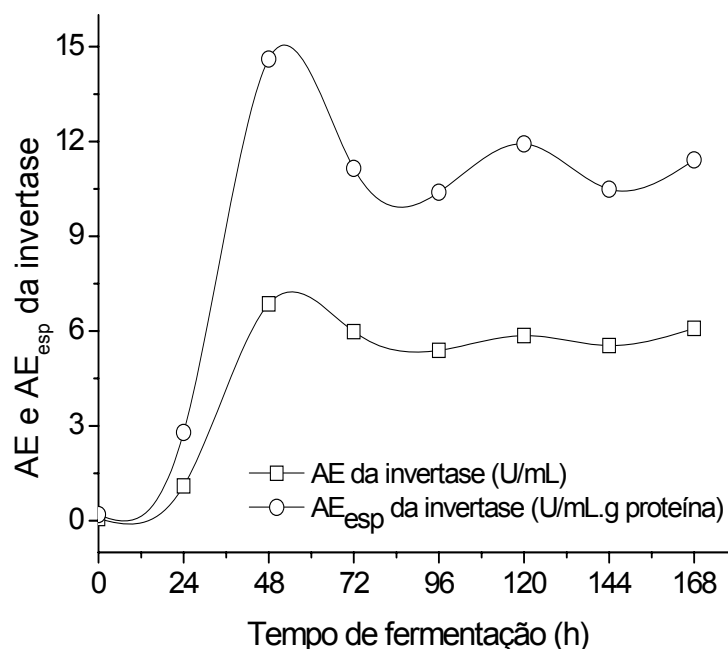


Figura 4.42. Perfis de AE e AE_{esp} da invertase para o farelo de soja convencional

Na produção de invertase por *Aspergillus niger* em processo em estado sólido, Romero-Gómez, Augur & Viniegra-González (2000) obtiveram máxima

produtividade de 125 U/L.h, a 30°C em meio contendo sacarose e nitrato de sódio, observando uma maior produtividade em comparação ao processo submerso (21 U/L.h). Vargas *et al.* (2004), avaliando efeitos de ultrassom na invertase de *Aspergillus niger* obtiveram uma atividade específica da enzima de, aproximadamente, 10 U/g de proteína, em meio contendo sacarose, peptona e melaço de cana, concluindo que o fungo utilizado apresenta grande potencial para produção desta enzima, em nível industrial. Desta maneira, os resultados que foram apresentados neste estudo para a obtenção de invertase indicam que a fermentação conduzida por *Aspergillus casingii* com farelo de soja convencional e fonte de N apresentam bons resultados, quando comparado ao resultado obtido por Vargas *et al.* (2004). Sendo assim, pode-se explorar o potencial da soja e seu resíduo na produção de invertase fúngica, onde espera-se obter quantidades significativas da enzima.

4.10. Comparação dos resultados obtidos

Foram realizadas comparações entre os valores obtidos na produção de enzimas neste trabalho e valores citados nas referências bibliográficas (tabelas 4.30 a 4.34).

Tabela 4.30. Comparativo de valores para a atividade da protease.

Referências	Microrganismo	Substrato	U (%)	pH	Atividade	Unidade
Coelho <i>et al.</i> (2007)	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de coco	7,0	-	1,56.10 ⁶	U.g ⁻¹ .h ⁻¹
Agrawal <i>et al.</i> (2004)	<i>Penicillium</i> sp.	Farelo de soja	-	7,3	8500	U/gmu
Li <i>et al.</i> (2008)	<i>Aspergillus niger</i>	Amido solúvel	-	4,0	30	U/ml
Basu <i>et al.</i> (2008)	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	-	7,0	2,776	μmol/mL.min
Neste trabalho	<i>Aspergillus niger</i>	Soja conv.	50,0	9,0	20,0	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus clavatus</i>	Soja conv.	50,0	6,0	13,51	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja	50,0	6,7	53,27	U

Tabela 4.31. Comparativo de valores para a atividade da lipase.

Referências	Microrganismo	Substrato	U (%)	pH	Atividade	Unidade
Vargas (2004)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de soja	55,0	8,0	15,6	U/g subs.
Pinheiro (2006)	<i>Penicillium verrucosum</i>	Farelo de soja	55,0	7,0	52,0	U/g subs.
Maldonado (2006)	<i>Geotrichum candidum</i>	Água maceração milho/óleo soja	-	7,0	24	U/mL
Sun & Xu (2008)	<i>Rhizopus chinensis</i>	Farinha/farelo de trigo	70,0	6,5	0,0244	U/g subs.
Neste trabalho	<i>Aspergillus niger</i>	Soja conv.	50,0	9,0	$6,4 \cdot 10^{-4}$	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus clavatus</i>	Soja conv.	50,0	6,0	$1,09 \cdot 10^{-5}$	U

Tabela 4.32. Comparativo de valores para a atividade da celulase

Referências	Microrganismo	Substrato	U (%)	pH	Atividade	Unidade
Camassola & Dillon (2007)	<i>Penicillium echinulatum</i>	Farinha de trigo/bagaço de cana	67,0	-	32,89	U/g subs.
Papinutti & Forchiassin (2007)	<i>Fomes sclerodermeus</i>	Farelo de trigo e soja	80,0		16,5	U/g subs.
Gao et al. (2008)	<i>Aspergillus terreus</i>	Milho	80,0	3,0	243	U/g subs.
Csiszar et al. (2007)	<i>Aspergillus orizae</i>	Resíduos e semente de algodão	83,0	5,0	44	U/g subs.
Neste trabalho	<i>Aspergillus niger</i>	Soja conv.	50,0	9,0	0,96	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus clavatus</i>	Soja conv.	50,0	6,0	0,05	U

Tabela 4.33. Comparativo de valores para a atividade da amilase.

Referências	Microrganismo	Substrato	U (%)	pH	Atividade	Unidade
Kunamneni <i>et al.</i> (2005)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Farelo de trigo	90,0	6,0	534	U/g subs.
Peixoto (2006)	Leveduras selvagens	Amido solúvel	-	5,5	10,41	U/mL
Spier (2005)	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de cana e mandioca	90,0	4,0	467,46	U/g de fécula
Guandalini (2007)	<i>Metharizium anisopliae</i>	Farelo e casca de arroz	60,0	5,5	136	U/g subs.
Neste trabalho	<i>Aspergillus niger</i>	Soja conv.	50,0	9,0	1,35	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus clavatus</i>	Soja conv.	50,0	6,0	6,17	U
Neste trabalho	<i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja	50,0	6,0	6,10	U

Tabela 4.34. Comparativo de valores para a atividade da invertase.

Referências	Microrganismo	Substrato	U (%)	pH	Atividade	Unidade
Montiel-González <i>et al.</i> (2004)	<i>Aspergillus niger</i>	Sacarose e nutrientes	0,99 (a _w)	-	48,91	U/mL
Shaheen <i>et al.</i> (2008)	<i>Fusarium sp.</i>	Farelo de trigo	40,0	4,0	47,2	U/g subs.
Goosen <i>et al.</i> (2007)	<i>Aspergillus niger</i>	Sacarose	-	5,0	4,5	μmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹
Neste trabalho	<i>Aspergillus clavatus</i>	Soja conv.	50,0	6,0	7	U/mL
Neste trabalho	<i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja	50,0	8,5	6,55	U/mL

Para a produção de protease, o melhor resultado obtido neste trabalho foi com o fungo *Aspergillus casingii*, onde o meio fermentativo que utilizou farelo soja convencional como substrato foi otimizado com adição de fonte de nutrientes e controle de pH (tabela 4.29). Porém, este resultado é inferior ao obtido por Agrawal *et al.* (2004), que utilizou *Penicillium sp.* e farelo de soja. Pode-se então afirmar que

a espécie *Aspergillus* não seja a mais indicada para a produção de grandes quantidades da enzima.

Na obtenção da lipase, o melhor resultado verificado neste trabalho foi com o fungo *Aspergillus niger*, com soja convencional bruta e 50% de umidade inicial do meio (tabela 4.30). Já os resultados obtidos por Vargas (2004), utilizando *Penicillium simplicissimum* e torta de soja com 55% de umidade, e Pinheiro (2006), utilizando *Penicillium verrucosum* e farelo de soja com 55% de umidade são superiores. Isto pode sugerir que a espécie *Aspergillus* não seja indicada para a produção de lipase com eficiência, na utilização da soja bruta como substrato, apresentando característica preferencial na produção de enzimas amilolíticas e proteolíticas.

O melhor resultado obtido neste trabalho para a produção de celulase foi observado com o fungo *Aspergillus niger*, utilizando soja convencional bruta e 50% de umidade inicial do meio e tamanho de partícula de 0,6 mm. Em comparação aos resultados mencionados pelos autores (tabela 4.31), este trabalho obteve resultados inferiores, o que pode indicar que a utilização de partículas de substrato com maior tamanho seja mais adequada para a produção da enzima, visto que a maior quantidade de material celulósico encontra-se nas camadas mais externas e na casca do grão (soja).

Na obtenção da amilase, o melhor resultado obtido neste trabalho foi com o fungo *Aspergillus clavatus* utilizando soja convencional bruta como substrato, 50% de umidade inicial e pH 6,0. Este resultado é semelhante ao resultado observado com *Aspergillus casingii*, utilizando farelo de soja convencional com adição de nutriente, 50% de umidade e pH 6,0 (tabela 4.32). Portanto, a otimização do meio com nutrientes não apresentou influência significativa na produção da enzima. Comparativamente aos autores, Kunamneni *et al.* (2005), Spier (2005) e Guandalini (2007) obtiveram resultados superiores aos deste trabalho, utilizando diferentes microrganismos e substratos. Desta forma, a fermentação utilizando *Aspergillus* e soja bruta e seu resíduo como substrato, apesar de ter se mostrado viável, pode não ser o melhor processo para a obtenção de maiores quantidades de amilase.

Na produção de invertase, observou-se o melhor resultado para a fermentação com *Aspergillus clavatus* utilizando soja convencional bruta como substrato, porém, com valores muito próximos aos obtidos com *Aspergillus casingii* utilizando farelo de soja convencional e adição de nutrientes (tabela 4.33), o que indica que a fonte extra de nitrogênio adicionada ao meio fermentativo não

apresenta influência significativa na produção da enzima. Ao comparar estes resultados ao obtido por Montiel-González *et al.* (2004), que utilizou *Aspergillus niger* e meio fermentativo otimizado com sacarose, pode-se perceber que uma maior produção da invertase utilizando soja e seu resíduo como substrato poderia ser alcançada com uma otimização do meio com diferentes fontes de nutrientes, em relação às utilizadas neste trabalho.

Os melhores resultados neste trabalho foram obtidos para a protease, amilase e invertase. Desta forma, para as demais enzimas avaliadas, a utilização da soja como substrato por FES não apresentou resultados relevantes, caracterizando-se, assim, como um meio não propício para a produção de celulase e lipase. Isto pode ser explicado pelo fato de a soja apresentar altos teores de carboidratos e proteínas, que servem como fonte nutricional ao microrganismo para produção das enzimas protease, amilase e invertase.

5. CONCLUSÕES

- A partir das curvas de crescimento para o fungo *Aspergillus niger*, pode-se observar uma dificuldade em estabelecer um padrão de comportamento cinético para os diferentes tipos de sojas (orgânica, transgênica e convencional) para a produção da enzima lipase, sugerindo uma eventual diferença nas rotas metabólicas seguidas pelo fungo, em função do tipo de soja usado.
- Os baixos valores de atividade lipásica podem evidenciar a preferência do fungo em produzir enzimas amilolíticas e proteolíticas. Pode-se supor também que o fungo da espécie *Aspergillus niger* não apresenta características favoráveis à produção de enzimas lipolíticas.
- Para a enzima amilase, observou-se um melhor rendimento nas curvas de crescimento do *Aspergillus niger* da soja convencional após 96h de fermentação.
- Com relação à protease, que foi objeto de estudo para a otimização dos parâmetros do processo fermentativo, o melhor substrato foi a soja convencional com 144h de fermentação.
- Na avaliação dos parâmetros operacionais da FES, realizada por um planejamento completo 2^3 , a umidade ideal foi de 50% e o valor de C_0 obtido foi de 4.10^6 esporos/gms.
- No estudo do tamanho de partícula do substrato e pH do meio fermentativo, por planejamento experimental DCCR, ambas as variáveis não apresentaram influência significativa. Entretanto, a magnitude dos resultados obtidos conduziu a seqüência do estudo no sentido de uma melhor produção de protease em pH ácido, com diâmetro de partícula do substrato de 0,6 mm (este último confirmado pela melhor produtividade de protease obtida nas curvas de crescimento do fungo *Aspergillus niger*).
- Já na avaliação da produção de protease em diferentes pH's, obteve-se a melhor produtividade da enzima em meio alcalino (pH 9,0), apresentando uma AE_{esp} de 34,4 U/g de proteína.
- Verificou-se também, a produtividade das enzimas lipase, amilase e celulase, nas condições ótimas de produção da protease. Todas as enzimas avaliadas apresentaram maiores produtividades em pH alcalino (9,0).
- Na FES para as curvas de crescimento com o fungo *Aspergillus clavatus*, a protease obtida a partir da soja bruta e dos parâmetros operacionais otimizados nos

experimentos anteriores, apresentou maior rendimento, comparado à fermentação com o fungo *Aspergillus niger*, 37,6 U/g de proteína.

- Este fungo também apresentou bons níveis de produção de amilase e invertase, caracterizando assim a FES com soja como um processo interessante para a obtenção destas enzimas.
- Já a lipase e celulase apresentaram valores de atividade baixos. Desta forma, pode-se dizer que a soja não foi o substrato adequado para a produção destas enzimas.
- Nos estudos conduzidos com o fungo *Aspergillus casingii*, onde foi utilizado farelo de soja convencional como substrato e fonte de nutrientes para a otimização do meio fermentativo, as enzimas invertase e amilase apresentaram resultados semelhantes àqueles obtidos com *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus niger*. Entretanto, com a utilização de 2% de fonte de carbono e nitrogênio e 2% de fonte minerais, a atividade enzimática específica da protease foi a mais elevada observada em todo o trabalho (104,06 U/g de proteína).

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os seguintes itens são sugeridos visando a complementação deste trabalho:

- Estudo da otimização do processo de extração das enzimas do sólido fermentado;
- Estudo de seleção de outros tipos de microrganismos para produção de cada uma das enzimas avaliadas;
- Estudo da otimização de novas fontes de nutrientes para produção de maior quantidade das enzimas;
- Avaliar o pH durante a fermentação para explicar a maior produção das enzimas em pH 9,0.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.L. **Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação.** B.CEPPA, v.19, n.1, p.119-138, 2001.
- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. **Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar.** B.CEPPA, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BARNEJEE, T.; PATIL, S. **Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis.** Process Biochemistry, v.39, p.977-981, 2004.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.B.; PATEL.; K.C. **Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate.** Bioresource Technology, v.97, p.1161-1166, 2006.
- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis.** 12^a ed., Washington D.C., 1984.
- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis.** 16^a ed., Washington D.C., 1995.
- AZEREDO, L.A.I.; GOMES, P.M.; JR, G.L.S.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations.** Current Microbiology, v.54, p.361-365, 2007.
- AZEVEDO, L.; ALEZANDRO, M.R.; VIEIRA, E.P.; MAIA, P.P.; CARVALHO, H.A.; ALMEIDA, S.A.. **Soja transgênica BRS 243 RR: determinação de acronutrientes e das isoflavonas da idzeína e genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).** Ciência e tecnologia de alimentos, v.28, n.3, p.1-7, 2008.

- BALASUBRAMANIAM, A.K.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. **Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.37, p.331-338, 2001.
- BALSAN, A.A.T. **Produção de protease fúngica por fermentação em estado sólido: avaliação das condições operacionais por meio de planejamento fatorial.** Toledo: Curso de Especialização em Genética e suas aplicações Biotecnológicas (monografia), Universidade Paranaense, 2004.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., MEJÍA, A. **Production of secondary metabolites by solid-state fermentation.** Biotechnol. Annu. Ver., n. 2, p. 85-121, 1996.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Campinas: Editora UNICAMP, 2007. 473 p.
- BASU, B.R.; BANIK, A.K.; DAS, M. **Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB₁₀₀ grown on fish scale.** World Journal of Microbiology Biotechnology, v.24, p.449-455, 2008.
- BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; PASQUALI, G.D.L. **Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effects of maltose or starch addition.** Journal of Microbiology Biotechnology, v.11, n.1, p.13-16, 2001.
- BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybean.** Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel, 1992, 153p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2 ed. New York: Plenum Press, p.445, 1994.
- BHANJA, T.; ROUT, S.; BARNEJEE, R.; BHATTACHARYYA, B.C. **Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor.** Bioprocess Biosyst. Eng., v. 30, p.369-376, 2007.

- BIESEBEKE, R.; RECORD, E.; BIEZEN, N.; HEERIKHUISEN, M.; FRANKEN, A.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J. **Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v.69, p.44-50, 2005.
- BUSCHLE-DILLER, G. **Tratamento enzimático das fibras protéicas.** Tecnologia das fibras. Química têxtil, n.71, p.44-50, 2003. Disponível em <http://www.abqct.com.br/revistas/pdf/qt_71.pdf#page=30> Consultado em 12 out. 2008.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. **Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation.** Journal of Applied Microbiology, v.103, p.2196-2204, 2007.
- CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; JR, G.L.S. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** Biochemical Engineering Journal, v.4, p.239-247, 2000.
- CAVALCANTI, E.A.C.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA Jr. **Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.48, p. 79-84, 2005.
- CHAUHAN, B.; GUPTA, R. **Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14.** Process Biochemistry, v.39, p.2115-2122, 2003.
- CHELLAPPAN, S.; JASMIN, C.; BASHEER, S.M.; ELYAS, K.K.; BHAT, S.G., CHANDRASEKARAN, M. **Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.41, p.956-961, 2006.

- CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. **Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase.** Ciênc. Agrotec., Lavras, v. 30, n. 5, p.920-929, 2006.
- COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.P.L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da csca de coco verde.** B.CEPPA, v. 19, n. 1, p. 3342, 2001.
- CORDEIRO, C.A.M.; MARTINS, M.L.L.; LUCIANO, A.B. **Produção e propriedades de α -amilase de *Bacillus* sp. termofílico.** Brazilian Journal of Microbiology, v.33, p.57-61, 2002.
- COSTA, A.J.D.; ALMEIDA, M.J.M. **O complexo agroindustrial paranaense: soja transgênica versus soja convencional.** Curitiba. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico, 2007. Disponível em: <http://www.ecopar.ufpr.br/artigos/a4_031.pdf> Consultado em: 20 ago 2008.
- CSISZAR, E.; SZAKACS, G.; KOCZKA, B. **Biopreparation of cotton fabric with enzymes produced by solid-state fermentation.** Enzyme and Microbial Technology, v.40, p.765-1771, 2007.
- DEUTSCHER, M.P.; SIMON, M.I.; ABELSON, J.N. **Guide to protein purification.** Ed. Academic Press, Inc., Cap. IV: Buffers: Principles and Practice. STOLL, V.S.; BLANCHARD, J.S., 1990, 24-38p.
- DUNAEVSKII, Y.E.; MATVEEVA, A.R.; FATKHULLINA, G.N.; BELYAKOVA, G.A.; KOLOMIETS, T.M.; KOVALENKO, E.D.; BELOZERSKY, E.A. **Extracellular proteases of mycelial fungi as participants of pathogenic process.** Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v. 34, n.3, p. 286-289, 2008.
- DURAND, A. **Bioreactor designs for solid state fermentation.** Biochem. Eng. J., v.13, p.113-125, 2003.

- FAROOQUI, A.A.; TAYLOR, W.A.; HORROCS, L.A.. **Phospholipases, lysophospholipases and lipases and their involvement in various diseases.** Neurochemical Pathology, v.7, p.99-128, 1987.
- FERANANDES, M.L.M. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Curitiba: Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/10745>> Consultado em 12 ago. 2008.
- FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; RAMACAHNDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*.** Biochemical Engineering Journal, v.15, p.107-115, 2003.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos: microrganismos importantes em microbiologia de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1993, 31-34p.
- FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA, G.L. Jr. **Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*.** Rev. Microbiol. (Jour. Braz. Soc. Microbiol.), v.28, p.6-12, 1997.
- FREIRE, D.M.G.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA, G.L. Jr. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in a laboratory-scale fermentor: media composition, agitation and aeration.** Appl. Biochem. Biotechnol, v.63, p.409-421, 1997.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. **Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover.** Bioresource Technology, v.99, p.7623–7629, 2008.

- GÁRCIA-GÓMEZ, M.J.; HUERTA-OCHOA, S.; LOERA-CORRAL, O.; PRADO-BARRAGÁN, L.A. **Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation.** Food Chemistry, v.112, p.604-608, 2008.
- GERBER, L.F.P.; Penz JÚNIOR, A.M.P.; RIBEIRO, A.M.L. **Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte.** Revista Brasileira de zootecnia, v.35, n.4, p.1359-1365, 2006.
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N.; SOCCOL, C.R. **Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation.** Enzyme and Microbial Technology, n.32, p.246-251, 2003.
- GOMBERT, A.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate.** Process Biochemistry, v.35, p.85–90, 1999.
- GOOSEN, C.; YUAN, X.L.; MUNSTER, J.M.; RAM, A.F.J.; MAAREL, M.J.E.C.; DIJKHUIZEN, L. **Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with tansfructosylating activity.** Eukaryotic cell, v.6, n.4,p.674-681, 2007.
- GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=383> Consultado em 03 ago. 2008.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. **Microbial α -amylases: a biotechnological perspective.** Process Biochemistry, v.38, p. 1599-1616, 2003.

- GUTARRA, M.L.E. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo.** Rio de Janeiro: Ciência dos Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003. Dissertação (Mestrado).
- HAN, B-Z.; MA, Y.; ROMBOUTS, F.M.; NOUT, M.J.R. **Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* during sufu pehtze preparation.** Food Chemistry, v.81, p.27-34, 2003.
- HASAN, S.D.M. **Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz.** Rio Grande: Engenharia de Alimentos, Universidade Rio Grande, 1998. Dissertação (Mestrado).
- HASAN, S.D.M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).
- HECK, J.X.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. **Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation.** Brazilian Journal of Microbiology, v.33, p.213-218, 2002.
- IKASARI, L.; MITCHELL, D.A. **Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation.** Enzyme and Microbial Technology, v.19, p.171-175, 1996.
- ISIK S.; ALKAN S.; TOPPARE L.; CIANGA I.; YAGCI Y. **Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly-2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices.** European Polymer Journal. v. 39, p. 2375-2381, 2003.

- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. **Lipases for biotechnology**. Curr. Opin. Biotechnol, v.13, p.390-397, 2002.
- KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. **Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product)**. Bioresource Technology, v.99, p.5602-5609, 2008.
- KEMPKA, A.P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T.L.F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.M. G.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, D. **Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation**. Bioprocess Biosyst. Eng., n.31, p.119-125, 2008.
- KRISHNA, C. **Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes**. Bioresource Technology, v.69, p.231-239, 1999.
- KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. **Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus***. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.100, n.2, p.168-171, 2005.
- LERAYER, A.L.S. **Biotecnologia na indústria de alimentos**. Conselho de informações sobre biotecnologia, 1993. Disponível em <<http://www.cib.org.br/apresentação.php>> Consultado em 3 set. 2008.
- L'HOCINE, L.; WANG, W.; JIANG, B.; XU, S. **Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023**. Journal of Biotechnology, v.81, p.73-84, 2000.
- LI, Q.; HARVEY, L.M.; McNEIL, B. **The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.78, p.333-341, 2008.

- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial – vol.3**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT. M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. **Scale-up strategies for solid state fermentation system**. Process Biochemistry, v.27, p.259-273, 1992.
- MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em <http://www.ppgbiotec.ufpr.br/teses_dissertacoes/realizadas.html> Consultado em 4 nov.2007.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation**. Process Biochemistry, v.38, p.715-721, 2002.
- MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. **Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate**. Bioresource Technology, v.99, p.1729-1735, 2008.
- MALDONADO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=284> Consultado em 12 ago. 2008.
- MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. **Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry**. Bioresource Technology, v.99, p.2373-2383, 2008.

- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. **Measurement of saccharifying cellulose**. Biotechnol. Bioeng. Symp., v.6, p.21-34, 1976.
- MENEZES, G.D.G.; OLIVEIRA, A.C.P.; DAMASO, M.C.T. OLIVEIRA, M.A.C.L.; COURI, S. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo**. Rev. Univ. Rural, n.1, p.15-27, 2006.
- MERHEB, C.W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. **Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein**. Food Chemistry, v.104, p.127-131, 2007.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars**. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MONTIEL-GONZÁLEZ, A.M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FERNÁNDEZ, F.J.; LOERA, O. **Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger***. Process Biochemistry, v.39, p.2085-2090, 2004.
- MORAES, A.A.C., SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. São Paulo: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996, 14-19p.
- NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. **Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, n.3, v.26, p.582-588, 2006.
- PANDEY, A. **Aspects of fermenter design for solid state fermentations**. Process Biochemistry, v.26, p.335-361, 1991.
- PANDEY, A. **Recent process developments in solid-state fermentation**. Process Biochemistry, v.27, p.109-117, 1992.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products.** Process Biochemistry, v.35, p.1153-1169, 2000.

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

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. **Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation.** Journal of Food Engineering , v.81, p.54–59, 2007.

PARAZZI Jr., O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-07122006-153034/>>. Consultado em 04 nov. 2008.

PEIXOTO, A.B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=269> Consultado em 10 ago. 2008.

PINHEIRO, T.L.F. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo.** Erechim: Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.uricer.edu.br/eal_hp/DissertPDF/Turma2004/DissertThaisFontoura2006.pdf> Consultado em 17 ago. 2008.

- PRAKASHAM, R.S.; RAO, C.S.; SARMA, P.N. **Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation.** Bioresource Technology, v.97, p.1449–1454, 2006.
- RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** Electronic Journal of Biotechnology, n.3, v.1, 1998.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. ; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., p. 597-635, 1998.
- RIEGER, C.; OLIVEIRA, V.; LOVATTO, P.A.; ARAÚJO, J.S.; PEIXOTO, E.C.T.M.; SILVA, M.A. **Características químicas e valores energéticos de farelos de soja do oeste e sudoeste do Paraná.** Ciência Rural, v.38, n.1, p.266-269, 2008.
- RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em <http://www.ppgbiotec.ufpr.br/teses_dissertacoes/realizadas.html> Consultado em 4 nov.2007.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005, 326p.
- RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, J.; BHANGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. **Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.41, p.2264–2269, 2006.
- ROMERO-GÓMEZ, S.J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation.** Biotechnology Letters, v.22, p.1255-1258, 2000.

- RUBIO, M.C.; NAVARRO, A.R. **Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger***. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.601-606, 2006.
- RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil**. Revista Brasil. Bot., v.27, n.2, p.205-211, 2004.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation**. Process Biochemistry, v.40, p.2689–2694, 2005.
- SANTOS, L.F. **Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans*** 191. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Tese (Doutorado). Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=271> Consultado em 18 ago. 2008.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K.; KRISHNALAH, M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. **Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system**. Process Biochemistry, v.27, p.97-107, 1992.
- SCHEUER, P.J. **Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential**. Science, v.248, p.173-177, 1990.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial – vol.2**. São Paulo. Edgard Blücher LTDA, 2001.
- SHAHEEN, I.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, T. **Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under**

- solid-state fermentation.** International Journal of Food Science and Technology, v.43, p.1152–1158, 2008.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnol. Adv., v.19, p.627-662, 2001.
- SHU, Z.Y.; YANG, J.K.; YAN, Y.J. **Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044.** Chinese Journal of Biotechnology, v.23, p.96-100, 2007.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos.** Editora UFV, Viçosa, 2002.
- SILVA, L.B.C. **Identificação da lipoxigenases em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de diferentes linhagens.** Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php> Consultado em 01 ago.2008.
- SOCCOL, CR.; VANDENBERGHE, L.P.S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil.** Biochemical Engineering Journal, n.13, p.205–218, 2003.
- SOYA HANDBOOK, Centre Expertise Soya, Tetra Pak, 2003.
- SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido.** Curitiba: Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado). Disponível: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4684/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20de%20Mestrado%20Michele%20Rigon%20Spier.pdf>> Consultado em 27 jul. 2008.

- STENZEL, M. **Solubilização enzimática de proteína do farelo de soja e caracterização funcional dos hidrolisados formados.** Maringá: Engenharia Química, 2007. Tese (Doutorado).
- SU, N.W.; WANG, M.L.; KWOK, K.F.; LEE, M.H. **Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji.** J. Agric. Food Chem., v.53, p.1521-1525, 2005.
- SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.49, n.5, p.843-851, 2006.
- SUN, S.Y.; XU, Y. **Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme.** Process Biochemistry, v.43, p.219–224, 2008.
- TANYILDIZI, M.S.; ÖZER, D.; ELIBOL, M. **Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology.** Process Biochemistry, v.40, p.2291–2296, 2005.
- THYS, R.C.S.; GUZZON, S.O.; OLIVEIRA, F.C.; BRABDELLI, A. **Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology.** Process Biochemistry, v.41, p.67-73, 2006.
- TREMACOLDI, C.R.; WATANABE, N.K.; CARMONA, E.C. **Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.20, p.639-642, 2004.
- TREMACOLDI, C.R.; MONTI, R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; CARMONA, E.C. **Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.23, p.295–299, 2007.

- UYAR, F.; BAYSAL, Z. **Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.39, p.1893-1898, 2003.
- VARGAS, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato.** Erechim: Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2004. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.uricer.edu.br/eal_hp/DissertPDF/Turma2002/DissertGeanVargas.pdf> Consultado em 19 jul. 2008.
- VARGAS, L.H.M.; PIÃO, A.C.S.; DOMINGOS, R.N.; CARMONA, E.C. **Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.20, p.137-142, 2004.
- VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. **Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana.** Pesq. Agropec. Bras, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMES, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system.** Biochem. Eng. J., v.13, p.157-167, 2003.
- WANG, R.; LAW, R.C.S.; WEBB, C. **Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation.** Process Biochemistry, n.40, p.217-227, 2005.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**, 2^a ed, New York: Marcel Dekker, 1994. 387-389p.

- WINETR, H.; HUBER, S.C. **Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes.** Critical Reviews in Plant Sciences, v.19, p.31-67, 2000.
- WOOLEY, P., PETERSON, S.B. **Lipases: their structure, biochemistry and applications.** Biochemistry and Application, cap. 12, Cambridge University Press, 1994.
- WU, T.Y.; MOHAMMAD, A.W.; JAHIM, J.Md.; ANUAR, N. **Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate.** Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.1223–1229, 2006.
- ZANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. **Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies.** Biotechnology Advances, v.24, p.452-481, 2006.