



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

ADRIANA CRISPIM DE FREITAS

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO TORTA DE CANOLA

**FORTALEZA
2009**

ADRIANA CRISPIM DE FREITAS

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO TORTA DE CANOLA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

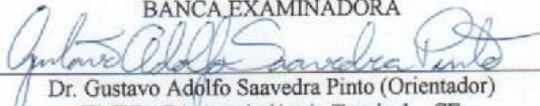
**FORTALEZA
2009**

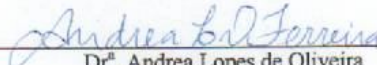
ADRIANA CRISPIM DE FREITAS

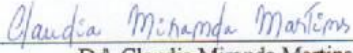
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

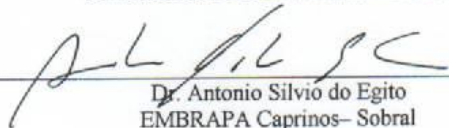
Aprovada em: 19 / 07 / 2009.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)
EMBRAPA Agroindústria Tropical – CE


Dr.ª Andrea Lopes de Oliveira
Universidade Federal do Ceará – DEQ/UFC


Dr.ª Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará – DB/UFC


Dr. Antonio Silvio do Egito
EMBRAPA Caprinos – Sobral

F936p Freitas, Adriana Crispim de
Produção de proteases por *aspergillus* em fermentação semi-sólida
utilizando torta de canola / Adriana Crispim de Freitas, 2009.
84 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e
Bioquímicos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2009.

1. *Aspergillus oryzae* 2. Inóculo 3. Temperatura de incubação. I. Pinto,
Gustavo Adolfo Saavedra (orient.). II. Universidade Federal do Ceará –
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título

CDD 660

. Título

*À Deus,
À minha família,
Aos meus amigos,
Ao meu orientador.*

AGRADECIMENTOS

...À Deus por guiar-me cada dia da minha vida.

...Ao meu orientador, Gustavo, pela oportunidade, pela orientação da graduação ao mestrado, por partilhar seus conhecimentos, pelo apoio, amizade, críticas, incentivo, mas principalmente, pelos seus ensinamentos e exemplo de um grande mestre.

...À minha irmã, Ana Maria, pela dedicação e incentivo desde a minha infância.

...Ao meu cunhado e padrinho, José, pelo apoio e incentivo.

...Aos meus pais. Presentes de Deus na minha vida.

...Aos meus irmãos, Ana Maria, Manuel, Mauricélia, Socorro Maria e Eliane, pelo amor e compreensão.

...A João e Mariete, pelo carinho, atenção e apoio.

...As amigas Flaubênia, Ticiane, Florença e Renata, sempre presentes para me dar uma força.

...Ao Sr. Lairton e a Sra. Socorro pela acolhida familiar, atenção e compreensão.

...Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos: Andrea, Alaís, Cyntia, Genilton, Leíse, Janaína, Manuella, Monique, Myrella, Natália Lima, Natália de Freitas, Virna, Renata Débora, Rosa e Ruann, pelos bons momentos.

...A todos os colegas da Universidade Federal do Ceará. Em especial, a turma do mestrado.

...A Tigressa e Jocélia, pela paciência, dedicação e pelos momentos bons de muito estudo.

...Ao Manoel Alves, por ser exemplo de dedicação e amizade a ser seguido.

...As amigas do laboratório de microbiologia, Ana Paula, Ana Karine, Natália e Cristiane.

...Ao Sr. Vantuir Scarant, Celena alimentos, pelo empenho nas coletas e envio da torta de canola, que foram fundamentais para realização deste trabalho.

... À Maria, da Secretaria do PPGEQ, pelo atendimento sempre correto e atencioso.

...A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realizar graduação e mestrado.

...A todos os professores do Departamento de Engenharia Química pelo convívio e ensinamentos.

...Aos professores que participaram da banca de qualificação deste trabalho, Sueli e Andrea, obrigada pelas correções de dicas que valorizaram este trabalho.

...A banca examinadora para a aprovação deste trabalho, as professoras Andrea e Claudia, e ao pesquisador Antonio Silvio, obrigada pela dedicação e atenção nas correções e pelas observações que engrandeceram este trabalho.

....A Embrapa Agroindústria Tropical, pela oportunidade de estagiar e realizar a parte prática da dissertação no laboratório de Bioprocessos.

*“Na hora das incertezas e das derrotas,
que as nossas utopias não sejam um refúgio,
mas a alavanca para ousar palmilhar o chão do amanhã”*

Jean Pierre Leroy

RESUMO

As proteases fazem parte da classe de enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas, modificando os substratos com grande seletividade e especificidade. A fermentação semi-sólida é um processo fermentativo no qual o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre, geralmente utilizando matéria-prima natural como fonte de carbono e energia. Realizou-se neste estudo o cultivo semi-sólido de fungos filamentosos, visando à produção de proteases utilizando como substrato a torta de canola. Avaliando-se, em um primeiro estudo, o potencial de diferentes linhagens de *Aspergillus* para a produção de proteases. As linhagens estudadas foram *Aspergillus niger* (CNPAT 001, IOC 207, IOC 4222, IOC 4220 e IOC 3883) e *Aspergillus oryzae* IV. A melhor linhagem obtida para a produção de protease foi a linhagem de *Aspergillus oryzae* IV. Em seguida, estudou-se a influência da adição de diferentes volumes de água a torta, onde a melhor produção foi obtida nos meios com proporção 40 mL de água para 100 g de torta. Determinada a melhor umidade do meio, avaliou-se a temperatura de incubação, os melhores resultados obtidos foram em meios incubados a 20°C. Na sequência, foram feitos estudos para determinação da melhor concentração de inóculo, as concentrações testadas foram 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 esporos por grama de meio, sendo 1×10^7 a melhor concentração analisada. Avaliou-se a influência da suplementação do meio fermentativo com fontes de fósforo, carbono e nitrogênio. A suplementação da torta de canola, com 1% (m/m) de fosfato de sódio monobásico não influenciou positivamente na produção de proteases. A suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio foram estudadas na proporção de 1,0 % (m/m) em relação ao peso do substrato, sendo o extrato de levedura a melhor fonte avaliada, apresentando maior produção de proteases. Em seguida, testou-se o período de incubação do meio sem suplementação de nutrientes, entre 0 e 240 horas de fermentação com amostras sendo retiradas a cada 24 h de processo fermentativo. A maior produção ocorreu em 96 h com produção de 336 U.g⁻¹ de proteases. Após esta etapa, avaliou-se a suplementação do meio com diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações, 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 15,0 % (m/m) em relação ao peso do substrato, a maior produção de proteases ocorreu no meio com adição de glicose na concentração de 7,5 % obtendo 452 U.g⁻¹. Na última etapa, fez-se a caracterização do meio ao longo do processo fermentativo, através de determinações analíticas de ordem químicas e físico-químicas. A maior produção de proteases obtida foi de 452 U.g⁻¹ em 96 horas de processo fermentativo, nos meios suplementados com 7,5 % de glicose, nas seguintes condições fermentativas: temperatura de incubação do meio a 20°C, torta umedecida com 40 mL de água por 100 g de substrato e concentração de inóculo de 1×10^7 esporos.g⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus oryzae*, inóculo, temperatura de incubação.

ABSTRACT

The proteases belong to the class of enzymes with the capacity to hydrolyze peptidic connections into protein and protein fragments, modifying the substrate by great selectivity and specification. The semi-solid fermentation is a fermentation process in which the growth of microorganisms and the formation of the products occur on the surface of the solid substrate next to the absence of free water, usually using natural raw materials as a source of carbon and energy. On this study, it was done the semi solid cultivation of filament fungi, in order to produce proteases using as a substrate a cake of canola. It was evaluated, in a first study, the potential of different strains of *Aspergillus* for the production of proteases. The strains studied were *Aspergillus niger* (CNPAT 001, IOC 207, IOC 4222, IOC 4220 and IOC 3883) and *Aspergillus oryzae* IV. The best strain obtained for the production of protease was a strain of *Aspergillus oryzae* IV. Later on, it was studied the influence of the different quantities of water and coke canola added; the best production was obtained in proportion with 40 mL of water to 100 g of cake. After determination to medium of moisture, was evaluated the temperature of incubation, the best results were obtained in media incubated at 20° C. Further, studies were done to determine the best concentration of inoculum, the concentrations tested were 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 and 1×10^7 spores per gram of medium, being 1×10^7 to better concentration analyzed. The influence of supplementation of fermentation medium with sources of phosphorus, carbon and nitrogen was evaluated. Supplementation of the cake of canola, with 1% (w/w) monobasic sodium phosphate did not influence positively the production of proteases. Supplementation of medium with different sources of nitrogen were studied in the proportion of 1.0% (w/w) in the weight of the substrate, being the yeast extract of the best source evaluated, showing increased production of proteases. Then, it was tested the incubation period of the medium without supplementation of nutrients, between 0 and 240 hours of fermentation with samples being removed every 24 h of fermentation process. The highest production occurred at 96 h with production of 336 U.g⁻¹ protease. After this stage, was evaluated the supplementation of medium with different carbon sources at different concentrations, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12, 5 15.0 % (w/w) in the weight of the substrate; the increased production of proteases occurred in the medium with the addition of glucose at a concentration of 7.5 % obtaining 452 U.g⁻¹. In the last stage, was performed the characterization of the medium during the fermentation process by of a chemical and physicochemical analytical determinations. The increased production of proteases obtained was 452 U.g⁻¹ in 96 hours of fermentation process, in media supplemented with 7.5 % glucose, at the fermentation conditions: temperature of incubation of the medium at 20° C, damp cake with 40 mL water per 100 g of substrate and concentration of inoculum of 1×10^7 spores.g⁻¹.

Key-words: *Aspergillus oryzae*, inoculum, temperature of incubation.

LISTA DE FIGURAS

1.	Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos	22
2.	Ilustração de preparo da suspensão de esporos	33
3.	Atividade de proteases em diferentes linhagens de <i>Aspergillus</i>	42
4.	Relação da umidade e A_w , antes e após a esterilização meio	44
5.	Adição de diferentes volumes de água a torta	45
6.	Produtividade das fermentações com diferentes volumes de água	46
7.	Atividade de protease em meios com volumes de água abaixo de 50 mL	47
8.	Produtividade em meios com volumes de água abaixo de 50 mL	48
9.	Produção de protease nos meios com diferentes temperaturas	49
10.	Atividade de protease em diferentes taxas de inoculação.	50
11.	Produção de protease nos meios com adição de fósforo	52
12.	Produção de protease nos meios com adição de nitrogênio	54
13.	Produção de protease testando o período de incubação	55
14.	Produção de protease com adição de fontes de carbono	57
15.	Imagem dos meios inoculados ao longo do processo fermentativo	58

LISTA DE TABELAS

1. Aplicações industriais de algumas enzimas	9
2. Aplicações da FSS em diferentes setores econômicos	15
3. Utilização de diferentes grupos de microrganismos em FSS	20
4. Linhagem dos fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	29
5. Formulação do meio para reativação dos microrganismos	30
6. Preparo de soluções para o meio de sabugo de milho	31
7. Fontes de nitrogênio avaliadas	33
8. Caracterização química da torta de canola	42
9. Influência da adição de fosfato na produtividade de protease	53
10. Caracterização do meio durante o processo fermentativo	59

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 Revisão Bibliográfica	19
3.1 Enzimas	20
3.2 Proteases	22
3.2.1 Classificação das Proteases	22
3.2.2 Fontes das Proteases	23
3.2.3 Aplicação das Proteases	24
3.3 Fermentação Semi-sólida	24
3.3.1 Definição e Breve Histórico	24
3.3.2 Principais características	25
3.3.3 Aplicações da FSS	26
3.3.4 Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida	28
3.4 Substrato	30
3.5 Microrganismo	32
3.5.1 Fungos Filamentosos	34
3.6 Torta de canola	36
3.7 Produção de proteases por FSS empregando fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	38
4 Metodologia Experimental	40
4.1 Matéria-Prima	41
4.2 Microrganismos	41
4.3 Obtenção do Inóculo para Fermentação Semi-Sólida	44
4.4 Meio de Fermentação Semi-Sólida	44

4.5 Seleção de Linhagem para a Síntese de Protease	45
4.6 Parâmetros Fermentativos Avaliados	46
4.6.1 Influência da adição de água ao substrato	46
4.6.3 Influência da quantidade do inóculo	46
4.6.4 Influência da suplementação do meio com fontes de fósforo	47
4.6.5 Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio	47
4.6.6 Influência do tempo de fermentação	48
4.6.7 Influência da suplementação do meio com fonte de carbono	48
4.7 Obtenção dos Extratos Enzimáticos	48
4.8 Determinações Analíticas	48
4.8.1 Atividade enzimática de protease	49
4.8.2 Caracterização físico-química do substrato e do meio semi-sólido	49
5 Resultados e Discussão	53
5.1 Seleção de linhagens	54
5.2 Produção de proteases por fermentação semi-sólida	55
5.2.1 Verificação da influência da atividade de água e umidade relacionadas à adição de água ao substrato	55
5.2.2 Influência da temperatura	60
5.2.3 Influência da quantidade do inóculo	61
5.2.4 Influência da suplementação do meio com fontes de fósforo	63
5.2.5 Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio	65
5.2.6 Influência do período de incubação	67
5.2.7 Influência da suplementação do meio com fontes de carbono	68
5.2.8 Caracterização da torta de canola	69
6 Conclusões	72
7 Perspectivas	74
8 Referências Bibliográficas	76

1.INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente e a rápida diminuição das reservas de combustíveis fósseis no mundo, levaram a exploração de óleos vegetais na produção de combustíveis alternativos. A utilização dos óleos vegetais na produção de bicombustíveis apresenta algumas dificuldades devido a viscosidade natural destes, entretanto, os óleos vegetais têm sido bastante aceitos e utilizados na produção de biodiesel (PLÀ, 2002).

O uso do biodiesel como combustível poderá se tornar um apoio às políticas na área social e ambiental, tendo em vista a contribuição que este poderá representar para a atividade econômica do país como a geração de emprego e renda no campo, inclusive para pequenos agricultores (MCT, 2008).

A utilização dos óleos vegetais no Brasil tem um futuro promissor, uma vez que o país é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. A oportunidade de utilização de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel deve-se a fatores distintos como: clima, solo, regime de chuvas, cultivares adaptadas as diversas regiões do país, entre outros (DÁLIA, 2006).

Entretanto, a crescente produção nacional e mundial de óleos vegetais, inclusive para fins bioenergéticos, impactará expressivamente na geração de resíduos agroindustriais, em especial as tortas. Segundo estimativa da Organização de Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), no período de 2000 a 2007, a produção mundial de torta residual aumentou de 206 para 263 milhões de toneladas. Já no Brasil, neste mesmo período, o aumento registrado foi de 26 para 47 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2008). Sendo assim, a geração deste resíduo no país cresceu mais do que a taxa mundial. Estes dados estão de acordo com os apresentados por RAMACHANDRAN *et al.*, (2007), que estimaram que até 2010 ocorra um aumento de 25 milhões de toneladas na geração mundial de tortas, sendo 17 milhões de toneladas produzidas por países em desenvolvimento como Índia, Brasil e Argentina.

Entre as várias oleaginosas, a canola apresenta um teor de óleo na semente entre 40-46%, apresentando-se favorável à produção de biodiesel. A canola é a terceira oleaginosa mais importante no agronegócio mundial com grande importância nos EUA, Canadá e União Européia, é usada como base da produção de óleo vegetal para o processamento de biocombustíveis, respondendo por 16% da produção de óleos vegetais, logo atrás da soja e da palma (PERES e BELTRÃO, 2006).

A canola está sendo cultivada no Brasil desde 1974, as regiões de destaque na produção de canola são: Sul e Centro-Oeste (TOMM, 2006). Além do alto teor de óleo, esta

cultura apresenta excelente qualidade pela sua composição em ácidos graxos. O interesse dos produtores no plantio de canola tem crescido em função da garantia de compra e do preço pago, constituindo-se como alternativa de cultura de inverno (TOMM, 2005).

Segundo estimativa da FAO, a produção mundial de canola nos anos de 2000 a 2007 aumentou de 39,5 para 49,5 milhões de toneladas. Já o Brasil, apresentou uma produção de 41.000 toneladas na safra de 2000 e passando para 78.000 toneladas em 2007 desta oleaginosa (FAOSTAT, 2008). Este aumento deve ser intensificado, devido ao programa de produção de biodiesel, pois o governo federal está incentivando o plantio de canola para pequenos agricultores em cinco estados brasileiros, através de políticas de preço mínimo, garantia de compra e seguro rural, criando uma nova alternativa de renda para as áreas rurais durante o inverno (BIODIESELBR, 2008).

Para o Mercosul, a previsão para a safra 2008 é a produção de 195 mil toneladas de canola, com semeadura em 130 mil hectares distribuídos nos principais países produtores: Paraguai (60 mil ha), Brasil (50 mil ha) e Argentina (20 mil ha), e produtividade média de 1.400 kg/ha (ANTUNES, 2008).

Com o aumento na produção de sementes de canola, conseqüentemente, haverá um aumento na quantidade de torta. A torta, subproduto proveniente do processo de extração do óleo, apresenta-se como matriz suporte para vários processos biotecnológicos, como fonte rica em nutrientes, apresenta de 34 a 38% de proteínas, e um excelente substrato para crescimento de microrganismos, podendo ser utilizada na produção de enzimas, antibióticos, biopesticida e um excelente suplemento protéico na formulação de rações (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007).

A fermentação semi-sólida (FSS) apresenta um papel de destaque no aproveitamento destes resíduos sólidos, pois devido ao crescimento microbiano ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além do elevado valor agregado (PINTO *et al.*, 2005). Os substratos para FSS são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria como tortas ou farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a bioconversão. São resíduos produzidos em grandes quantidades, e muitas vezes, tornam-se um problema ambiental (PANDEY, 2003).

A torta de canola representa recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis através de processos fermentativos. As tortas provenientes da extração do óleo são consideradas como suporte ou matriz sólida para a fermentação semi-sólida, estas simulam as condições ambientais sob as quais os microrganismos se desenvolvem na natureza

e são bom substrato para a produção enzimática utilizando espécies fúngicas, como fonte de carbono e nitrogênio (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003; RAMACHANDRAN *et al.*, 2007).

O uso de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas têm se tornado bastante difundido na indústria de alimentos (THYS, 2004). No entanto, as enzimas disponíveis comercialmente apresentam ainda custo elevado, uma vez que a maioria dos processos de produção é baseada em fermentação submersa, o que muitas vezes pode tornar a sua utilização pouco atrativa economicamente (VARGAS, 2004). As enzimas secretadas apresentam um maior interesse biotecnológico, devido a menor complexibilidade dos processos de extração e purificação. As proteases fazem parte da classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. De maneira geral, as proteases de origem microbiana são preferidas frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço requerido para seu cultivo e à grande variedade de atividades catalíticas que dispõem. Estas representam 2/3 do total comercializado desta classe de enzimas (RAO *et al.*, 1998).

A grande biodiversidade brasileira tem demandado das agências de fomento pesquisa e inovação, e principalmente, do setor produtivo, a realização de pesquisas tecnológicas no sentido de contribuir com resultados que visem à valorização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos. Dentre os artigos utilizados na revisão deste trabalho não foi encontrado estudos referentes a utilização da torta de canola para a produção de proteases. Neste contexto, este trabalho propõe a utilização da torta de canola como substrato para produção de proteases por fermentação semi-sólida, de forma a agregar valor ao resíduo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso da torta de canola na produção de proteases por fermentação semi-sólida.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a composição física e química da torta de canola provenientes da extração de óleos.
- Selecionar uma linhagem de *Aspergillus* potencialmente produtora de proteases.
- Avaliar o efeito de parâmetros nutricionais e operacionais do processo fermentativo sobre a produção de proteases.
- Acompanhar as alterações físico-químicas do meio semi-sólido durante o processo fermentativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas com atividade catalítica que apresentam propriedades como alta conversão, especificidade na transformação substrato-produto e elevada atividade em condições ambientais moderadas. As enzimas têm sido utilizadas há vários séculos em diferentes processos como a elaboração da cerveja, panificação e produção de álcool. Estas aceleram as reações, são extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de grande importância nos processos biotecnológicos (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004; LESKOVAC, 2003).

As enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo, entre outras); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos de origem fúngica ou bacteriana como, por exemplo, amilases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases. De acordo com Lima *et al.* (2001),

As enzimas são classificadas quanto ao seu modo de ação pela E.C (ENZYME COMMISSION de 1967), como endoenzimas ou exoenzimas. Dependendo do tipo de reação que catalisam são classificadas em seis diferentes grupos: óxido-redutases; transferases; hidrolases; liases; isomerases e ligases. As enzimas podem ser extracelulares, excretadas para o meio, ou intracelulares que são enzimas retidas no interior das células microbianas (NELSON e COX, 2004).

A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio (SPIER, 2005). Das enzimas utilizadas na produção de alimentos, na fabricação de detergentes, indústria têxtil e farmacêutica, 90% destas são extracelulares de origem microbiana (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

As enzimas obtidas por processos fermentativos têm sido amplamente pesquisadas e utilizadas em todo o mundo. O número de enzimas identificadas está em torno de 3.000, porém um pequeno número destas enzimas, cerca de 60, tem aplicação industrial (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua atividade, especificidade, estabilidade de armazenamento, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é influenciada pela sua concentração e do substrato, concentração de

cofatores, presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação.

Conforme Del Bianchi, Moraes e Capalbo (2001), diversas enzimas são produzidas comercialmente para o uso da indústria. De uma maneira geral, estão apresentados na Tabela 1, exemplos das diversas aplicações industriais de enzimas.

Tabela 1- Aplicações industriais de algumas enzimas

Enzima	Indústria	Uso
α - Amilase	Panificação	Redução da viscosidade e crescimento da massa
	Cervejaria	
	Papel	
Glicoamilase	Têxtil	Produção de xaropes de glicose
	Açucareira	
	Lavanderia	
Proteases	Curtume	Curtir e depilar o couro
	Alimentícia	Fabricação de queijos; amaciamento de carne
Pectinases	Alimentícia	Clarificação de sucos
Glicoseisomerase	Alimentícia	Produção de xaropes de frutose
Glicoseoxidase	Alimentícia	Desglicosação de ovos
Papaína	Alimentícia	Evitar turbidez da cerveja
Penicilina-amidase	Farmacêutica	Produção de antibióticos

Fonte: Adaptado de DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO (2001).

A produção de enzimas proteolíticas microbianas por processo fermentativo geralmente são extracelulares. Existe um grande grupo de microrganismos que sintetizam proteases durante a fermentação, com aplicação em diversos campos industrial.

3.2 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, fazem parte da classe de enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. As proteases modificam os substratos com grande seletividade e especificidade, como exemplificado em reações de ativação de formas zimogênicas em enzimas líticas e o processamento e transporte de enzimas extracelulares (RAO *et al.*, 1998). Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo. Sendo 2/3 do total de vendas representado pelas proteases de origem microbiana (RAO *et al.*, 1998; SANDHYA *et al.*, 2005).

3.2.1 Classificação das Proteases

As proteases não são facilmente inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas por causa da sua grande diversidade de atividade e estrutura. Atualmente as proteases são classificadas segundo três critérios principais: i) quanto ao tipo de reação catalisada, exopeptidases e endopeptidases, que clivam respectivamente ligações peptídicas próximas ou distantes das regiões terminais das proteínas; ii) quanto à natureza química do sítio catalítico, as quais de acordo com a composição do sítio ativo, dividem-se em serina, aspartil, cisteína e metalopetidases e iii) quanto às relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em clans, de acordo com a convergência ou divergência de um ancestral comum. Baseando-se nestes critérios as famílias de peptidases são denominadas com uma letra, S, C, A, M e U para os tipos serina, cisteína, aspartil, metalo e não conhecidas, quanto ao tipo de catálise realizada (RAO *et al.*, 1998).

3.2.2 Fontes das Proteases

As proteases são encontradas em diversidade de fontes, tais como plantas, animais e microrganismos (RAO *et al.*, 1998; SANDHYA; SUMANTHA e PANDEY, 2004).

São exemplos de proteases extraídas das plantas papaína, queratinase, bromelina e ficina, entre outras. Como fontes de enzimas, os vegetais apresentam fator limitante à disponibilidade de terra e condições climáticas para crescimento do vegetal (SANDHYA; SUMANTHA e PANDEY, 2004).

Proteases como tripsina, quimotripsina, pepsina e renina são proteases de origem animal (SANDHYA; SUMANTHA e PANDEY, 2004). Já as proteases microbianas são encontradas em vários microrganismos como em bactérias, leveduras e fungos (RAO *et al.*, 1998).

A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas levou a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura (RAO *et al.*, 1998; SANDHYA; SUMANTHA e PANDEY, 2004).

Proteases microbianas representam aproximadamente 2/3 do total de vendas mundial de enzimas. A maioria das proteases comerciais, principalmente neutra e alcalina, são produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*. Os fungos produzem uma ampla variedade de enzimas quando comparado com as bactérias, por exemplo, diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae* produzem proteases ácida, neutra e alcalina. As proteases fúngicas apresentam atividade em uma ampla faixa de pH (4 a 11), além de apresentarem distintas especificidades. No entanto, têm uma menor taxa de reação e baixa tolerância ao calor quando comparada com as enzimas bacterianas (RAO *et al.*, 1998).

3.2.3 Aplicação das Proteases

Proteases apresentam uma grande variedade de aplicações, principalmente na fabricação de detergente e na indústria de alimentos. Com a tendência de desenvolver tecnologias que não poluam o meio ambiente, as proteases apresentam grande aplicação no tratamento de couro com a função de remoção da elastina. No processo de fabricação de detergentes, as proteases apresentam a função de remoção das manchas no processo de limpeza e lavagem. Já na indústria de alimentos apresenta diversas funções, como amaciamento de carnes, obtenção de hidrolisados protéicos e estabilidade da cerveja ao frio (RAO *et al.*, 1998).

3.3 Fermentação Semi-sólida

3.3.1 Definição e Breve Histórico

Fermentação semi-sólida (FSS) foi definida por Pandey (2003) como um processo fermentativo no qual o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre, geralmente utilizando matéria-prima natural como fonte de carbono e energia. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Del Bianchi, Moraes e Capalbo, (2001) concluíram que a ocorrência da fermentação semi-sólida é muito antiga, tendo sido utilizada desde os tempos em que o homem, apesar de fazer uso dos microrganismos para seu benefício, não compreendia os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações. Diferentes alimentos utilizando FSS fazem parte do costume alimentar de diversos povos há muitos séculos. Existem relatos desde o ano 1000 a.C., na China sobre a produção do molho de soja e em 500 a.C. os chineses também produziam o “Chiang”, a partir de FSS. Nos países ocidentais o

processo de FSS é utilizado desde 100 d.C para a produção de queijos maturados, tipo Roquefort, por fungos.

Hoje, as fermentações de alimentos tradicionais no Oriente incluem a fermentação do “shoyu” (molho de soja) e do “miso” (pasta de grãos de soja), e grandes indústrias do gênero foram desenvolvidas a partir destes processos. O “koji” é um dos processos fermentativos mais executados na China, no Japão e no sudeste da Ásia, podendo ser considerada a técnica precursora da FSS. Diversos materiais amiláceos podem ser usados na produção do “koji”. Mas, pela tradição da cultura japonesa, utiliza-se arroz cozido, inoculado com esporos de *Aspergillus oryzae* (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001).

Nos países ocidentais e europeus, a partir de 1940 pouca importância foi dada a FSS, devido a tecnologia da fermentação submersa, pois após a Segunda Guerra Mundial os processos de fermentação submersa tornaram-se muito conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação da penicilina. Alguns trabalhos isolados, fazendo uso da FSS, foram feitos entre 1950 e 1960, objetivando a transformação de esteróides por culturas de fungos, e entre 1960 e 1970, para a produção de micotoxinas. Após este marco nos países ocidentais, o enriquecimento protéico de rações animais foi à principal atividade que motivou a utilização da FSS, envolvendo o uso de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e minimizando a quantidade de resíduos do ambiente despertando interesse mundial e que impulsiona um contínuo avanço nos estudos referentes a este processo Del Bianchi; Moraes e Capalbo, (2001); Pandey, (2003).

3.3.2 Principais características

O substrato para cultivo do microrganismo no processo de fermentação semi-sólida é simples, são usados geralmente resíduos agroindustriais ricos de carboidratos ou proteínas. Em alguns substratos faz-se necessário a adição de água ao meio, ou nutrientes como fonte de carbono e nitrogênio ou minerais (PANDEY, 2003).

A fermentação semi-sólida apresenta vantagens sobre a fermentação submersa por ter um custo de produção mais viável, devido à pequena exigência energética e à facilidade na

extração dos produtos, elevada produtividade, maior concentração de produto, menor geração de efluente e o uso de equipamentos simples (PANDEY *et al.*, 1999).

As condições do processo de fermentação semi-sólida são mais similares ao habitat natural dos fungos filamentosos do que as condições do processo de fermentação submersa, de modo que esses microrganismos são capazes de crescer satisfatoriamente no substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzimas. O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, pode atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas, o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais. Geralmente, pequenas partículas fornece ao substrato maior superfície de ataque microbiano, portanto, são desejáveis. Contudo, um substrato com partículas muito pequenas pode resultar em aglomeração do substrato, o que interfere na respiração microbiana resultando em pouco crescimento microbiano. Entretanto, com partículas maiores proporcionam melhor respiração ou eficácia da aeração, devido ao aumento do espaço entre as partículas, no entanto, fornecem limitação na área superficial para o microrganismo (PANDEY *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2005).

3.3.3 Aplicações da FSS

A fermentação em meio semi-sólido representa uma tecnologia apropriada para o manejo de resíduos agroindustriais, agregando valor a estes e destacando-se como uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de muitos bioprocessos, incluindo a produção em larga escala de enzimas industriais (SINGHANIA, 2009).

Fermentação semi-sólida pode ser aplicada em processos tais como: biorremediação, biodegradação de compostos perigosos, bioconversão de biomassa, biotransformação de resíduos para o enriquecimento nutricional, produção de produtos de alto valor agregado incluindo antibióticos, alcalóides, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biosurfactantes, biocombustível, aroma compostos, entre outros (SINGHANIA, 2009).

A Tabela 2 mostra alguns exemplos de aplicações da fermentação semi-sólida em diferentes setores econômicos. A indústria de alimentos utiliza o processo fermentativo semi-sólido em diversas aplicabilidades como na elaboração de queijos fermentados e na indústria

de aromas. Também apresenta destaque em processos fermentativos industriais na produção de ácidos orgânicos, etanol, antibióticos, entre outros.

Tabela 2. Aplicações da FSS em diferentes setores econômicos

Setor	Aplicação	Exemplos
Indústria agro-alimentar	Fermentações de Alimentos	Koji, Tempeh, Ragi, queijos fermentados
	Produção de Cogumelos	<i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Shiitaki</i>
	Bioconversão de Resíduos	Compostagem, destoxificação, ensilagem
	Aditivos alimentares	Aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
Agricultura	Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Trichoderma</i>
	Crescimento de Plantas	Giberilinas, <i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i>
	Micorrização	Inóculo de plantas
Fermentação industrial	Enzimas	Amilases, celulasas, pectinases, proteases, xilanases
	Antibióticos	Penicilina, probióticos
	Ácidos Orgânicos	Ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Etanol	<i>Schwanniomyces sp.</i>
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides

FONTE: RAIMBAULT, (1998).

3.3.4 Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida

Os controles mais frequentemente analisados em estudos com FSS são: umidade, atividade de água, temperatura de incubação, pH do meio, aeração e agitação, entre outros.

- **Umidade e Atividade de água**

A quantidade de água está relacionada com o meio através de duas variáveis: a umidade e a atividade de água. Na FSS, a quantidade de água presente no meio é influenciada pela capacidade de retenção do substrato, sendo que esta quantidade deve ser suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos sem solubilizar a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato. O que vai determinar o grau de umidade que o substrato deverá ter inicialmente e durante o processo fermentativo será a natureza do substrato, microrganismo e o produto desejado (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001).

Umidade elevada do substrato provoca uma diminuição da porosidade da matriz sólida, uma fraca difusão de oxigênio e aumenta o risco de contaminações. Por outro lado, uma baixa umidade contribuirá para um crescimento limitado e diminuir a acessibilidade do substrato. Durante o processo fermentativo, ocorrem mudanças na A_w , devido à perda de umidade do meio com o calor e liberação de água do metabolismo microbiano (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001). O teor ótimo de umidade para o crescimento microbiano e para a utilização do substrato normalmente situa-se entre 40 e 70%, porém, dependerá do microrganismo e do substrato utilizado (RAIMBAULT, 1998).

Segundo Del Bianchi; Moraes e Capalbo (2001), a atividade de água influencia o desenvolvimento do microrganismo e os processos bioquímicos, ou seja, cada microrganismo tem um nível de atividade de água mínimo para que possa realizar sua atividade metabólica. Raimbault, (1998) ressalta que em geral, as bactérias requerem valores maiores de A_w quando comparado com os fungos, entre 0,85 e 0,99. Assim, os fungos apresentam uma maior aplicabilidade no processo fermentativo semi-sólido, pois apresentam A_w entre 0,6 e 0,9.

- **Temperatura e Transferência de calor**

A temperatura é considerada um fator crítico, assim como a umidade e a atividade de água, devido ao acúmulo do calor gerado pelo metabolismo do microrganismo durante todo o processo fermentativo, que afeta diretamente o crescimento e a esporulação do microrganismo e a formação do produto. No processo de compostagem, este efeito é desejável, porém, para processos biotecnológicos, como a produção de enzimas, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO 2001).

Segundo Hasan, Costa, Sanzo e Raimbault, (1998), o controle da temperatura na fermentação semi-sólida, em nível industrial, é um problema de difícil resolução, onde as principais dificuldades na transferência de calor estão relacionadas às características térmicas dos materiais orgânicos e à baixa umidade presente no sistema.

- **pH**

O controle do pH está entre os mais críticos durante o processo fermentativo semi-sólido e dificilmente será controlado devido à heterogeneidade e à consistência dos substratos. É desejável que o microrganismo tenha tolerância às alterações na concentração de prótons, uma forma de melhorar ou evitar mudanças bruscas no potencial hidrogeniônico é utilizar substratos com capacidade tamponante, ou adicionar soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001).

O pH de uma cultura pode mudar em resposta à sua atividade metabólica. A assimilação de ácidos orgânicos que podem estar presentes em certos substratos levará a um aumento no pH. A variação cinética de pH depende muito de cada microrganismo. Como exemplo, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Rhizopus sp.* o pH pode estar abaixo 3,0; já para *Trichoderma*, *Sporotrichum* e *Pleurotus sp.*, o pH é mais estável entre os 4,0 e 5,0. Além disso, a natureza do substrato tem uma forte influência sobre a cinética do pH, devido ao efeito de tamponamento lignocelulósico de alguns substratos (RAIMBAULT, 1998).

- **Aeração e Agitação**

A aeração e a agitação são operações críticas para prover um suprimento de oxigênio adequado para manutenção das condições aeróbicas e dissipar o excesso de dióxido de carbono liberado durante a fermentação. O processo de FSS permite o livre acesso de oxigênio atmosférico como o substrato (RAIMBAULT, 1998).

Para um alto rendimento durante um curto período de fermentação semi-sólida é necessário o uso de uma grande área superficial de meio de cultura, para que o microrganismo possa se desenvolver em contato com o ar.

Na maioria dos processos a oxigenação do meio é realizada pela passagem de ar estéril sob pressão no equipamento de fermentação. A FSS em comparação com o processo de fermentação submersa necessita de quatro a cinco vezes mais oxigênio. Muitas fermentações não podem ser agitadas vigorosamente uma vez que uma forte agitação pode danificar o micélio. Por outro lado, a agitação tem seus efeitos benéficos como proporcionar uma homogeneidade durante todo o período da fermentação, promovendo uma efetiva distribuição do inóculo no início do processo e consequentemente um melhor crescimento sobre partículas individuais do substrato, expondo as partículas do substrato à atmosfera do fermentador, facilitando a troca de calor dentro do meio (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001).

3.4 Substrato

A seleção de um substrato apropriado ao desenvolvimento do microrganismo é um aspecto importante para a FSS. O material sólido não solúvel pode atuar apenas como suporte físico para o microrganismo ou ainda exercer a função de suporte e de substrato, fornecendo nutrientes para o microrganismo. O sólido pode ser de origem natural, como produtos e subprodutos agrícolas, ou ser constituído por um suporte inerte suplementado com nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano na FSS (PANDEY, 2003).

Conforme Pandey (2003); Pinto *et al.* (2005) e Ramachandran *et al.* (2007), os resíduos sólidos de processos agroindustriais podem atuar como fonte de carbono, nitrogênio

e suporte para o crescimento das células microbianas, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento da biomassa celular e para síntese de produtos do metabolismo microbiano.

Os substratos utilizados em fermentação semi-sólida são geralmente resíduos ou subprodutos agrícolas tais como farelo de soja (ELIBOL e MOREIRA, 2005; GEORGE *et al.*, 1997), bagaço de caju (RODRIGUES *et al.*, 2007), casca de coco (NERY *et al.*, 2007), farelo de trigo (COURI *et al.*, 2006), torta de sementes oleaginosas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007), torta de canola (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000), farinha de trigo (WANG; LAW e WEBB, 2005) e misturas de vários resíduos (MACCHIONE *et al.*, 2008; RAMACHANDRAN *et al.*, 2005; SANDHYA *et al.*, 2005). Estes substratos contêm, geralmente, substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes e as enzimas secretadas pelo microrganismo hidrolisam estas macromoléculas e liberam, assim, pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento microbiano.

Para Raimbault, (1998), alguns substratos brutos precisam de um pré-tratamento para tornarem-se adequados a utilização em processos de FSS:

- Redução de tamanho das partículas utilizando moagem, raspagem ou corte.
- Hidrólise enzimática, física ou química para aumentar a disponibilidade do substrato para fungo.
- Cozimento ou tratamento a vapor para uma pré-degradação das estruturas macromoleculares e eliminação de grandes contaminantes.

O problema mais significativo da FSS é a grande heterogeneidade dos substratos, relacionado à (RAIMBAULT, 1998):

- Estrutura não uniforme do substrato (amido, lignocelulose, pectina)
- Variabilidade entre a amostragem do substrato, o que limita a reprodutibilidade do processo.
- Dificuldade de mistura da massa sólida na fermentação, a fim de evitar a compactação, o que provoca um crescimento não uniforme, gradientes de temperatura, pH e umidade, que torna quase impossível de se obter amostras representativas. Cada tipo de substrato apresenta diferentes tipos de heterogeneidade.

3.5 Microrganismo

Bactérias, leveduras e fungos podem crescer em substratos sólidos, e apresentam aplicação nos processos de FSS (RAIMBAULT, 1998). Os microrganismos mais adequados para utilização em processos semi-sólido são os fungos e as leveduras, uma vez que as bactérias exigem um meio com elevada atividade de água (PANDEY, 2003). Os fungos filamentosos que apresentam-se como o grupo de microrganismos mais importante devido suas propriedades bioquímicas e fisiológicas. O modo de crescimento das hifas e sua tolerância a sistema com baixa atividade de água e alta pressão osmótica, tornam os fungos eficientes e competitivos no processo de bioconversão de resíduos como excelentes substratos sólidos (RAIMBAULT, 1998).

Raimbault, (1998) relatou que microrganismos de uma mesma linhagem podem produzir diferentes grupos de enzimas. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de processos realizados por fermentação semi-sólida realizados por diferentes bactérias, leveduras e fungos.

Tabela 3- Utilização de diferentes grupos de microrganismo em FSS

Microrganismo	Processos com FSS
Bactérias	
<i>Bacillus sp.</i>	Compostagem, amilase
<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostagem
<i>Serratia sp.</i>	Compostagem
<i>Streptococcus sp.</i>	Compostagem
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ensilagem, alimentos
Leveduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentos, etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, amilase
Fungos	
<i>Altermaria sp.</i>	Compostagem, indústria, alimentos
<i>Aspergillus sp.</i>	Compostagem
<i>Fusarium sp.</i>	Compostagem
<i>Monilia sp.</i>	Compostagem, alimentos, enzima
<i>Mucor sp.</i>	Alimentos, enzima, ácidos orgânicos
<i>Rhizopus sp.</i>	Compostagem, degradação de lignina
<i>Trichoderma sp.</i>	Controle biológico, bioinseticida
<i>Beauveria sp.</i> , <i>Metharizium sp.</i>	Controle biológico, bioinseticida
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alimentos, ácido cítrico
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soja, amilase, lipase
<i>Aspergillus niger</i>	Proteínas, amilase, ácido cítrico
<i>Pleurotus oestreatus</i> , <i>P. sajor-caju</i>	Cogumelo
<i>Lentinus edodes</i>	Cogumelo
<i>Penicilium notatum</i> , <i>P. roquefortii</i>	Penicilina, queijos

FONTE: RAIMBAULT, (1998).

3.5.1 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos representam o grupo mais importante de microrganismos utilizados em processo FSS devido suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Apresentam crescimento com formação de hifas, apresentam tolerância a baixa atividade de água e altas pressões osmóticas (RAIMBAULT, 1998).

O modo de crescimento das hifas apresenta grande vantagem para os fungos filamentosos sobre os demais microrganismos na colonização e utilização dos nutrientes disponíveis nos substratos sólidos. Com o crescimento das hifas, estas podem penetrar na parte sólida dos substratos. As ramificações do micélio distribuem-se na parede celular do sólido e as hifas que penetram aos poros do sólido excretam as enzimas hidrolíticas. A penetração aumenta a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas sólidas. O crescimento das hifas permite um contato direto entre hifas e a superfície do substrato. O micélio promove a síntese de elevadas quantidades de enzimas hidrolíticas extracelulares (RAIMBAULT, 1998). Na Figura 1 pode-se observar uma representação ilustrativa do crescimento de fungos em substratos sólidos.

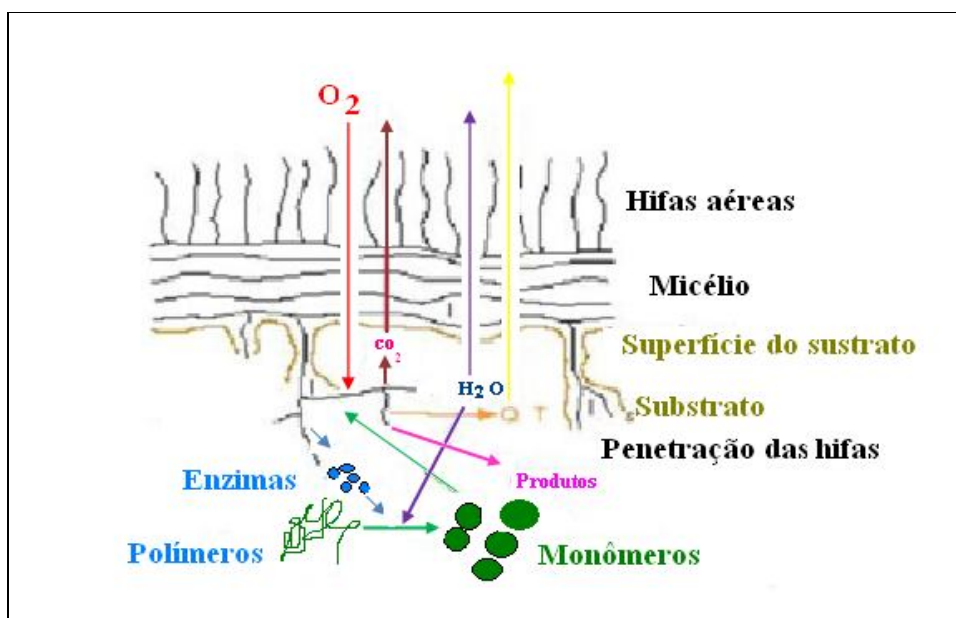


Figura 1. Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos (HÖLKER & LENZ, 2005) adaptado de Dutra, 2007.

A maioria dos processos em meio semi-sólido são conduzidos por fungos filamentosos, sendo mais comumente utilizados os Phicomycetos (*Mucor e Rhizopus*), Ascomycetos (*Aspergillus e Penicillium*) e Basidiomicetos (fungos da podridão branca) (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Do total de enzimas utilizadas mundialmente, 40% são produzidas por fungos, o uso de linhagens de fungos para a produção de enzima têm apresentado diversas vantagens que são geralmente reconhecidos como seguros e produzem diversos tipos de enzimas extracelulares, portanto, requer processos simples de purificação quando comparada com as enzimas obtidas a partir de fontes como plantas ou animais (GARCÍA-GÓMEZ, 2009).

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995 apud SPIER, 2005).

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. Pandey *et al.* (1999) relataram que o *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulase, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase e protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação.

O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* é um microrganismo amplamente utilizados no setor industrial na fabricação de *sake* (vinho de arroz), *miso* (pasta de soja) e *shoyu* (molho de soja). A protease alcalina de *A. oryzae* é considerada muito importante na produção do molho de soja através da hidrólise da matéria-prima. As cepas industriais de *A. oryzae* secretam grandes quantidades de enzimas, tais como amilases e proteases (MURAKAMI *et al.*, 1991).

Aspergillus oryzae tem sido utilizado há muito tempo para a produção industrial de proteases. As características de *A. oryzae* em meios sintéticos e semi-sólidos e a manipulação sua informação genética estão disponíveis em centenas de artigos na literatura (WANG; LAW e WEBB, 2005). Extensos estudos sobre a estrutura e as propriedades de *A. oryzae* de protease também são relatados (GARCÍA-GÓMEZ, 2009; LI *et al.*, 2000; SANDHYA *et al.*, 2005; WANG; LAW e WEBB, 2005).

Diferentes resíduos agroindustriais estão sendo utilizados como matérias-primas de incubação utilizando fungos filamentosos, particularmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* devido à excelente capacidade de produção de várias enzimas por estas cepas (WANG; LAW e WEBB, 2005).

3.6 Torta de Canola

A canola (*Brassica napus* L. e *Brassica campestris* L.) pertence à categoria de plantas oleaginosas inserida na família crucífera. Dela se extrai o óleo de canola, tida como o produto mais saudável para esta categoria pelos baixos teores de gordura saturada (ALBUQUERQUE, 2006).

Em 1970, o *Rapaseed Congress Meeting*, em Quebec, informou que o conteúdo alto de ácido erúico presente em óleo de colza era suspeito de causar lesões no coração e formar uma camada de gordura ao redor deste em alguns animais experimentais. Em 1974, o Dr. Baldur Stefansson, um fitogeneticista da Universidade de Manitoba no Canadá, desenvolveu a primeira variedade de colza “double low”, com níveis reduzidos de ácido erúico e glucosinolatos. Esta variedade de *Brassica napus* foi a primeira a preencher todos os requisitos de qualidade para identificar o cultivo desta semente fortemente melhorada, a partir de então, conhecida pelo nome de canola. O nome canola é derivado de *Canadian Oil Low Acid* foi registrado, inicialmente, pela *Western Canadian Oilseed Crushers Association* para referir-se ao óleo, torta e semente provenientes de variedades contendo menos de 5% de ácido erúico no óleo e 3 mg ou menos de glucosinato por grama, este normalmente medido na torta. Contudo, em 1980, os direitos de registro da marca foram transferidos para o *Canola Council of Canada* e, em setembro de 1986, foi definido que os requisitos para o uso da marca exigiam que o óleo tivesse menos de 2% de ácido erúico e os componentes sólidos da semente deviam conter menos de 30 μ moles de glucosinato por grama (ALBUQUERQUE, 2006).

A utilização dos óleos vegetais no Brasil hoje apresenta um futuro promissor, uma vez que o país é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. A oportunidade de utilização de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel deve-se a fatores distintos como: clima, solo, regime de chuvas, cultivares adaptadas as diversas regiões do país, entre outros (VARGAS, SCHUCHARDT e SERCHELI, 1998). A canola é a terceira oleaginosa mais importante no agronegócio mundial, representando 16% da produção de óleos vegetais (TOMM, 2006). Entre as várias oleaginosas, a canola apresenta um teor de 40-48% de óleo na semente, apresentando-se favorável à produção de biodiesel (LORA e ANDRADE, 2008). O interesse

dos produtores no plantio de canola tem crescido em função da garantia de compra e do preço pago, constituindo-se alternativa de cultura de inverno (TOMM, 2005).

A previsão para a safra 2008 de canola para o Mercosul é uma produção de 195 mil toneladas (ANTUNES, 2008). Com o aumento na produção de sementes de canola, conseqüentemente, haverá um aumento na quantidade de torta de canola.

A torta de canola é um subproduto do processo de extração do óleo de canola, apresentando como uma excelente fonte de proteína com teores de 34 a 38%, constituindo um excelente suplemento protéico na formulação de rações para bovinos, suínos, ovinos e aves (OLIVEIRA e FURTADO, 2001; TOMM, 2005) fala sobre os valores nutricionais de alguns componentes da torta de canola, onde este farelo apresenta 93% de matéria seca, teor de proteína bruta de 38% e teor de fibra bruta 11%.

Ebune; Asheh e Duvnjak (1995b) estudaram os efeitos da adição de fosfato e glicose no farelo de canola para produção de fitase por FSS utilizando *Aspergillus ficuum*, observando que menores concentrações destes compostos favoreceram a produção da enzima. Estes mesmo autores estudaram o efeito da idade do inóculo, a concentração do microrganismo no meio fermentativo e o teor de umidade do farelo de canola sobre a produção fitase em processo semi-sólido (EBUNE; ASHEH e DUVNJAK, 1995a).

El-Batal e Karem (2001) verificaram a influência de fatores como teor de água, glicose, fosfato, alguns tensoativos e a irradiação gama sobre a produção de fitase e hidrólise do ácido fítico no farelo de canola por fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger*.

Meira *et al.* (2007) utilizou uma mistura de diferentes substratos (farelo de canola, soja, algodão, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol) para produção de biosurfactantes por FSS.

Dong e Walker (2008) avaliaram a produção de ácidos graxos poliinsaturados em sólido-liquido com adição de farelo de canola como fonte de carbono e nitrogênio e também servindo como suporte para o crescimento do fungo *Mortierella alpina*.

No entanto, não foram encontrados estudos utilizando a torta de canola como substrato para a síntese de proteases por *Aspergillus oryzae*, dentre os artigos utilizados na revisão deste trabalho.

3.7 Produção de proteases por FSS empregando fungos do gênero *Aspergillus*

A literatura dispõe de inúmeras publicações utilizando processo fermentativo semi-sólido para obtenção de proteases sintetizadas por fungos do gênero *Aspergillus*. A produção de proteases por FSS vem sendo investigada visando avaliar, o efeito de diversos fatores sobre a produção enzimática, bem como buscar estratégias para a otimização da sua produção.

Sandhya *et al.* (2005) realizaram um estudo comparativo sobre a produção de protease neutra utilizando resíduos agroindustriais (farelo de trigo, casca de arroz, farelo de arroz, torta de óleo de coco, torta dendê, torta de óleo de gergelim e torta de azeite) como substrato para a FSS e fermentação submersa, onde testaram diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* e *Penicillium*. Esses autores avaliaram a produção de protease neutra, cultivados em meio sólido, a partir de resíduos agroindustriais, verificando que a melhor linhagem testada para a produção de protease neutra foi *A. oryzae* NRRL 1808 e que em ambos os sistemas, o farelo de trigo foi o melhor substrato. Os melhores resultados para FSS foram obtidos com teor de umidade inicial de 43,6%, quando inoculados com 1 mL de suspensão de esporos (10^8 esporos) e incubadas a 30°C por 72 h obtiveram 31,2 U.g⁻¹.

Outras linhagens de *Aspergillus* foram estudadas para produção de protease por FSS utilizando farelo de trigo. Malathi e Chakraborty (1991) avaliaram a produção de protease neutra por *Aspergillus flavus* observando a influência de fatores como umidade do substrato, tempo de incubação e temperatura sobre atividade enzimática. As condições ótimas para a produção foram: 32°C, a temperatura de incubação do meio, 63% a umidade do substrato com período de crescimento de 48 horas obtendo produção de 6,8 U.mL⁻¹ de enzima.

García-Gómez *et al.* (2009) utilizaram farinha de peixe em reator tubular para produção de protease por *A. oryzae* 2095 por processo semi-sólido, os resultados mostraram ótima estabilidade do pH e temperatura da enzima obtida em relação as enzimas proteolíticas comerciais.

Macchione *et al.* (2008) realizaram estudo comparativo para avaliar a produção de protease por FSS e fermentação submersa, utilizando nove linhagens de fungos termófilos, testaram substratos contendo elevado teor de proteína s para induzir a secreção enzimática como leite de soja, farinha de soja, leite em pó, arroz e farelo de trigo. Os melhores resultados

foram obtidos no farelo de trigo por FSS pelo microrganismo *Thermomyces lanuginosus* obtendo aproximadamente 1000 U.mL^{-1} em 3 dias de processo fermentativo.

A produção de protease pelo fungo *Aspergillus parasiticus* está relatada no trabalho de Tunga; Shrivastava e Banerjee (2003) que realizaram a purificação e caracterização de uma protease a partir de processo semi-sólido do farelo de trigo. Os resultados mostraram que a enzima permaneceu ativa na presença de agentes oxidantes, redutores e estável na presença de vários detergentes.

Vishwanatha; Rao e Singh (2008) produziram e caracterizaram protease ácida a partir de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 utilizando farelo de trigo como meio com 60% de água e adicionada de sais, adicionaram 4% farinha de soja desengordurada como uma fonte de proteína. A enzima produzida foi uma proteína da classe aspartato de 47 kDa com atividade específica de 43.658 U.mg^{-1} ,

Sanchez e Pilosof (2000) realizaram um estudo comparativo relacionando a produção de protease com a quantidade de conídios de *Aspergillus niger* cultivados em uma mistura de farelo de soja e farelo de arroz. Observaram que a umidade inicial foi o parâmetro que mais influenciou na produção da enzima e quando adicionou 1% de NaCl ao meio a produção de protease obteve um aumento de 30%. A melhor produção de protease ocorreu com umidade inicial do meio de 38-42% e 0,5-0,7% de NaCl obtendo 67.000 unidades de enzima.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Matéria-Prima

A torta de canola, subproduto do processo de extração do óleo de canola, foi cedida gentilmente pela empresa Celena Alimentos localizada em Eldorado do Sul no Rio Grande do Sul.

A torta, obtida no processo de extração do óleo de canola, foi utilizada como substrato para as fermentações sem passar por tratamento adicional.

4.2 Microrganismos

Inicialmente, realizou-se seleção de linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, de modo a definir a melhor produção de proteases entre as existentes na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical (Tabela 4).

Tabela 4. Linhagem dos fungos do gênero *Aspergillus*.

Código	Espécie	Origem	Instituição
CNPAT 001	<i>Aspergillus niger</i>	Isolada de cajueiro	Embrapa Agroindústria Tropical
IOC 207	<i>Aspergillus niger</i>	Coleção de Culturas de Fungo do Instituto Osvaldo Cruz	Fundação Osvaldo Cruz
IOC 4222	<i>Aspergillus niger</i>	Coleção de Culturas de Fungo do Instituto Osvaldo Cruz	Fundação Osvaldo Cruz
IOC 3883	<i>Aspergillus niger</i>	Coleção de Culturas de Fungo do Instituto Osvaldo Cruz	Fundação Osvaldo Cruz
IOC 4220	<i>Aspergillus niger</i>	Coleção de Culturas de Fungo do Instituto Osvaldo Cruz	Fundação Osvaldo Cruz
CCT 0916	<i>Aspergillus niger</i>	Coleção de Culturas Tropicais	Fundação André Tosello
IV	<i>Aspergillus oryzae</i>	Desconhecida	Embrapa Agroindústria Tropical

CNPAT – Centro Nacional de Pesquisa Agroindústria Tropical; IOC - Instituto Osvaldo Cruz; CCT - Coleção de Culturas Tropicais.

Esporos de cada linhagem foram assepticamente transferidos para tubos (10×120 mm) com rosca, contendo solo estéril e estocados a -18°C.

Os esporos de *Aspergillus* armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento (-18°C) foram reativados em três etapas. Na primeira etapa realizou-se a transferência destes para ágar inclinado, descrito na Tabela 5. Os tubos inoculados foram incubados a 30°C por 5 dias em estufa BOD e posteriormente conservados a 4°C por até 3 meses. A segunda etapa consistiu na transferência dos esporos do ágar da primeira etapa para novo ágar inclinado, conforme Gomes (1995).

Tabela 5. Formulação do meio para reativação dos microrganismos.

<i>Composição</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
<i>Sacarose</i>	6,0
<i>NaNO₃</i>	3,0
<i>KH₂PO₄</i>	1,0
<i>KCl</i>	0,5
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	0,5
<i>FeSO₄.7H₂O</i>	0,01
<i>Agar-agar</i>	30,0

O pH do meio foi corrigido para 4,5. Os tubos foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

Na última etapa, os esporos foram utilizados para a inoculação do meio de sabugo de milho, usado para as linhagens de *A. niger*, conforme Pinto (2003) e farelo de trigo, usado para as linhagens de *A. oryzae*. Estes meios visavam à produção dos esporos utilizados na inoculação do meio de fermentação.

O meio de sabugo de milho foi utilizado para a produção de esporos das diferentes linhagens de *A. niger* que foram utilizados na inoculação do meio de fermentação. Conforme GOMES (1995) o meio foi constituído de 4,6 g de sabugo de milho, triturado, enriquecido com 6 mL da solução C (Tabela 6). O meio foi esterilizado a 1atm a 121°C por 1 hora.

O meio de farelo de trigo foi utilizado para a produção de esporos da linhagem de *A. oryzae* que foram utilizados na inoculação do meio de fermentação. O meio foi constituído

de 10,0 g de farelo de trigo, 4 mL de uma solução 1,7% (m/v) NaHPO_4 e 2,0% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O meio foi esterilizado a 1atm a 121°C por 15 minutos.

Os esporos reativados da segunda etapa de ativação foram transferidos para 20 mL de uma solução estéril de Tween 80 0,3% (m/v) e utilizou-se 1 mL desta suspensão de esporos para inoculação do meio de sabugo de milho, ou de farelo de trigo, sendo estes incubados em estufa BOD por 5 dias a 30°C. Durante o período de incubação foram observados aspectos de coloração, esporulação e formação de micélio aéreo, sendo esta um indicativo de condições ambientais adversas, escassez de nutrientes, de água e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Posteriormente, os frascos foram armazenados sob refrigeração a 4°C por, no máximo três meses.

Tabela 6. Preparo de soluções para o meio de sabugo de milho

Solução A:	
KH_2PO_4	20 g
H_2O destilada	100 mL
Solução B:	
ZnSO_4	3,96 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,60 g
MnSO_4	0,01 g
H_2SO_4	0,5 mL
H_2O destilada	100 mL
Solução C:	
Peptona	2,80 g
HCl 2N	1 gota
Solução A	0,19 mL
Solução B	0,025 mL
H_2O destilada	50 mL

4.3 Obtenção do Inóculo para Fermentação Semi-Sólida

A cada frasco de meio de sabugo de milho ou farelo de trigo foram adicionados 40 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,3% (p/v). Com o auxílio de um bastão de vidro foi realizada a agitação manual dos frascos para promover a liberação dos esporos. Em seguida, a suspensão foi filtrada com gaze estéril e transferida para recipiente também estéril.

A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer após a devida diluição da suspensão obtida. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de 10^7 esporos por grama de meio.

4.4 Meio de Fermentação Semi-Sólida

O meio para a fermentação semi-sólida era constituído basicamente de torta de canola umidificada com água destilada. Para garantir a uniformidade das amostragens, o meio foi preparado em béquer de polipropileno adicionando-se lentamente água destilada a torta de canola e realizada a homogeneização. Após a homogeneização foram transferidos 40 g do meio para Erlenmeyer de 500 mL, diâmetro interno de boca de 50 mm, e autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Os meios foram inoculados com suspensão de esporos e incubados em estufa BOD. As amostras foram retiradas, em períodos de tempo regular, durante todo o processo fermentativo para determinações analíticas.

A Figura 2 apresenta um esquema ilustrativo dos processos de ativação das linhagens (primeiro repique, segundo repique e esporulação em sabugo de milho), obtenção da suspensão de esporos, determinação do volume a ser inoculado e inoculação na torta de canola.

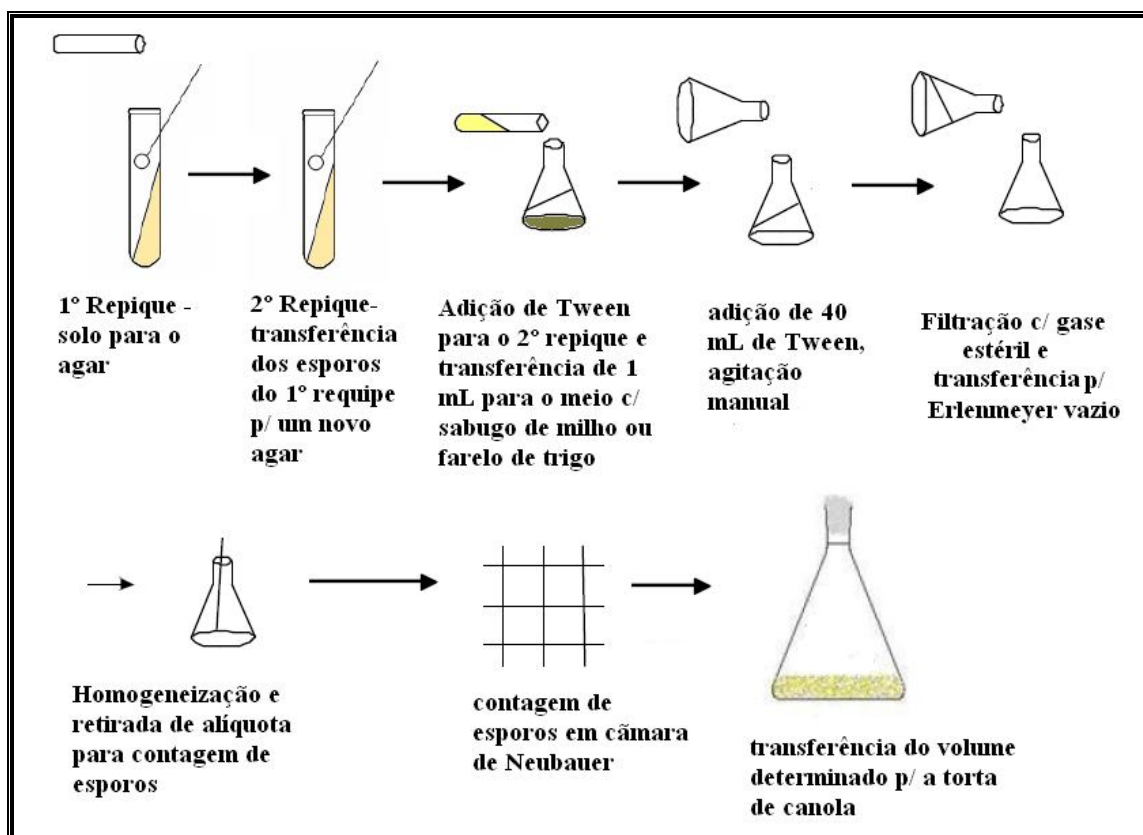


Figura 2 - Esquema de preparo da suspensão de esporos para inoculação na torta de canola.

4.5 Seleção de Linhagem para a Síntese de Protease

As linhagens descritas na Tabela 4 foram inoculadas em meio semi-sólido de canola umidificado com 40 mL de água destilada por 100 g de torta. Os meios inoculados com 10^7 esporos por grama de meio e incubados a 30°C durante 96 horas. Amostras foram retiradas a cada 24 horas.

4.6 Parâmetros Fermentativos Avaliados

Após a seleção da linhagem foram realizados testes para avaliar o efeito das condições nutricionais e de cultivo, na síntese de proteases, conforme descritas a seguir.

4.6.1 Influência da adição de água ao substrato

Foi estudado a umidificação da torta de canola com diferentes volumes de água destilada (10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125 e 150 mL) por 100 g de matéria-prima. Os meios foram inoculados com 10^7 esporos por grama de meio e incubados a 30°C durante 96 horas, com amostras sendo retiradas a cada 24 horas de fermentação.

4.6.2 Influência da temperatura

Determinada a melhor concentração de inóculo (10^7), testaram-se as seguintes temperaturas de incubação do meio: 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C. Os meios foram inoculados e incubados durante 96 horas com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

4.6.3 Influência da quantidade do inóculo

Estabelecida a melhor percentagem de água adicionada ao substrato (40 mL), testaram-se as concentrações de inóculo que foram: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 esporos por grama de meio. Os meios foram inoculados e incubados a 30°C por 96 horas com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

4.6.4 Influência da suplementação do meio com fontes de fósforo

Determinada a temperatura de incubação (20°C), testou-se a adição de fosfato de sódio monobásico. A concentração de fosfato adicionada ao meio foi 1% em relação ao meio sólido. Os meios foram inoculados e incubados durante 96 horas com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

4.6.5 Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio

Nesta etapa, avaliou-se a adição de fontes de nitrogênio descritas na Tabela 7. A concentração de nitrogênio adicionada ao meio foi 1% (m/m) em relação ao meio sólido. Os meios foram inoculados e incubados durante 96 horas com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

Tabela 7. Fontes de nitrogênio avaliadas

<i>Fonte</i>	<i>Concentração (%)</i>
<i>NH₄NO₃</i>	1,0
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	1,0
<i>NaNO₃</i>	1,0
<i>Uréia</i>	1,0
<i>Peptona</i>	1,0
<i>Extrato de levedura</i>	1,0

4.6.6 Influência do tempo de fermentação

Testou-se o tempo de fermentação: no intervalo entre 0 a 240 horas. Os meios foram inoculados e incubados com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

4.6.7 Influência da suplementação do meio com fonte de carbono

Estabelecido o melhor tempo de amostragem (96 h), testou-se a adição de fonte de carbono ao substrato: sacarose, glicose e glicerol nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0% (m/m) em relação ao meio sólido. Os meios foram inoculados e incubados por 96 horas.

4.7 Obtenção dos Extratos Enzimáticos

A enzima foi extraída do meio pela adição de tampão acetato de sódio 200 mM pH 5,0 na razão de 100 mL de solução por 40 g de meio fermentado, permanecendo incubado em BOD a 30°C por um período de 1 hora, filtrada com papel de filtro qualitativo e utilizada na determinação da atividade enzimática (GOMES, 1995).

4.8 Determinações Analíticas

Todas as determinações analíticas foram feitas em duplicata.

4.8.1 Atividade enzimática de protease

Conforme CHARNEY e TOMARELLI, (1947), a mistura de reação constituiu de 1 mL de solução 0,5% de azocaseína em tampão acetato 50 mM e pH 5,0 e 1 mL do extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 37°C durante 40 minutos. Após os 40 minutos, a reação foi parada com adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% , objetivando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação (Biofuge Stratos) a 10.000 rpm por 15 minutos. Transferiu-se 2 mL do sobrenadante contendo aminoácidos e oligopeptídeos de baixo peso molecular para um tubo de ensaio, e adicionou-se 2 mL de KOH 5 N, formando um composto com cor característica que foram quantificados por espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50) com comprimento de onda de 428 nm, contra um branco preparado em condições idênticas, mas utilizando 1 mL de água destilada em substituição à amostra.

Para obtenção do branco de cada amostra, adicionou-se 1 mL de solução de ácido tricloroacético logo após a formação da mistura reacional (1 mL de solução de azocaseína e 1 mL do extrato enzimático).

Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorvância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições de reação estabelecidas. A atividade enzimática foi expressa através da diferença de absorvância entre as amostras enzimáticas analisadas com seus respectivos brancos, sendo 1 unidade = Δ Absorvância - 0,01/ tempo de reação por mL do extrato enzimático.

4.8.2 Caracterização físico-química do substrato e do meio semi-sólido

Com o objetivo de determinar as características físico-químicas da torta de canola foram determinados os teores de umidade, teor de cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, além do teor de amido e atividade de água (A_w). As determinações foram realizadas em triplicata.

- **Umidade**

Foi determinada pelo método descrito pelo IAL (2004). Pesaram-se 3 g da amostra em um cadinho de porcelana previamente tarado. Levou-se a estufa a 105°C onde o material foi dessecado por 16 horas até peso constante. A umidade foi estabelecida como a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100 expressando um valor percentual da mesma.

- **Cinzas**

As cinzas foram determinadas, segundo o método recomendado pelo IAL (2004). Pesou-se em cadinho de porcelana, previamente tarado, cerca de 3g de torta de canola dessecada. Levaram-se as amostra para a carbonização em temperatura de 200°C e em seguida, incinerou-se a amostra em mufla a temperatura de 550°C. Deixou-se reduzir a temperatura da mufla até aproximadamente 80°C e transferiu-se o cadinho para um dessecador. A quantidade de cinzas foi estabelecida como a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100 expressando um valor percentual da mesma.

- **Proteína**

Fração protéica foi determinada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, recomendado pela AOAC (1975), que consiste na determinação do nitrogênio total. A matéria-prima orgânica é decomposta através de uma digestão feita com H₂SO₄ concentrado, usando como catalisador sulfato de cobre, sendo o nitrogênio existente transformado em sal amoniacal (sulfato de amônia). Em seguida, do sal desloca a amônia recebendo-se em uma solução de ácido sulfúrico 0,1 N, contendo gotas de vermelho de metila, cujo excesso foi titulado com hidróxido de sódio de igual

normalidade. A quantidade de ácido sulfúrico 0,1 N consumida e multiplicada por 0,0014, revelou o nitrogênio total da amostra. Multiplicando-se esse resultado por 6,25 para converter o nitrogênio em proteína e assim obteve-se a quantidade de proteína. Os resultados foram expressos em grama por 100 grama de torta.

- **Extrato etéreo**

Determinou-se de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do IAL (2004). Pesaram-se cerca de 2 g de torta de canola, transferiu-se quantitativamente para um cartucho de Soxhlet e cobriu-se a amostra com um pouco de algodão. Utilizando-se um balão volumétrico, previamente tarado, procedeu-se a extração em aparelho de Soxhlet, utilizando hexano como solvente, durante 6 h. Ao final deste período, evaporou-se o solvente e em seguida, colocou-se o balão volumétrico contendo o material lipídico em estufa regulada a 105°C, durante 1 h. Esfriou-se em dessecador e pesou-se a amostra. Pela diferença de peso obteve-se a quantidade de substâncias lipídicas presentes na amostra.

- **Carboidratos**

Método da diferença de 100 (subtraindo o teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade) descrito nas Normas Analíticas do IAL (2004).

- **Amido**

A quantidade de amido na torta foi determinada utilizando o método AOAC,(1992) e de Miller, (1959). Pesou-se 5 g de torta e a partir desta amostra fez-se a extração segundo (AOAC, 1992) e em seguida determinou-se pelo método de açúcares redutores utilizando DNS, o resultado desta determinação foi multiplicado pelo fator 0,90.

- **Atividade de água (A_w)**

A atividade de água foi determinada através do medidor digital de A_w utilizando o equipamento AQUALAB CX-2, com sensibilidade de 0,001 à temperatura de $(28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C})$.

- **Determinação do pH**

Para a determinação do valor de pH pesou-se 1g do substrato, colocou-se em um béquer de 15 mL e adicionou-se 50 mL de água destilada em agitação por 30 minutos. Mediu-se o pH com auxílio de potenciômetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de linhagens

Todas as linhagens estudadas produziram proteases. A maior atividade foi obtida em 48 horas com *Aspergillus oryzae* IV, sendo de aproximadamente 60 U.g⁻¹ durante todo o processo fermentativo. Em 24 horas detectou-se 57 U.g⁻¹ obtendo uma produtividade de 2,3 U.g⁻¹.h⁻¹. Esta linhagem apresentou um desempenho superior durante todo o período de fermentação em relação as demais linhagens testadas (Figura 3).

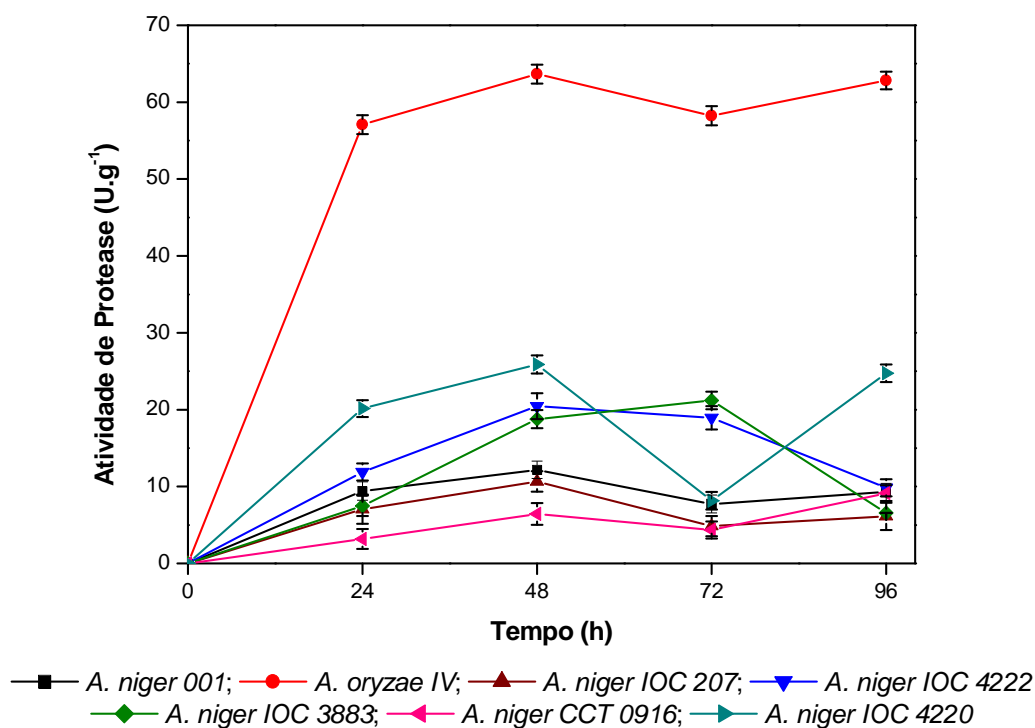


Figura 3 - Atividade de proteases para as diferentes linhagens de *Aspergillus*

Sandhya *et al.* (2005) realizaram em seu estudo uma seleção com fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, para produção de protease neutra por fermentação semi-sólida e submersa, usando vários substratos agroindustriais, farelo de trigo, farelo de arroz, torta de óleo de coco, torta de palma e torta de óleo de oliva. De forma similar ao resultado apresentado nesta etapa, o fungo que apresentou melhor desempenho foi a linhagem de *Aspergillus oryzae* NRRL 1808. O parâmetro utilizado pelos autores para a escolha da melhor

linhagem foi o tamanho do diâmetro da hidrólise das cepas incubadas em placas com ágar caseína.

5.2 Produção de proteases por fermentação semi-sólida

A linhagem *A. oryzae* IV selecionada, por apresentar um maior potencial de síntese de proteases em relação as demais, foi utilizada nesta etapa a fim de obter uma maior produção desta enzima.

5.2.1 Verificação da influência da atividade de água e umidade relacionadas à adição de água ao substrato

O teor de umidade inicial é um fator crítico no processo de fermentação semi-sólida, uma vez que influencia na atividade de água (A_w) do meio e na disponibilidade deste componente para o microrganismo. Isto tem reflexo nas taxas de crescimento microbiano e rendimento do produto (NISHIO, TAI e NAGAI, 1979; RAMESH e LONSANE, 1990).

Na FSS, a água está relacionada à umidade, que diz respeito ao percentual de água na massa total de meio, enquanto a atividade de água (A_w) representa um parâmetro termodinâmico relacionado a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças das partículas do substrato. Obviamente, quanto maior for o teor de umidade, maior serão os valores de atividade de água, contudo a relação entre estes dois parâmetros varia de acordo com a composição e estrutura do substrato. A atividade de água está relacionada diretamente ao crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (MOURÃO, PINTO e SOARES, 2005).

A Figura 4 mostra como a umidade e a atividade de água varia com a adição de diferentes quantidades de água, entre o intervalo de 10 a 150 mL, determinados antes e após a etapa de esterilização do meio. Como esperado, observou-se que o aumento do volume de água adicionada ao meio, impactou diretamente na umidade do meio e esta na atividade de água do meio. O perfil de umidade e atividade de água dos meios, antes e após o processo de esterilização, foram similares.

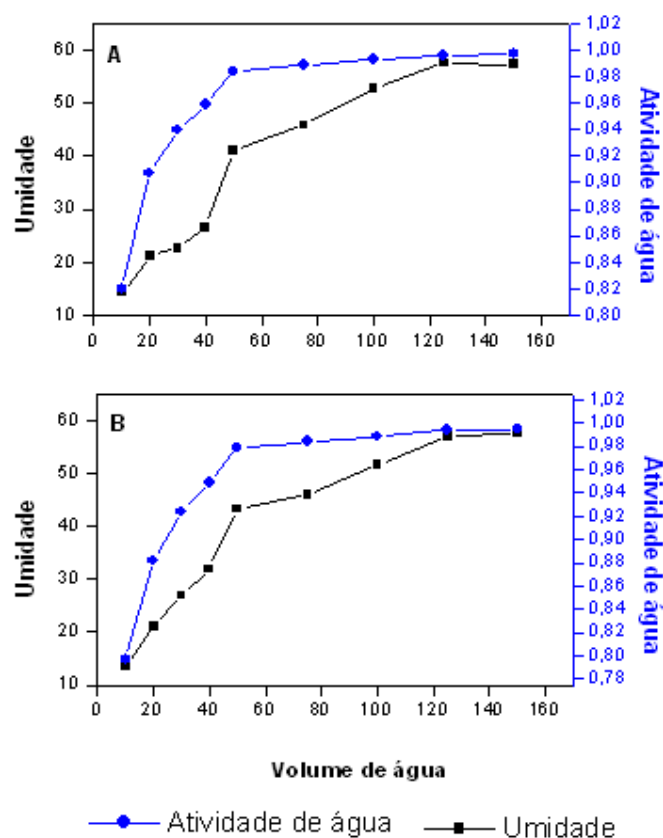


Figura 4 - Relação da umidade e A_w , antes (A) e após o processo de esterilização meio fermentativo(B).

Para investigar a influência da umidade na produção de proteases de *A. oryzae* IV durante a fermentação semi-sólida, volumes entre 25 e 150 mL de água foram adicionados ao meio. Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que em todos os meios houve síntese de proteases. Pode-se observar que o aumento da umidade inicial do meio acarretou decréscimo na produção de proteases, evidenciado pelos menores valores de atividade de proteases. Vários fatores são afetados quando a umidade inicial apresenta valores elevados, como a atividade metabólica do microrganismo e conseqüentemente a síntese do produto (ZANDRAZIL e BRUNERT, 1981).

No meio com adição de 25 mL de água, o microrganismo demorou mais tempo para adaptaçã. Isto pode ter ocorrido devido à baixa disponibilidade de água. A produção máxima da enzima ocorreu no meio com adição de 25 mL de água em 72 horas de

fermentação que foi de 204 U.g^{-1} , após este período ocorreu um decréscimo da atividade enzimática.

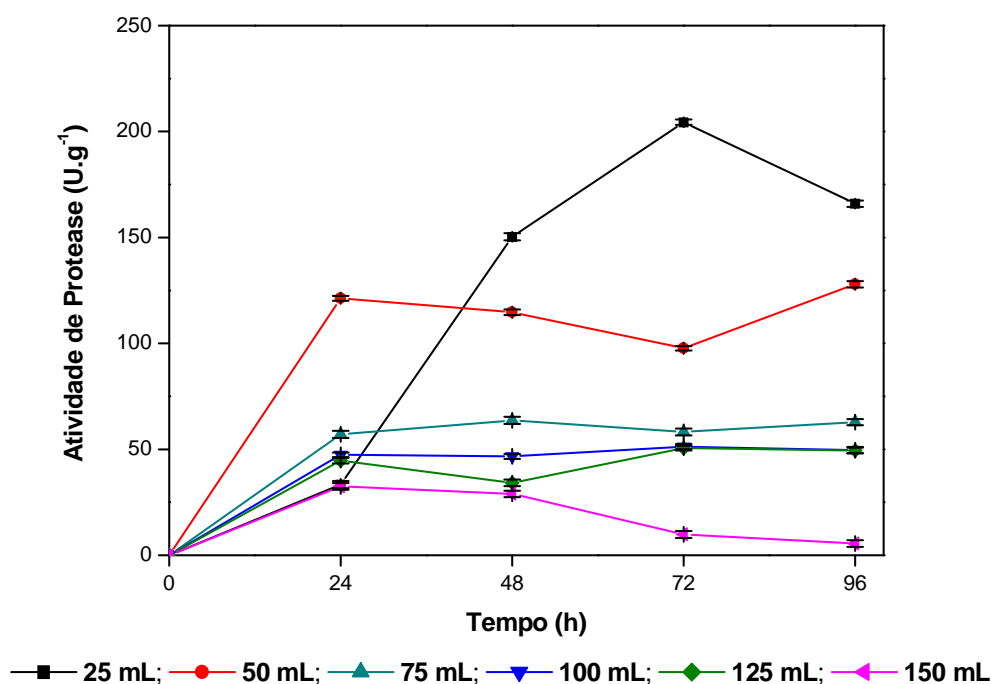


Figura 5 - Atividade de proteases produzida por *A. oryzae* IV no meio de fermentação com adição de diferentes volumes de água a torta.

Battaglini *et al.* (1991), utilizaram uma combinação de casca de arroz e farelo de arroz com substrato da fermentação semi-sólida e avaliaram a influência da adição de água na produção de protease neutra por *Aspergillus oryzae* NRRL 2160. Observaram que o teor de umidade entre 35-40% promoveu maior produção da enzima.

Sandhya *et al.* (2005) estudando a produção de protease por *Aspergillus oryzae* 1808 em farelo de trigo, mostraram que a maior produção de enzima foi obtida com adição de 43,6% de umidade, com produção de $30,5 \text{ U.g}^{-1}$ de substrato.

Malathi e Chakraborty (1991) avaliaram a umidade do farelo de trigo para produção de protease alcalina por *Aspergillus flavus* e obtiveram a melhor produção em meio com umidade inicial de 63%, observaram também que o aumento da adição de água ao meio reduziu a produção da enzima.

A produtividade máxima obtida foi observada no meio com adição de 50 mL de água obtendo $5,0 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$, com produção de 121 U.g^{-1} em 24 horas de fermentação. Já nos meios com adição de 25 mL de água a maior produtividade ocorreu em 48 horas de processo fermentativo, obtendo valor de $3,1 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (150 U.g^{-1}). Os meios com adição de 75, 100, 125 e 150 mL de água apresentaram mesmo perfil, com pico de produtividade em 24 horas (Figura 6).

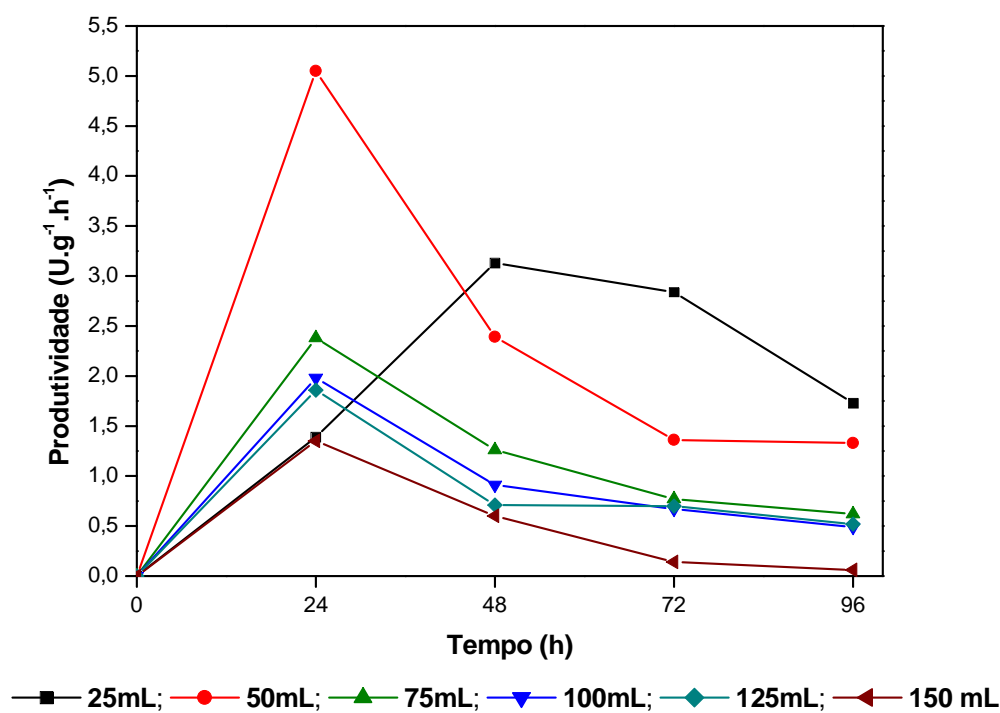


Figura 6 - Produtividade da produção de proteases por *A. oryzae* IV no meio de fermentação com adição de diferentes volumes de água a torta.

A Figura 7 mostra a atividade de proteases em uma segunda etapa de adição água ao substrato, uma vez que a maior produção de proteases na etapa anterior ocorreu no meio com adição de 25 mL de água. Com os valores testados, entre 10 e 50 mL, foi possível determinar a melhor proporção de água a ser adicionada a torta, que foi 40 mL (227 U.g^{-1}) após 48 horas de incubação, ocorrendo uma diminuição no tempo em relação a etapa anterior.

Nos meios com 10 e 20 mL de água apresentaram baixos valores de atividade enzimática. Isto pode ter ocorrido devido à baixa disponibilidade de água, ou seja, baixa

solubilidade dos nutrientes do substrato (ZANDRAZIL e BRUNERT, 1981). A maior produção ocorreu em 96 horas de fermentação nos meios com 10 e 20 mL de água, apresentando $4,2 \text{ U.g}^{-1}$ e $22,9 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente.

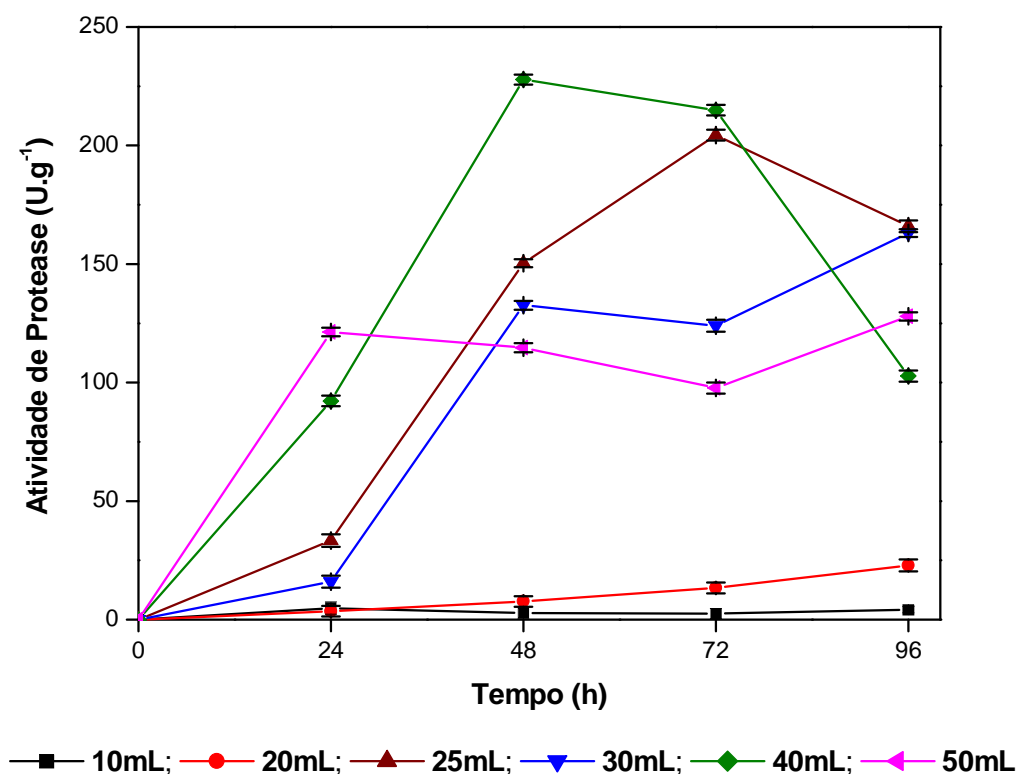


Figura 7 - Atividade de proteases produzida por *A. oryzae* IV no meio de fermentação com adição de volumes de água abaixo de 50 mL a torta.

A Figura 8 apresenta os valores de produtividade obtidos na etapa de adição de volumes de água com intervalos entre 10 e 50 mL a torta, a produtividade máxima obtida foi observada no meio com adição de 50 mL de água ($5,0 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$), com produção de 121 U.g^{-1} em 24 horas de fermentação. No entanto, no meio com adição de 40 mL apresentou uma produtividade de $4,8 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 48 horas de fermentação e uma produção de proteases equivalente a 227 U.g^{-1} .

Com os resultados obtidos nesta etapa, o volume de água adicionado ao substrato nas etapas seguintes foram 40 mL de água para 100 g de torta de canola.

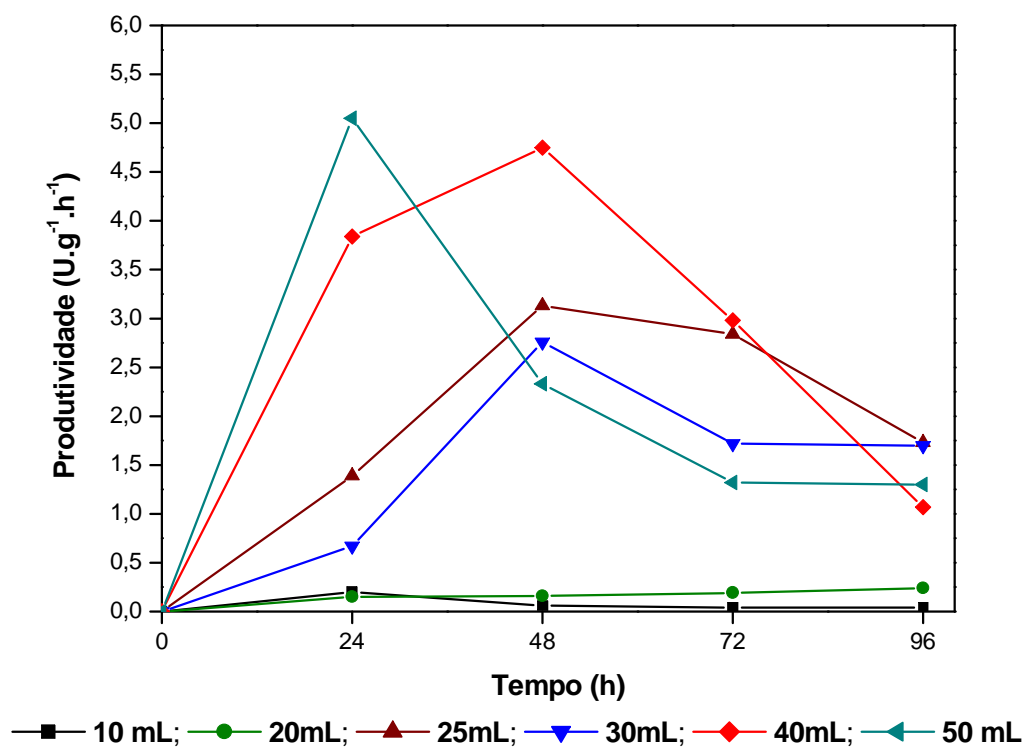


Figura 8 - Produtividade da produção de proteases por *A. oryzae* IV no meio de fermentação com adição de volumes de água abaixo de 50 mL na torta.

5.2.2 Influência da temperatura

A temperatura do processo é um importante fator na manutenção do sistema, pois interfere no crescimento celular, formação de esporos, germinação e fisiologia microbiana, o que afeta, em geral, a formação do produto desejado, pois cada microrganismo ou linhagem

têm as suas próprias condições especiais para uma máxima produção de enzima (BANERJEE, MUKHERJEE e PATRA, 2005; GUERARD, GUIMAS e BINET, 2002).

Nas diferentes temperaturas de incubação testadas, todas apresentaram produção da enzima, porém as temperaturas de 15 e 40°C apresentaram menores valores de atividade de proteases, estas não favoreceram o crescimento do fungo e a produção da enzima (Figura 9).

A maior atividade de proteases obtida foi observada no meio incubado a 20°C em 96 horas de fermentação (233 U.g⁻¹). Uma redução na atividade da enzima foi observada quando se elevou a temperatura do processo a partir de 20°C.

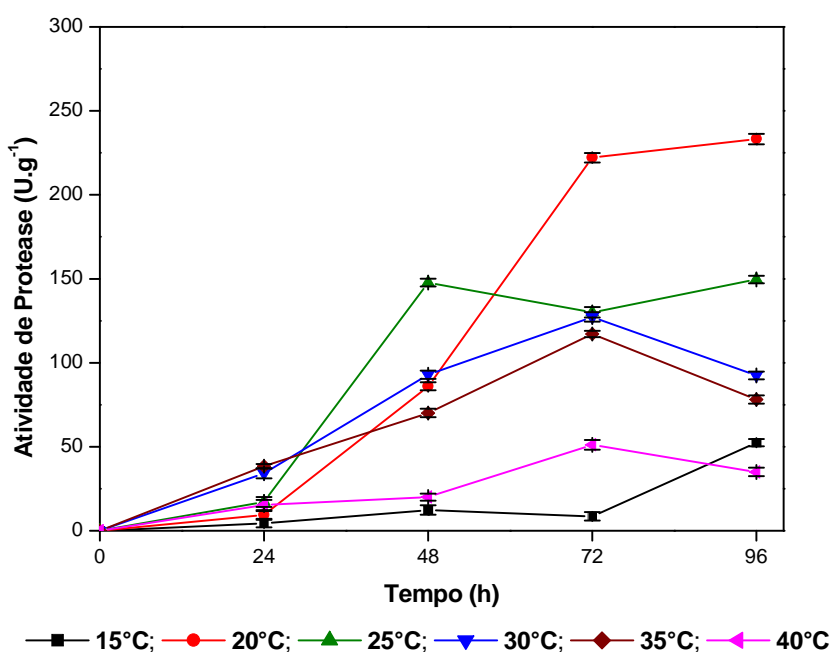


Figura 9 - Produção de protease nos meios com diferentes temperaturas.

5.2.3 Influência da quantidade do inóculo

O inóculo é um importante fator biológico, pois estabelece o ponto de partida para o processo fermentativo. O tamanho deste, ao impactar na biomassa inicial, pode alterar as taxas de consumo de nutrientes e formação de produtos. Para estudar a influência do tamanho

de inóculo sobre a produção de proteases foram adicionados $1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ esporos.g⁻¹ de meio.

A Figura 10 mostra os valores de atividade de proteases nas diferentes concentrações de inóculo testadas. Observa-se que em todas as concentrações testadas houve produção de proteases e que quanto maior a concentração de inóculo, maior a produção de proteases. As concentrações 10^4 e 10^5 esporos.g⁻¹ apresentaram os menores valores de atividade. A maior atividade enzimática foi obtida no meio inoculado com concentração de 10^7 esporos.g⁻¹ no tempo de 96 horas de processo fermentativo (248 U.g⁻¹).

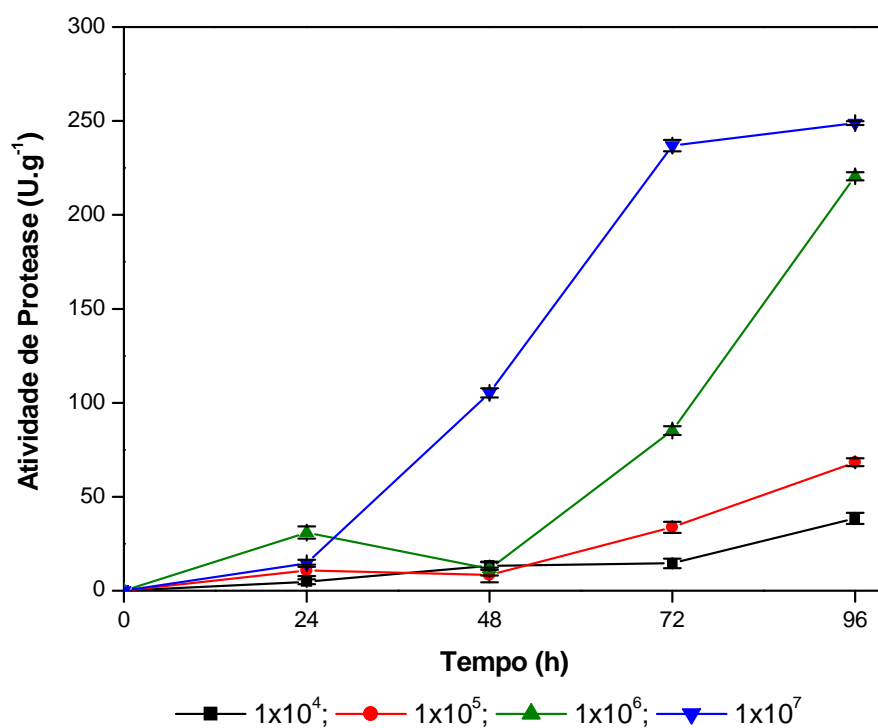


Figura 10 - Atividade de proteases em função do tempo de fermentação com diferentes taxas de inoculação.

A adição de volume de inóculo na concentração 10^8 esporos.g⁻¹ acarretaria na adição de um grande volume de água ao meio, aumentando muito o teor de umidade e atividade de água do meio.

Sandhya *et al.* (2005) estudando o efeito da concentração de inóculo na produção de protease neutra com *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 em farelo de trigo, observou que concentrações de inóculo acima de 10^8 esporos por grama de substrato ocorre uma queda na produção, justificando esta queda devido a maior formação de biomassa levando à escassez de nutrientes no tempo de 72 horas de fermentação.

Segundo Pandey (1994), a concentração de inóculo disponível na cultura exerce um significativo papel na produção de metabólitos por fermentação semi-sólida no que se refere ao desenvolvimento microbiano e liberação dos produtos de interesse. A idade e a concentração do inóculo são parâmetros críticos para a produção de enzimas, uma vez que o estado fisiológico do microrganismo e sua concentração são parâmetros que deverão afetar de forma significativa o desempenho da fermentação (SOARES *et al.*, 2003).

5.2.4 Influência da suplementação do meio com fontes de fósforo

Após o estudo da concentração de inóculo no meio fermentativo, avaliou-se a adição de fosfato de sódio monobásico ao meio. A produção de proteases no meio suplementado foi comparada ao meio controle, este foi realizado com as melhores condições determinada nas etapas anteriores (utilizando a linhagem *A. oryzae* IV, volume de água adicionada ao substrato de 40 mL, temperatura de incubação de 20°C e concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato).

O meio com adição de fosfato apresentou valores crescente de produção de proteases em todos o processo fermentativo. Em 24 horas de fermentação, a atividade enzimática do meio com adição de fosfato e a fermentação controle apresentaram valores bem próximos. Sem a presença da fonte de fósforo, a atividade de proteases determinada atingiu seu máximo com 96 horas de fermentação ($349,4 \text{ U.g}^{-1}$). No meio suplementado com fosfato a atividade de proteases atingiu seu máximo também com 96 horas de fermentação ($304,9 \text{ U.g}^{-1}$) de acordo com a Figura 11. Este fato indica que a adição do fosfato não influenciou positivamente o aumento da produção de proteases, obteve-se uma menor produtividade, quando comparada a fermentação controle (Tabela 9).

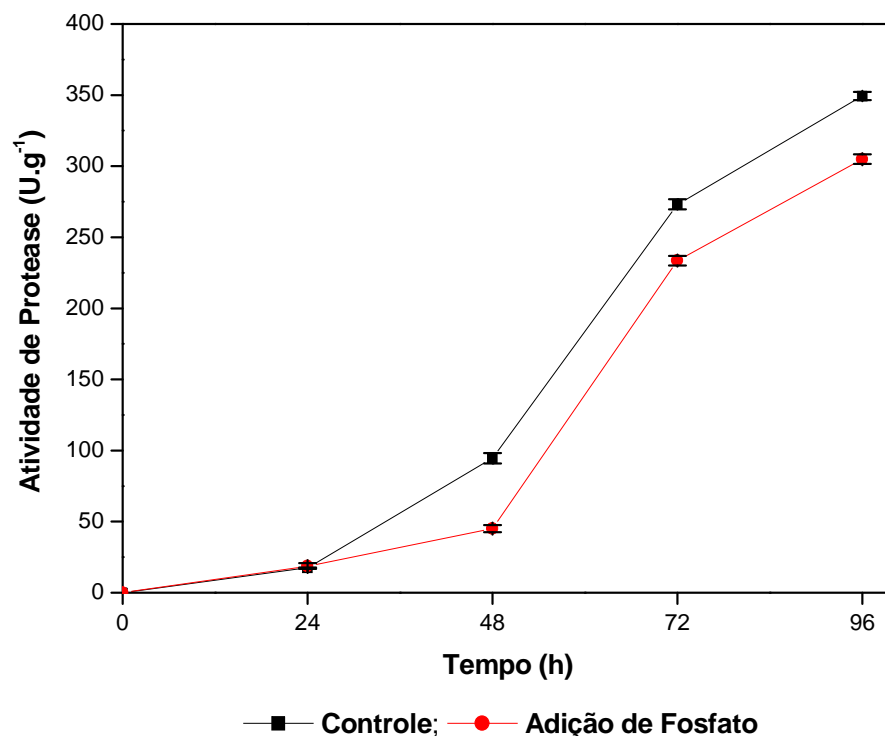


Figura 11 - Produção de proteases nos meios com adição de 1% de fonte de fósforo no meio.

Pinto (2003) adicionou 1% de fosfato de sódio monobásico no farelo de trigo, obtendo um aumento na produção de tanase de 182% em 24 horas de fermentação. Porém, neste estudo a fonte de fósforo não influenciou na produção de proteases.

A Tabela 9 apresenta os resultados da produtividade do meio suplementado com fósforo e da fermentação controle. Pode-se observar que no tempo de 24 horas de processo fermentativo os dois meios apresentaram valores de produtividade muito próximos. Durante todo período de fermentação houve um aumento crescente na produtividade de ambos os meios analisados. O valor máximo de produtividade do controle e do meio com adição de 1% de fosfato ocorreu no tempo de 96 horas com valores de 3,64 e 3,18 U.g⁻¹h⁻¹, respectivamente. Porém, pode ter ocorrido uma inibição na produção de proteases pelo microrganismo na presença do fosfato no meio.

Tabela 9 - Influência da adição de fosfato de sódio monobásico na produtividade de protease.

	Tempo de Fermentação (horas)			
	24	48	72	96
Controle (U.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,73	1,97	3,79	3,64
Meio c/ NaH ₂ PO ₄ (U.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,78	0,94	3,24	3,18

5.2.5 Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio

Após o estudo da adição de fosfato ao meio fermentativo, avaliou-se a influência da suplementação do meio com 1% de diferentes fontes orgânica e inorgânica de nitrogênio, em relação ao meio sólido. A produção de proteases no meio suplementado foi comparada ao meio controle, este foi realizado com as melhores condições determinadas nas etapas anteriores (utilizando a linhagem *A. oryzae* IV, volume de água adicionada ao substrato de 40 mL, temperatura de incubação de 20°C e concentração de inóculo de 10⁷ esporos por grama de substrato e sem adição de fontes de nitrogênio). Observa-se na Figura 12, que em todos os meios suplementados com fontes de nitrogênio houve produção de proteases. A produção de proteases em todos os meios analisados ocorreu de forma crescente ao longo do processo fermentativo, com pico de produção em 96 horas. O meio com sulfato de amônio apresentou menor produção (256 U.g⁻¹). Os meios com adição de peptona, uréia e nitrato de amônio apresentaram uma produção de proteases com valores próximos aos valores obtidos pela fermentação controle, esta apresentou maior produção em 96 horas de fermentação obtendo 350 U.g⁻¹. Das fontes inorgânicas, o nitrato de sódio apresentou maior produção (366 U.g⁻¹ em 96 horas), já os meios suplementados com fontes de nitrogênio orgânico foi o extrato de levedura que apresentou maior produção. Pode-se observar que adição de 1% de extrato de levedura, em relação ao meio sólido, influenciou positivamente na maior produção de proteases, com produção de aproximadamente 393 U.g⁻¹ em 96 horas de fermentação.

Alguns autores em seus estudos adicionaram fontes de nitrogênio para avaliar a influência destas na produção de proteases. Malathi e Chakraborty (1991) adicionaram fontes de nitrogênio ao farelo de trigo, na produção de protease alcalina por *Aspergillus flavus*. Sumantha *et al.* (2006) suplementaram diferentes fontes de nitrogênio ao farelo de arroz para produção de proteases, utilizaram *Rhizopus microsporus* NRRL 3671.

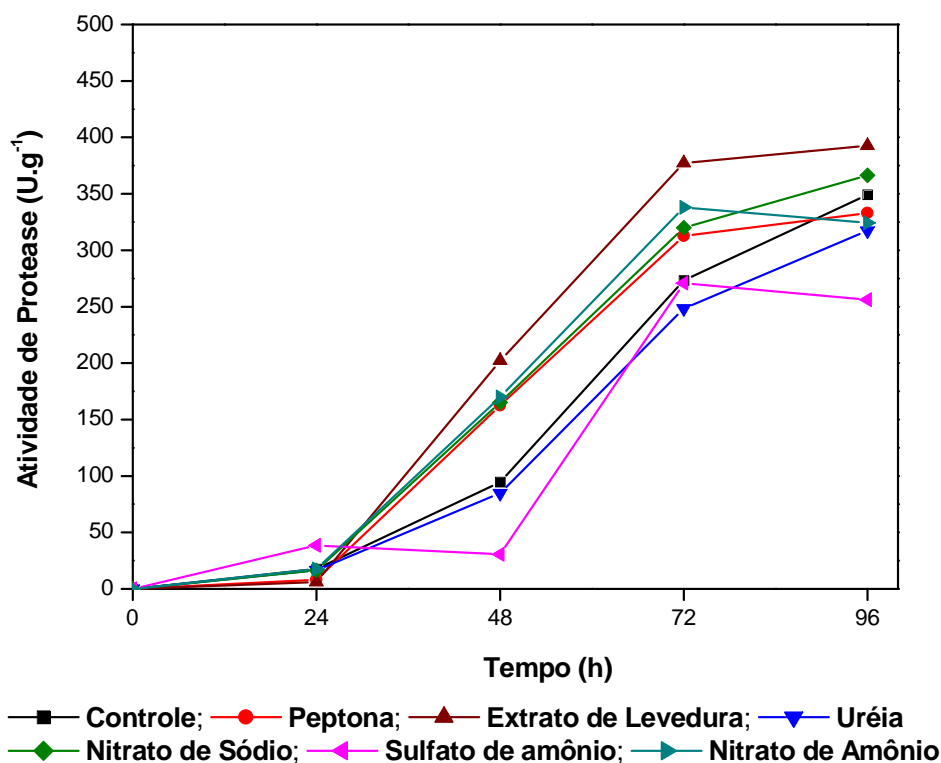


Figura 12 - Produção de proteases nos meios com adição de 1% de fonte inorgânica de nitrogênio no meio fermentativo.

5.2.6 Influência do período de incubação

Nas etapas anteriores, a maior produção de proteases ocorreu no último tempo de amostragem do processo fermentativo (96 h), portanto nesta etapa avaliou-se o tempo de fermentação para observar o pico máximo na produção e depois o declínio. As condições do processo fermentativo nesta etapa foram as mesmas utilizadas na fermentação controle da etapa anterior (utilizando a linhagem *A. oryzae* IV, volume de água adicionada ao substrato de 40 mL, temperatura de incubação de 20°C e concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato). Optou-se pela não adição do extrato de levedura, uma vez que, em maior escala acarretaria em aumento de custos ao processo, já que a produtividade no meio com suplementação de extrato de levedura não apresentou diferença em relação a fermentação sem adição de fontes de nitrogênio. Em 96 horas a produtividade da fermentação com extrato de levedura foi $4 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ e para a fermentação controle foi de aproximadamente $3,7 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

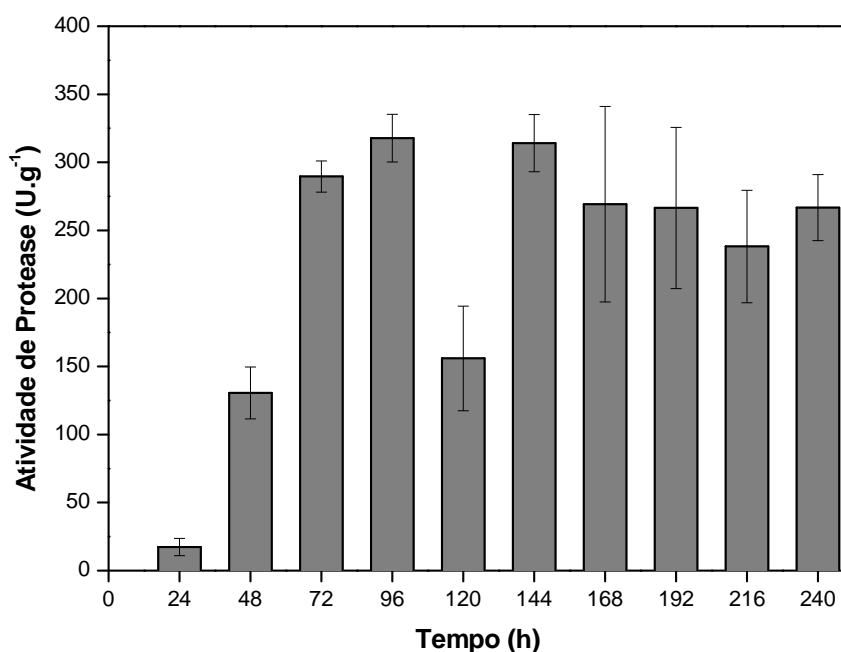


Figura 13 - Produção de proteases testando o período de incubação.

A Figura 13 mostra o perfil fermentativo durante 240 horas de fermentação avaliando a influência do tempo de incubação do fungo na produção de proteases, observa-se

que a produção máxima de proteases ocorre no tempo de 96 horas (336 U.g^{-1}) e uma queda na produção em 120 horas de fermentação.

Sandhya *et al.* (2005) compararam a produção de proteases por *A. oryzae* NRRL 1808 por fermentação semi-sólida e submersa, e ambos os processos observou que após 72 horas mostrou um rápido declínio no rendimento da enzima.

5.2.7 Influência da suplementação do meio com fontes de carbono

Após a etapa de estudo da influência do tempo de fermentação, onde observou que a maior produção de proteases ocorreu em 96 horas, nesta etapa analisou-se a influência da suplementação de fontes de carbono apenas no tempo de 96 horas de fermentação. A produção de proteases no meio suplementado foi comparada ao meio controle, este foi realizado com as melhores condições determinadas nas etapas anteriores (utilizando a linhagem *A. oryzae* IV, volume de água adicionada ao substrato de 40 mL, temperatura de incubação de 20°C e concentração de inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato, porém sem adição de fontes de nitrogênio).

A Figura 14 mostra os resultados dos meios suplementados com diferentes fontes de carbono (sacarose, glicerol e glicose), estas em diferentes concentrações (1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 % em relação ao meio sólido) e a fermentação sem adição de fonte de carbono. Os meios suplementados com glicerol apresentaram produção crescente até a concentração de 5%, em concentrações acima de 5% verificou-se uma queda na produção, podendo ter ocorrido uma inibição nestas concentrações para a produção de proteases. A maior produção da enzima nos meios suplementados com sacarose ocorreu na concentração de 7,5% com atividade de 385 U.g^{-1} . No meio com adição de glicose na concentração de 1% obteve-se produção de 351 U.g^{-1} de proteases, já nas concentrações entre 2% e 5% apresentaram uma leve queda na produção. Porém, as concentrações acima de 5% de glicose apresentaram um perfil crescente de produção. No meio sem suplementação de fontes de carbono (controle) obteve-se 350 U.g^{-1} de atividade enzimática.

A maior produção ocorreu nos meios com adição de glicose na concentração de 7,5% obtendo 452 U.g^{-1} . Os resultados mostram a adição de glicose com fonte de carbono influenciou positivamente na produção da enzima.

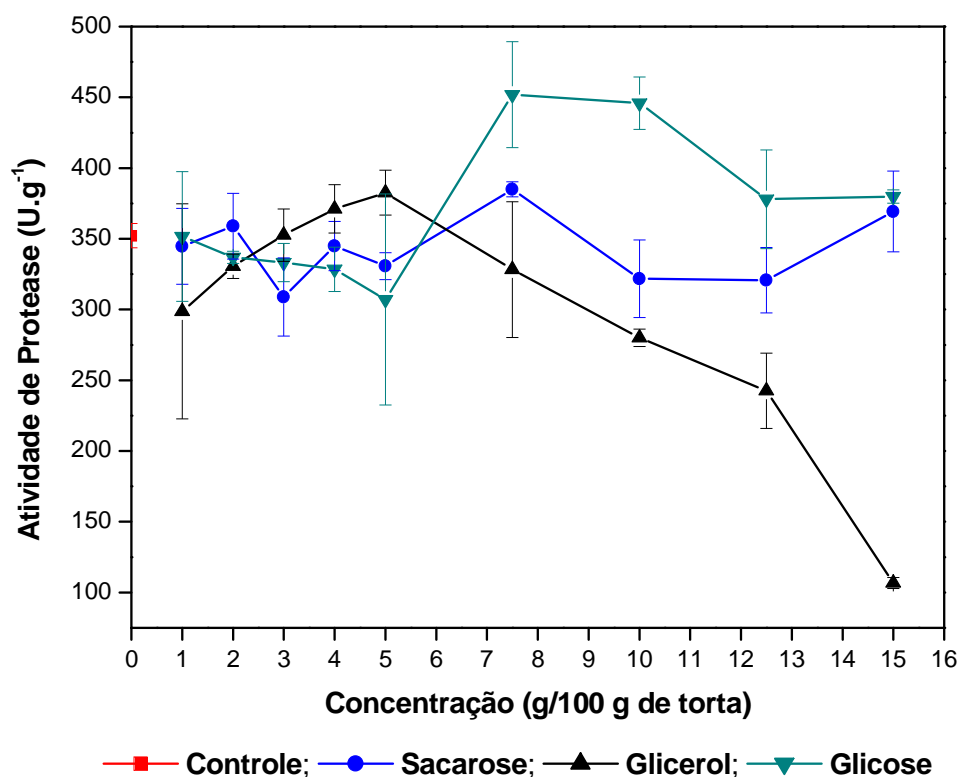


Figura 14 - Produção de proteases com adição de fontes de carbono.

5.2.8 Caracterização da torta de canola durante o processo fermentativo

Nesta etapa realizou-se experimento em triplicata para analisar as características físico-químicas durante todo o período fermentativo nas melhores condições obtidas, porém sem suplementação de nutrientes ao meio.

A Figura 15 mostra o crescimento do fungo na torta de canola durante o período fermentativo, na etapa de caracterização. Em 24 horas o aspecto do meio é muito próximo do aspecto do meio em 0 hora, uma vez que o microrganismo está adaptando-se as condições do

meio. O meio no tempo de 48 horas é possível observar uma mudança na coloração, já em 72 e 96 horas o aspecto do meio muda, sendo visível o crescimento do microrganismo, mudando a coloração do meio.

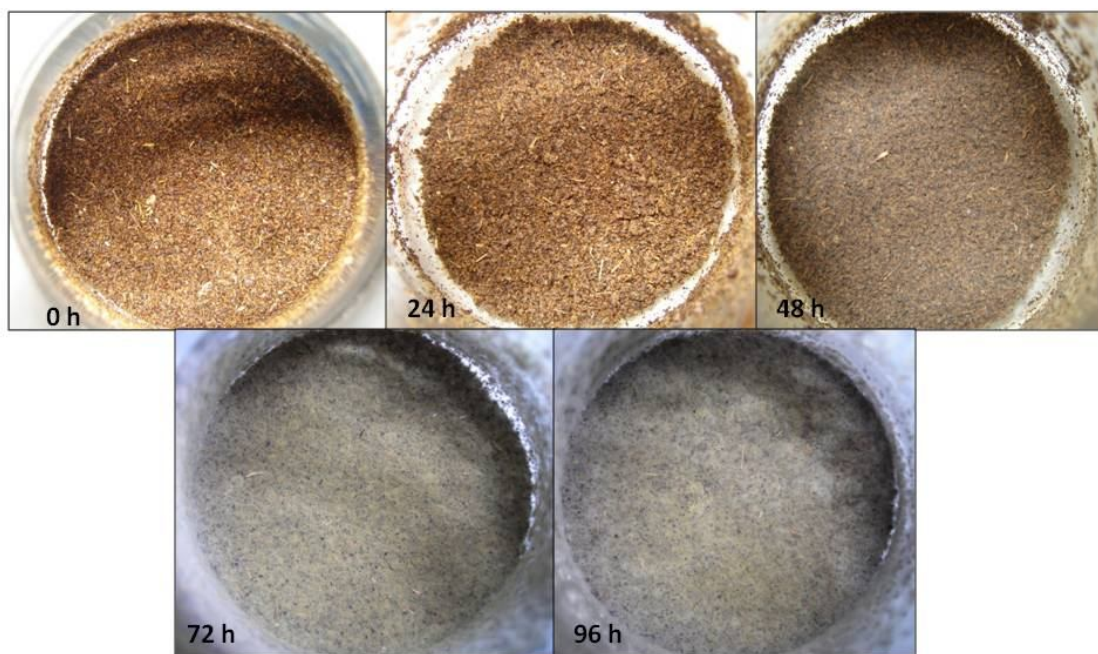


Figura 15 – Imagens dos meios inoculados ao longo do processo fermentativo.

Na Tabela 10 são apresentados os valores obtidos nos tempos de 0 a 96 horas, com amostragem a cada 24 horas. A atividade de proteases apresentou um pico de produção no tempo de 72 horas, obtendo valor máximo de aproximadamente 270 U.g^{-1} , e em 96 horas observou-se uma queda na produção. Analisando o perfil do pH do meio ao longo do processo fermentativo, pode-se afirmar que houve um leve aumento, apresentou valor de 5,93 em 0 h e 7,0 em 96 horas, este aumento pode está relacionado as características da protease produzida pelo fungo em estudo. Houve uma diminuição nos valores de umidade e consequentemente na atividade de água no intervalo de 0 h a 96 h. A concentração de amido também foi diminuída ao longo do tempo, sendo utilizado para formação da biomassa microbiana. Houve uma

redução no teor de proteína durante o processo, 0 h apresentou valor de 49,05% e em 96 h de 42,08%, sendo utilizado pelo microrganismo para crescimento e formação da enzima.

Tabela 10 – Caracterização do meio durante o processo fermentativo.

Parâmetros									
Tempo (h)	Atividade de proteases	pH	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídeos	Amido	Carboidratos Totais ¹	A _w
0	0	5,93	38,07±0,02	7,31±0,03	49,05±0,31	1,17	4,35	42,47	0,967
24	22,0	5,87	35,04±0,06	6,92±0,01	46,74±0,34	0,92	2,93	45,41	0,952
48	191,18	6,11	36,26±0,35	7,53±0,25	47,62±0,41	2,02	2,56	42,83	0,948
72	269,56	6,61	35,37±0,12	7,84±0,06	41,72±0,04	1,06	2,01	49,38	0,943
96	237,6	7,06	35,41±0,89	7,40±1,09	42,08±0,08	2,29	1,55	48,23	0,939

¹ Carboidratos totais = 100 – (Extrato Etéreo + Proteína + Cinzas). Valores foram obtidos a partir da média de 3 amostras e determinados em base seca.

6. CONCLUSÕES

- O *Aspergillus oryzae* IV foi a linhagem que apresentou maior capacidade de produção de proteases, dentre as linhagens testadas.
- A variação da adição de água na torta influenciou na produção de proteases, sendo 40 mL em 100 g de torta a melhor proporção adicionada.
- A temperatura ótima para a incubação de *A. oryzae* IV para a produção de proteases foi de 20°C.
- A concentração de inóculo influenciou na produção de proteases. A melhor concentração para produção da enzima foi 10^7 esporos.g⁻¹ de meio.
- A adição de fósforo ao meio não apresentou influência na produção de proteases.
- A adição de fontes de nitrogênio apresentou influência positiva na produção de proteases, sendo o extrato de levedura a melhor fonte de nitrogênio suplementar, seguida de nitrato de sódio.
- O melhor período de fermentação para produção de proteases foi 96 horas, maiores períodos de fermentação não influenciou na produção da enzima.
- A adição de glicerol e glicose aumentaram a síntese de protease, sendo 5,0 e 7,5% as melhores concentrações adicionadas, respectivamente.
- A maior produção de proteases obtida foi de 452 U.g⁻¹ em 96 horas de processo fermentativo, nos meios suplementados com 7,5% de glicose.
- A torta de canola mostrou ser um substrato apropriado para produção de proteases nas condições fermentativa estudadas.

7. PERSPECTIVAS

- Estabelecer um processo de seleção de linhagens de *Aspergillus oryzae* direcionado para a produção de proteases.
- Avaliar a adição simultânea de fonte de nitrogênio e carbono.
- Testar diferentes tortas para serem utilizadas como substrato para produção de proteinases.
- Otimização das condições de extração da enzima.
- Aplicar as condições otimizadas no processo de fermentação em Erlenmeyer para um reator de coluna.
- Estudar aspectos referentes aos tratamentos finais do processo como caracterização e recuperação da enzima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, G. A. **Obtenção e Caracterização Físico-Química do Biodiesel de Canola (*Brassica napus*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.

ANTUNES, J. M. **Canola traz oportunidades para o Brasil**. Embrapa Sede, 2008. Disponível: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/marco/1asemana/canolatraz-oportunidades-para-o-brasil/canola>. Acesso: 25 de Outubro de 2008.

(AOAC) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**, 11. ed. Washington, p.1115, 1992.

(AOAC) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**, 12. ed. Whashington, DC, p.1094, 1975.

BANERJEE, R., MUKHERJEE, G., PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 949–953, 2005.

BATTAGLINO, R. A.; HUERGO, M.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 292-296, 1991.

BIODIESELBR. **Governo prepara plano de incentivo à produção de canola**. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel>. Acesso em: 04 de Dezembro de 2008.

BOMMARIUS, A. S; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis**: Fundamentals and application. Atlanta: Wiley-VCH. 2004

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v.170, n. 23, p. 501-505, 1947.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, D.B. **Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro- FAPERJ: EPUB, p. 8, 2008.

COURI, S.; MERCÊS, E. P; NEVES, B. C. V.; SENNA, L. F. Digital image processing as a

tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. **Journal of Microscopy**, v. 224, p. 290-297, 2006.

DÁLIA, W. S. A produção do biodiesel: uma perspectiva para a agroenergia no Nordeste brasileiro. In: **O Futuro da Indústria: Biodiesel - Coletânea de Artigos**, Brasília, p. 75-76, 2006.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v. 2, 2001.

DONG, M.; WALKER T. H. Production and recovery of polyunsaturated fatty acids-added lipids from fermented canola. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8504–8506, 2008.

DUTRA, J. C. V. **Produção de Lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através de Fermentação em Estado Sólido para a Síntese de Biodiesel**. Engenharia Química. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

EL-BATAL, A.I.; KAREM, H. A. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. **Food Research International**, v. 34, p. 715–720, 2001.

EBUNE, A.; ASHEH, S.; DUVNJAK, Z. Production of Phytase during Solid State Fermentation using *Aspergillus Ficum* NRRL 3135 in Canola Meal. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 7-12, 1995a.

EBUNE, A.; ASHEH, S.; DUVNJAK, Z. Effects of Phosphate, Surfactants and Glucose on Phytase Production and Hydrolysis of Phytic Acid in Canola Meal by *Aspergillus ficuum* during solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 241-247, 1995b.

ELIBOL, M.; MOREIRA, A. R. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1951–1956, 2005.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 04 de Dezembro de 2008.

GARCÍA-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, 2009.

GEORGE, S.; RAJU, V.; SUBRAMANIAN, T.V.; JAYARAMAN, K. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 381–382, 1997.

GOMES, C. A. O., **Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8**. 1995. Dissertação (Mestrado em ciência de alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1995.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**; v. 19, n. 20, p. 489–98, 2002.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**. v. 12. p. 787–791, 1998.

(IAL) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 4 ed. São Paulo, v. 1, p. 21-43, 2004.

LAXMAN, R.S; SONAWANE, A.P.; MORE, S.V.; RAO, B.S.; RELE, M.V.; JOGDAND, V. V.; DESHPANDE, V.V.; RAO, M.B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochemistry**; v. 40, p. 3152–3158, 2005.

LESKOVAC, V. **Comprehensive Enzyme Kinetics**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2003.

LI, Z. J.; SHUKLA, V; FORDYCE, A. P.; PEDERSEN, A. G.; WENGER, K. S.; MARTEN, M. R. Fungal Morphology and Fragmentation Behavior in a Fed-Batch *Aspergillus oryzae* Fermentation at the Production Scale. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 3, 2000.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. ; SCHIMIDELL, W. **Coleção Biotecnologia Industrial**. v. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos, Edgard Blücher LTDA, São Paulo, p. 351-376, 2001.

LORA, E.S.; ANDRADE, R.V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 2008.

MACCHIONE, M. M.; MERHEB, C. W.; GOMES, E.; SILVA, R. Protease Production by Different Thermophilic Fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.146. p. 223–230, 2008.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R.; Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-state fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57. p. 712-716, 1991.

MCT. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Aspectos tecnológicos do biodiesel**. Grupo de trabalho internacional – biodiesel. Brasília, 2005. Disponível em: <<https://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 14 de Novembro de 2008.

MEIRA, J. A.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Aproveitamento de Resíduos Sólidos da Cadeia Produtiva do Biodiesel para Produção de Biosurfactantes. **In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, 2007, Brasília. Aproveitamento de Resíduos Sólidos da Cadeia Produtiva do Biodiesel para Produção de Biosurfactantes, 2007.

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

MOURÃO, D. S.; PINTO, G. A. S.; SOARES, L.S. Síntese de exo-poligalacturonase por *Aspergillus niger* CNPAT 001 por fermentação semi-sólida de casca e torta de mamona. **In: XV Simpósio nacional de Fermentações, (SINAFERM)**, 2005, Recife. Anais. Recife: PE, 2005.

MURAKAMI, K.; ISHIDA, Y.; MASAKI, A.; TATSUMI, H. MURAKAMI, S.; NAKANO, E.; MOTAI, H.; KAWABE, H.; ARIMURA, H. Isolation and Characterization of the Alkaline Protease Gene of *Aspergillus oryzae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2807-2811, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, p. 192, 2004.

NERY, I. A.; FERNANDEZ-FERREIRA, EDMIR.; TEIXEIRA, R. C.; ALVARENGA, A. S.; PINTO, J. C.; PINTO, G.S. Produção de Celulase em Fermentação em Meio Sólido Utilizando o “Pó” Da Casca do Côco Verde em Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio.

In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2007, Curitiba. Anais. Curitiba: PR, 2007.

NISHIO, N.; TAI, K.; NAGAI, S.; Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 263–70, 1979.

OLIVEIRA, K.; FURTADO, C. E. Digestibilidade Aparente de Dietas com Diferentes Níveis de Farelo de Canola para Cavalos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, 181-186p., 2001.
PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, 81-84 p., 2003.

PANDEY, A. Solid state fermentation - an overview. Em: A. Pandey, Editor, Solid state fermentation. **Wiley Eastern Limited**, New Delhi, 3-10p., 1994.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77. p. 149–162, 1999.

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.

PERES, J. R.R; BELTRÃO, N. E. M. Oleaginosas para biodiesel: situação atual e potencial. **In: O Futuro da Indústria:Biodiesel - Coletânea de Artigos**. Brasília, p. 75-76, 2006. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ofuuturodaindustria-Biodiesel.pdf>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2009.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 208 p. 2003. Tese (Doutorado - Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L.P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Embrapa Agroindústria Tropical, (Comunicado Técnico nº 102). Fortaleza. 2005.

PLÀ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, 30. p.179-190, 2002. Disponível em: <http://www.diritto.it/archivio/1/25063.pdf>.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S.K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000–2009, 2007.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus sp.* using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1749–1754, 2005.

RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K.; Critical importance of moisture content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M 27 in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 501–505, 1990.

RAO, M.B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, 2007.

SANCHEZ, V.E.; PILOSOFF, A.M.R. Protease-conidia relationships of *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1629-1633, 2000.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; PANDEY, A. Proteases. In: **Enzyme Technology**, PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (eds), Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, p. 319-332, 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.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 2009.

SOARES, V. F.; CASTILHO, L. R.; BON, E. P. S.; FREIRE, D. M. G. (2003), Análise Comparativa da Produção de Protease por *Bacillus subtilis* por Fermentação Submersa e no Estado Sólido. In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos XIV**, Florianópolis, UFSC. Anais. Florianópolis: SC. 2003.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, P.; 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.

THYS, R.C.S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium sp.* kr10**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola), Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: UFRGS, p.114, 2004.

TOMM, G. O. Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento online 26 Embrapa Trigo**. 2005. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm.

TOMM, G.O. Canola: alternativa de renda e benefícios par os cultivos seguintes. **Revista Plantio Direto**, v. 15, n. p. 94-98, 2006.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1553-1558, 2003.

VARGAS, G. D. L. P.; **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim: URI, p. 98, 2004.

VISHWANATHA, K.S.; RAO, A.G. A.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.070. 2008.

ZANDRAZIL, F.; BRUNERT, H. Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 83–88, 1981.

WANG, R.; LAW, R. C. S.; WEBB, C. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 217–227, 2005.