



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

**ADRIANA CRISPIM DE FREITAS**

**PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO PROTEOLÍTICO POR *Aspergillus*  
*oryzae* CCBP001 EM REATOR INSTRUMENTADO POR FERMENTAÇÃO SEMI-  
SÓLIDA**

**FORTALEZA**

**2013**

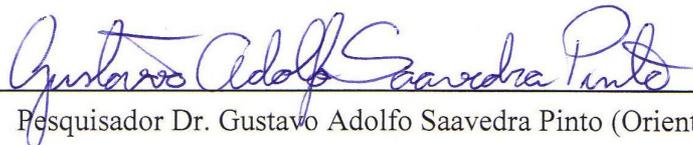
ADRIANA CRISPIM DE FREITAS

PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO PROTEOLÍTICO POR *Aspergillus oryzae*  
CCBP001 EM REATOR INSTRUMENTADO POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Tese apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 25/02/2013

BANCA EXAMINADORA



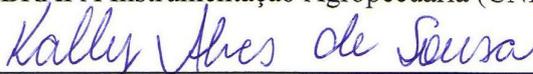
Pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)

EMBRAPA Agroindústria Tropical (CNPAT)



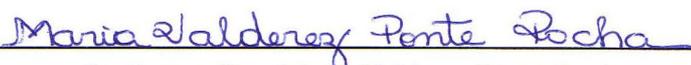
Pesquisadora Dra. Cristiane Shachez Farinas

EMBRAPA Instrumentação Agropecuária (CNPDIA)



Pesquisadora Dra. Kally Alves de Sousa

EMBRAPA Agroindústria Tropical (CNPAT)



Professora Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Professora Dra. Sueli Rodrigues

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- F936p Freitas, Adriana Crispim.  
Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* ccbp001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida . / Adriana Crispim Freitas. – 2013.  
115 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.  
Orientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.
1. Protease 2. Reator de colunas. 3. Erlenmeyer. 4. Secagem por atomização.  
5. Estocagem. I. Título.

*A DEUS, que nos conduz passo a passo  
com sabedoria, que me guiou e me deu coragem  
para enfrentar tantas barreiras e estar aqui hoje.*

*A minha Família, Amigos e Professores.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por me dar força para superar as dificuldades e desafios, sem medo de tropeçar.

À UFC, pela oportunidade de realizar minha formação acadêmica nesta instituição de ensino.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo privilégio de utilizar suas dependências e equipamentos durante anos e determinante na minha vida profissional.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária, pelo privilégio de utilizar suas dependências e equipamentos durante a realização da principal etapa dos experimentos do doutoramento.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Orientador Dr. Gustavo, pelo aprendizado constante, dedicação, confiança, amizade e oportunidade. Obrigada por tudo!

À Dra. Cristiane, por aceitar a participação na banca de defesa, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pela ajuda e apoio, por não medir esforços para me ajudar ao longo da etapa de produção da enzima em reator de colunas, obrigada por enriquecer meu trabalho e contribuir para o meu crescimento profissional.

Às Professoras, Dra. Sueli e Dra. Valderez, pela participação na banca de qualificação e defesa, pela dedicada correção.

À Dra. Kally, por aceitar participar da banca de defesa, pela dedicada atenção em tirar dúvidas pontuais que enriqueceram o trabalho.

Aos Professores Doutores Fabiano e Luciana, por auxiliar em dúvidas e esclarecimentos relacionados ao programa de pós-graduação, auxiliando de forma rápida e precisa.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus pais Maurício e Maria do Socorro, pelo amor imenso, infinita sabedoria, dedicação e exemplo.

À minha querida irmã Ana Maria pelo apoio e incentivo desde a infância, que compartilha alegria e dificuldade e sempre acreditando nos meus projetos.

Aos meus queridos irmãos Manuel, pelo seu imenso coração, Mauricélia, Socorro Maria e Eliene pelo carinho e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa: Ana Paula, Andréa, Carina, Carol, Cyntia, Diego, Genilton, Helder, Janaína, Leise, Luciana, Manuela, Mariza, Natália Lima, Natália Moura, Rakel, Renata Débora e Virna, por todos os momentos de felicidade e apoio constante!

Ao amigo Ruann, pela ajuda, amizade e troca de experiência.

À amiga Maria, pela ajuda, amizade, troca de experiência e descontração.

À amiga Flaubênia, pela ajuda constante nos momentos difíceis, pelo bom humor e energia positiva que carrega consigo.

À amiga Ticiania, por alegrar nos momentos difíceis, pela ajuda constante e pela amizade.

À amiga Ursula, pela recepção em São Carlos, pela dedicação e esforço para encontrar um local para morar e pela troca de experiência.

Ao amigo Rafael, pela ajuda e pela troca de experiência.

Aos colegas do laboratório de Agroenergia da Embrapa: Camila, Gabriel, Fernanda, Rodrigo e Fellipe.

À Gabriela, pela boa convivência no dia-a-dia no laboratório de Agroenergia/CNPDI, pela ajuda e descontração.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

A produção de enzimas por fermentação semi-sólida (FSS) é influenciada por diversos fatores de cultivo que afetam o crescimento microbiano e a produção de metabólitos. O estudo de fatores como aeração e umidade do ar torna-se indispensável para a otimização deste bioprocessamento. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de protease pelo fungo *Aspergillus oryzae* CCBP001 por FSS em biorreator de colunas. A FSS para a produção de protease utilizando o fungo filamentosso *A. oryzae* CCBP 001 ocorreu em condições dinâmicas e estáticas, visando observar o método que apresentou a maior produção. Para tanto foram testados os resíduos agroindustriais: torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da amêndoa de caju e farelo de algodão como substrato, observando o perfil de produção em função de diferentes atividades de água ( $A_w$ ) iniciais obtidas pela adição de distintos volumes de água para umidificação. A produção de protease em reator de colunas nas condições otimizadas foi comparada com a produção em Erlenmeyer, durante dez dias. Foram avaliados procedimentos para recuperar, identificar, concentrar, e estocar o extrato enzimático produzido. Para a concentração do extrato enzimático produzido realizou-se estudo de secagem em "spray dryer" e acompanhou-se o tempo de estocagem do extrato seco durante 90 dias. Com os resultados foi possível selecionar a torta de canola como o substrato onde apresentou uma produção 33% superior aos demais substratos testados. No estudo das condições operacionais em reator de colunas foi possível avaliar a influência da vazão do ar, umidade relativa do ar e umidade do substrato na produção de protease. A utilização de glicose, maltodextrina e carboximetilcelulose como adjuvantes se mostraram eficientes com relação à manutenção da atividade de protease durante o processo de secagem utilizando "spray dryer", onde foi possível obter um produto seco com baixos valores de umidade e  $A_w$ , importante para o processo de estocagem do extrato enzimático. A secagem por atomização do extrato enzimático possibilitou concentrar e estocar a enzima.

**Palavras-chave:** Protease, reator de colunas instrumentado, Erlenmeyer, secagem por atomização, estocagem do extrato proteolítico.

## ABSTRACT

Enzyme production by solid state fermentation (SSF) is influenced by several factors that affect crop growth and production of microbial metabolites. The study of factors such as aeration and moisture in the air becomes indispensable for this bioprocess optimization. In this context, the present study aimed to assess the protease production by *Aspergillus oryzae* CCBP001 by FSS bioreactor columns. The FSS for the production of protease using the filamentous fungus *A. oryzae* CCBP 001 occurred in dynamic and static conditions in order to observe the method with the highest production. Therefore, tested the agroindustrial waste: canola cake, sunflower cake, wheat bran, almond cashew film and cottonseed meal as substrate, observing the production profile for different water activity ( $A_w$ ) obtained by initial adding different volumes of water for humidification. Protease production in reactor columns in the optimized conditions was compared to production in flasks for 10 days. Evaluated procedures to recover, identify, focus and store the enzyme extract produced. For the concentration of the enzyme extract produced a study was conducted in dry "spray dryer" and followed up the storage time of the dry extract for 90 days. From the results it was possible to select the canola cake as the substrate where it presented a production 33% higher than the other substrates tested. In the study of operating conditions in reactor columns was possible to evaluate the influence of air flow, air humidity and substrate moisture in protease production. The use of glucose, maltodextrin and carboxymethylcellulose as adjuvants proved to be efficient with regard to maintenance of protease activity during the drying process using a "spray dryer", where it was possible to obtain a dry product with low values of humidity and  $A_w$  important for the storage process of enzyme extract. Spray drying of the enzyme extract and concentrate stockpile allowed the enzyme.

**Keywords:** Protease, reactor columns instrumented, Erlenmeyer, spray drying, storage proteolytic extract.

## LISTA DE GRÁFICOS

Figura 2.1	Classificação dos biorreatores de FSS em função das características de aeração e agitação.....	34
Figura 3.1	Câmara de Neubauer usada para a contagem de esporos.....	44
Figura 3.2	Fluxograma de obtenção do extrato enzimático proteolítico em cada experimento.....	46
Figura 3.3	Foto ilustrativa do biorreator de colunas utilizado nas FSS.....	48
Figura 3.4	Desenho esquemático do “spray dryer”.....	56
Figura 4.1	Aw nos diferentes substratos frente à adição de água.....	62
Figura 4.2	Efeito da adição de água sobre a síntese de protease.....	63
Figura 4.3	Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de protease.....	65
Figura 4.4	Atividade proteolítica em função do tempo de fermentação em meio torta de canola (■ - controle), torta de canola suplementada com 1% de extrato de levedura (▲) e torta de canola suplementada com 7,5% de glicose (●).....	68
Figura 4.5	Colunas com meio fermentados em diferentes condições de fluxo de ar, umidade do ar e umidade do substrato.....	72
Figura 4.6	Evolução de CO <sub>2</sub> durante a FSS em diferentes condições de umidade inicial do substrato e umidade relativa do ar.....	73
Figura 4.7	Superfície de resposta da atividade de protease etapa de otimização em colunas.....	78
Figura 4.8	Cinética fermentativa da produção de protease em reator de colunas (vazão do ar de 12 mL/min e umidade relativa do ar 100%) e frascos Erlenmeyers com 30% de umidade inicial do substrato e temperatura de incubação de 20 °C.....	80
Figura 4.9	Evolução de CO <sub>2</sub> durante a FSS nas condições de umidade inicial do substrato de 30%, vazão do ar de 12 mL/min e 100% de umidade relativa do ar.....	82
Figura 4.10	Análise zimograma de gelatina feita por electroforese em gel SDS-PAGE em extrato bruto de <i>A. oryzae</i> CCBP 001 liofilizados.....	84
Figura 4.11	Análise de SDS-PAGE de extrato de protease precipitados do com sulfato de amônio, dialisados e liofilizados, volume de 80 µL.....	86

Figura 4.12	Avaliação preliminar das condições de secagem do extrato enzimático proteolítico sem adição de adjuvante (controle), com adição de 1% de glicose, 0,04% de Carboximetilcelulose e 0,5% de maltodextrina DE 5.....	88
Figura 4.13	Diagrama de Pareto com efeito das variáveis glicose ( $X_1$ ), maltodextrina ( $X_2$ ) e CMC ( $X_3$ ) e suas interações sobre a produção de protease.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial $2^3$ .....	51
Tabela 3.2	Codificação e distribuição das variáveis utilizadas no DCCR.....	51
Tabela 3.3	Valores das variáveis independentes utilizadas no delineamento fatorial completo $2^3$ na etapa do estudo de secagem do extrato enzimático.....	57
Tabela 4.1	Matriz experimental com os valores das variáveis independentes e variável resposta para a produção de protease utilizando torta de canola como substrato.....	69
Tabela 4.2	Efeitos dos valores estudados no planejamento $2^3$ sobre a atividade de protease .....	70
Tabela 4.3	Matriz do DCCR com variáveis reais e codificadas, valores preditos pelo modelo e desvios relativos para a atividade de protease e variável resposta da estimativa de biomassa.....	71
Tabela 4.4	Resultados dos coeficientes de regressão, valores de t e p-valor do DCCR.....	75
Tabela 4.5	ANOVA do modelo quadrático para a predição da atividade de protease (U/g) e estimativa de biomassa (mg/g) variando a umidade relativa do ar e a umidade do substrato.....	76
Tabela 4.6	Comparação entre as médias da atividade de protease (U/g) nas diferentes faixas de pH da extração da enzima e do tampão diluente da azocaseína utilizado na determinação da atividade enzimática.....	77
Tabela 4.7	Atividade coagulante no leite das frações obtidas na precipitação.	89
Tabela 4.8	Avaliação preliminar das condições de secagem do extrato enzimático proteolítico sem adição de adjuvante (controle), com adição de 1% (m/v) de glicose, 0,04% (m/v) de Carboximetilcelulose e 0,5% (m/v) de maltodextrina DE 5	91
Tabela 4.9	Planejamento fatorial $2^3$ com atividade da protease no tempo de zero hora de estocagem do extrato enzimático seco (U/g).....	92

Tabela 4.10	Coeficientes de regressão estimados, erro padrão, teste t-Student e $p$ valor para atividade proteolítica após secagem utilizando planejamento fatorial $2^3$ completo.....	93
Tabela 4.11	Análise de variância para atividade proteolítica do planejamento experimental fatorial $2^3$ .....	94
Tabela 4.12	Valores de umidade e $A_w$ no tempo de 0h de secagem do extrato enzimático dos ensaios do planejamento fatorial $2^3$ .....	96
Tabela 4.13	Atividade de protease no tempo de 0 hora e atividade residual (%) dos extratos secos por atomização durante 90 dias de estocagem a 28 °C.....	98

## QUADROS

Quadro 2.1 Desenvolvimentos dos modelos de fermentadores na FSS.....	35
Quadro 2.2 Aplicações da Fermentação semi-sólida.....	40

## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
$C_s$	Concentração inicial de esporos desejada (esporos/g de substrato)
$F$	Fator de diluição
$G$	Concentração de glicosamina por meio fermentado seco
$G^*$	Concentração de glicosamina calculada pela curva padrão
$\Sigma$	Soma da contagem de esporos em 5 quadrantes da Câmara de Neubauer
$M$	Molar
$M_s$	Massa de substrato
$V_{cam}$	Volume da câmara de Neubauer

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE GRÁFICO.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELA.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE QUADRO.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Enzimas proteolíticas.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Fontes de obtenção das proteases.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1 Proteases vegetais.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2 Proteases Animais.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3 Proteases microbianas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Aplicação Industrial das proteases.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1 Proteases aplicadas na produção de detergentes.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2 Proteases aplicadas em alimentos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.3 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.4 Proteases aplicadas na indústria de cosmético.....</b>	<b>28</b>

2.3.5	Proteases aplicadas na indústria de couro.....	30
2.4	Fermentação semi-sólida.....	31
2.4.1	Micro-organismos utilizados na FSS.....	32
2.2.1.1	<i>Aspergillus oryzae</i> .....	33
2.4.2	Substratos.....	36
2.4.3	Biorreatores para FSS.....	36
2.4.4	Controle do processo.....	37
2.4.4.1	Atividade de água e Umidade.....	38
2.4.4.2	Temperatura e transferência de calor.....	38
2.4.4.3	pH.....	39
2.4.4.4	Aeração e Agitação.....	40
2.4.4.5	Aplicações da FSS.....	40
2.4.4.6	Vantagens do processo fermentativo semi-sólido.....	40
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	Micro-organismo.....	42
3.1.1	Conservação e ativação da linhagem.....	43
3.1.2	Preparo do inóculo em farelo de trigo.....	43
3.1.3	Inoculação do meio fermentativo .....	43
3.2	Substratos da FSS.....	45
3.3	Fermentação semi-sólida em frasco Erlenmeyers.....	47
3.3.1	Seleção do substrato para a síntese de protease.....	47

3.3.1.1	Adição de diferentes volumes de água.....	47
3.3.1.2	Temperatura de incubação.....	48
3.3.2	Suplementação do substrato com fonte de carbono e nitrogênio....	48
3.4	Fermentação semi-sólida em biorreator de coluna instrumentado...	48
3.4.1	Metodologia de experimentos para a FSS em biorreator de colunas.	49
3.4.2	Obtenção dos Extratos Enzimáticos.....	50
3.4.3	Análise Respirométrica.....	50
3.4.4	Planejamento Experimental.....	50
3.4.4.1	Avaliação das condições operacionais e umidade do substrato.....	50
3.4.4.2	Otimização das condições operacionais da FSS.....	51
3.5	Cinética da fermentação.....	52
3.6	Purificação parcial do extrato enzimático.....	52
3.6.1	Precipitação do extrato enzimático com sulfato de Amônio.....	52
3.6.2	Liofilização do extrato enzimático.....	53
3.7	Determinações da atividade enzimática.....	53
3.7.1	Atividade enzimática de protease.....	53
3.7.2	Atividade de coagulação do leite pelo extrato enzimático proteolítico.....	54
3.8	Estudo do efeito do pH na atividade proteolítica.....	54
3.8.1	pH.....	54
3.9	Zimografia.....	54

<b>3.10</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida.....</b>	<b>55</b>
<b>3.11</b>	<b>Estudo da secagem do extrato enzimático por atomização utilizando “spray dryer” .....</b>	<b>55</b>
<b>3.11.1</b>	<b>Equipamento.....</b>	<b>56</b>
<b>3.11.2</b>	<b>condições de secagem.....</b>	<b>56</b>
<b>3.11.3</b>	<b>Adjuvante utilizados na secagem.....</b>	<b>56</b>
<b>3.12</b>	<b>Avaliação do tempo de estocagem do extrato atomizado.....</b>	<b>57</b>
<b>3.13</b>	<b>Métodos Analíticos.....</b>	<b>57</b>
<b>3.13.1</b>	<b>Determinação da Umidade.....</b>	<b>57</b>
<b>3.13.2</b>	<b>Determinação da atividade de água (Aw).....</b>	<b>58</b>
<b>3.13.3</b>	<b>Determinação de proteína total no extrato enzimático.....</b>	<b>58</b>
<b>3.13.4</b>	<b>Acompanhamento estimativo da produção de biomassa.....</b>	<b>58</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção do substrato.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Avaliação das proporções de água adicionada ao substrato.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Avaliação da temperatura de incubação.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Suplementações dos meios com fonte de carbono e nitrogênio inorgânico.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>FSS em biorreator de coluna instrumentado e frascos Erlenmeyers.</b>	<b>67</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Seleção das variáveis.....</b>	<b>68</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Delineamento composto central rotacional (DCCR).....</b>	<b>69</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Cinética fermentativa e acompanhamento de CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>74</b>

4.4	Estudo do pH de extração da enzima e de determinação da atividade enzimática proteolítica.....	80
4.5	Determinações de massa molar do extrato enzimático proteolítico..	83
4.5.1	Zimografia.....	85
4.5.2	Determinação da massa molar da protease produzida por <i>A. oryzae</i>	86
4.6	Determinação da atividade de coagulação do leite pelo extrato enzimático.....	88
4.7	Secagem do extrato enzimático.....	89
4.7.1	Testes iniciais de secagem.....	90
4.7.2	Planejamento experimental.....	91
4.7.3	Estudo da estocagem do extrato proteolítico seco por atomização...	95
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	99
5.1	Conclusões.....	99
5.2	Sugestões.....	101
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
A	Anexos.....	113
B	Anexos.....	114

# **1** **Introdução**

## **1. INTRODUÇÃO**

Enzimas têm sido usadas por centenas de anos. Apresentam no cenário mundial um crescente aumento nas vendas ao longo dos anos. A indústria mundial de enzimas teve um faturamento de US\$ 1,5 bilhão em 1998, US\$ 1,8 bilhão em 2002 e 2,8 bilhões em 2009 (KOBLOITZ, 2010). Segundo Novozymes (2012), 2010 foi um ano muito forte a partir de uma perspectiva de vendas, a alta demanda no negócio de enzimas resultou em crescimento de 12% nas vendas em relação a 2009 apresentando um faturamento de 3,4 bilhões, os setores industriais responsáveis pelo crescimento de vendas no mercado mundial de enzimas foram as indústrias de detergentes, biocombustíveis e tecnologia de alimentos.

Dentre os setores que se beneficiam da tecnologia enzimática estão às indústrias de alimentos, processamento de fibras naturais, papel e celulose, produção de fármacos e o de tratamento de efluentes industriais. Atualmente, fabricantes de alimentos e bebidas estão enfrentando uma demanda crescente por produtos de qualidade, com menos aditivos e conservantes. E as enzimas desempenham um papel fundamental em trazer o alimento mais nutritivo e atraente, utilizando uma tecnologia limpa (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

As características dos processos enzimáticos e a biodegradabilidade dos seus efluentes atendem às exigências das normas ISO, que estabelecem padrões de qualidade dos produtos, orientam-se as características dos processos de produção e dão ênfase ao menor consumo energético e ao baixo impacto ambiental (POLITZER e BON, 2006).

As enzimas proteolíticas representam 60% do mercado mundial de venda de enzimas, são aplicadas em diversos ramos industriais como, a indústria de detergente, alimentos, couro, têxteis, óleos e gorduras, cosméticos, papel e farmacêutica (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011; MOFTAH *et al.*, 2012).

Industrialmente uma das principais fontes produtoras de enzimas são os micro-organismos. Estes são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matéria-prima pouco dispendiosa como os resíduos agroindustriais (SHARNA, CHISTI e BANERJEE, 2001; POLITZER e BON, 2006).

O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos extratos enzimáticos microbianos uma vez que é inigualável a quantidade e variedade de produtos naturais, incluindo a notável biodiversidade microbiana a ser estudada, para aplicação imediata ou após melhoramento genético, visando à produção de enzimas por processos fermentativos, transformando resíduos em produtos úteis de maior valor agregado (ZIMMER *et al.*, 2009).

Os processos fermentativo semi-sólido utilizam como substratos resíduos da agricultura servindo estes como fontes de carbono e energia para produzir substâncias de alto valor agregado, sendo comparativamente mais compensadores em relação ao custo e à produtividade quando comparado com os processos submersos. Tem se mostrado vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos, justificando a maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa (FSm). Além disso, as enzimas produzidas pela FSS são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH, e menor volume de efluente produzido (HOLKER *et al.*, 2004).

Micro-organismos são utilizados na geração de diferentes produtos por processos fermentativos em função da facilidade de crescimento e adaptação em diferentes ambientes, diversidade bioquímica e manipulação genética. As bactérias, leveduras e fungos apresentam aplicação nos processos fermentativos semi-sólido. Porém, os fungos filamentosos destacam-se por apresentarem melhor capacidade de crescimento neste tipo de processo, possibilitado pelo modo de crescimento das hifas e sua tolerância a sistema com baixa atividade de água e alta pressão osmótica. Características que tornam os fungos eficientes e competitivos no processo de bioconversão de resíduos como excelentes substratos sólidos (KAPNOOR e MULIMANI, 2010). Entre os fungos de maior aplicação industrial incluem espécies de *Aspergillus* sp., como *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. nidulans*; *Trichoderma reesei* e *Mucor michie* (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Contudo, a FSS ainda apresenta dificuldades em sua aplicação em escala industrial devido à dificuldade de controle e monitoração das variáveis durante o processo, que ocorrem por causa da ausência de água livre, baixa condutividade térmica dos substratos sólidos e à baixa capacidade térmica do ar, que limitam a

remoção de calor produzido pelo crescimento do micro-organismo (FARINAS *et al.*, 2011).

Neste contexto, o presente estudo propõe a produção de proteases de *A. oryzae* CCBP 001 por fermentação semi-sólida e avaliar efeito das variáveis operacionais durante o processo. Para tal fim, inicialmente estudou-se a produção de protease utilizando tortas de canola, girassol, farelos de trigo, algodão, película da casca da castanha de caju como substrato na produção de enzimas proteolíticas. Posteriormente, utilizando a torta de canola, estudou-se o efeito da suplementação com glicose e extrato de levedura, a realização do processo fermentativo em reator de coluna instrumentado e frasco Erlenmeyer, mudança do pH de extração e determinação da enzima, purificação parcial do da protease e estudo secagem em “spray dryer” do extrato enzimático.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um bioprocesso para obtenção e recuperação de proteases de *Aspergillus oryzae* CCBP 001.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o potencial de diferentes resíduos e co-produtos agroindustriais como substratos na produção de enzimas proteolíticas no processo fermentativo semi-sólido.
- Avaliar o efeito da suplementação do meio com glicose e extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.
- Estudar os parâmetros operacionais da FSS utilizando reator de coluna instrumentado na produção de protease.
- Avaliar o efeito da mudança do pH de extração e na atividade enzimática proteolítica.
- Caracterizar parcialmente as proteases contidas no extrato enzimático.
- Realizar estudo de secagem por atomização e tempo de estocagem do extrato enzimático proteolítico.

**2**

# **Revisão Bibliográfica**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Enzimas proteolíticas**

Enzimas proteolíticas (EC 3.4) pertencem ao grupo de hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida (KOBBLITZ, 2010). Estudos demonstram que as proteases conduzem modificações seletivas específicas em proteínas e na maioria dos casos, a proteólise é direcionada e limitada à clivagem de ligações peptídicas específicas da proteína (BEYNON e BOND, 1996; RAO *et al.*, 1998).

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB) as enzimas proteolíticas classificam-se em seis grupos de acordo com o tamanho molecular, propriedades elétricas, com a sua especificidade ao substrato e modo de ação (BEYNON e BOND, 1996). São classificadas pelo modo de ação em exopeptidases (atuam nas extremidades da cadeia polipeptídicas) e endopeptidases (agem nas ligações no interior da cadeia protéica). As proteases exopeptidases dividem-se em: aminopeptidases, carboxipeptidases, serina-proteases, cisteína-proteases ou proteases sulfidrílicas, proteases aspárticas ou ácidas e metalo-proteases (KOBBLITZ, 2010).

As proteases executam diversas funções fisiológicas complexas, tendo como principal função biológica a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através da membrana. De maneira geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para conseqüente absorção pela célula, enquanto proteases intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998).

#### **2.1.1 Fontes de obtenção das proteases**

As proteases podem ser obtidas por fontes animal, vegetal e microbiana. As proteases originárias de plantas dependem de fatores como a disponibilidade de grande área de cultivo e condições climáticas, além do tempo de crescimento das plantas.

### **2.1.1.1 Proteases vegetais**

São muito utilizadas na indústria de alimentos e estão presentes em maior concentração em frutos verdes. A papaína, bromelina e a ficina estão entre as mais importantes cisteína-protease (WISEMAN, 1991).

### **2.1.1.2 Proteases animais**

Essas enzimas ocorrem em tecidos específicos dos animais e apresentam grande importância industrial. As proteases mais importantes industrialmente são as gástricas, pepsina e renina, e as pancreáticas, tripsina e quimiotripsina. Proteases de fonte animal estão entre as enzimas mais estudada por seu interesse para a medicina (RAO *et al.*, 1998).

### **2.1.1.3 Proteases microbianas**

O mercado de produção de enzimas microbianas representa atualmente 40% do total de enzimas comercializadas, em virtude da alta eficiência do processo (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011). 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 (RAO *et al.*, 1998). Proteases de fungos termofílicos apresentam vantagens por serem mais estáveis em condições desnaturante de temperatura e pH, ideais para aplicação na indústria de alimentos devido as elevadas temperaturas aplicadas no processamento de alimentos (MACCHIONE *et al.*, 2008).

Processos fermentativos semi-sólido e submersos têm sido utilizados com sucesso para estudar a produção de proteases fúngicas (MACCHIONE *et al.*, 2008; MERHEB *et al.*, 2007; MERHEB-DINI *et al.*, 2010; MERHEB-DINI *et al.*, 2009; SANDHYA *et al.*, 2005; POZA *et al.*, 2003; FERNANDEZLAHORE *et al.*, 1999; KHAN, BLAIN e PATTERSON, 1979; SRINIVASAN *et al.*, 1964). Porém, a proposta diferencial deste trabalho é o monitoramento dos parâmetros de processo umidade relativa do ar, fluxo de ar e acompanhamento da liberação de CO<sub>2</sub> durante o processo fermentativo. Estes parâmetros são importantes para caracterização da produção do bioprocessamento em estudo e possibilitar o aumento na escala de produção.

### **2.1.2 Aplicação Industrial das proteases**

No total de enzimas produzidas e utilizadas em escala comercial, 75% são hidrolases e, desse percentual, 60% são proteases. Sendo sua maior aplicação na indústria de detergentes e alimentos (KOBBLITZ, 2010).

#### **2.1.2.1 Proteases aplicadas na produção de detergentes**

A indústria de detergente apresenta-se como maior consumidora de proteases, onde esta compõe um dos ingredientes essenciais na produção de detergentes, empregados na remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais (KOBBLITZ, 2010; RAO *et al.*, 1998).

#### **2.1.2.2 Proteases aplicadas em alimentos**

A indústria de alimentos é a segunda maior consumidora de proteases, para obtenção de hidrolisados protéicos de forma a melhorar o sabor e a qualidade do alimento (BHASKAR *et al.*, 2007).

Na produção de queijos, onde as proteases são empregadas na coagulação do leite através da hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos fenilalanina (Phe 105) e metionina (Met 106), de  $\kappa$ -caseína presente na proteína leite (SENGUPTA e DASGUPTA, 2006).

Na panificação, enzimas proteolíticas podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas como, por exemplo, proteases de *Aspergillus oryzae* cuja ação sobre o glúten da farinha de trigo afeta a elasticidade e a textura, além de contribuir para redução do tempo de mistura da massa e no custo de produção (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Na clarificação de cerveja, a principal finalidade da protease é a destruição de diacetil, uma substância de sabor desagradável que se acumula no produto durante a fermentação. E no amaciamento de carnes, as proteases irão hidrolisar as proteínas da carne, tornando-a mais macia em menor tempo, quando comparada com as carnes maturadas sem adição da enzima proteolítica (OLIVEIRA, 2001).

#### **2.1.2.3 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica**

Enzimas proteolíticas são amplamente usadas na medicina como, por exemplo, algumas collagenases que podem ser empregadas na remoção de manchas e quelóides, outras no tratamento de queimaduras e úlceras (SUKHOSYROVA *et al.*, 2003).

Proteases queratinolíticas, com atividade sobre proteínas fibrosas e insolúveis (queratinas), também estão sendo estudadas para a remoção de calosidade humana. Outra possível aplicação das queratinases é na remoção da queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses causadas por fungos dermatófitos (BON e VERMELHO, 2004).

#### **2.1.2.4 Proteases aplicadas na indústria de cosmético**

A enzimocosmética é um campo de estudo e visa o emprego de enzimas em produtos cosméticos, dificultando ou facilitando as reações bioquímicas da pele. Nos produtos cosméticos as enzimas são consideradas componentes muito importantes, como as proteases que hidrolisam ligações peptídicas do colágeno e queratina da pele (SIM *et al.*, 2000).

A papaína, bromelina e outras proteases têm sido utilizadas sobre a pele para realização de alisamento e *peeling*. A ação dessas proteases está relacionada com a renovação celular, exercendo atividade queratinolítica, promovendo a remoção das células mortas presentes na epiderme e restauração da mesma (LODS *et al.*, 2000).

#### **2.1.2.5 Proteases aplicadas na indústria de couro**

A utilização das proteases na indústria de couro ocorre como forma alternativa no tratamento do couro, substituindo aditivos químicos perigosos como, sulfeto de sódio que pode contaminar o solo e efluentes. A aplicação de proteases assegura a redução da poluição ambiental e na melhoria na qualidade do couro, sendo sua ação baseada na hidrólise seletiva de proteínas não colagenosas e não fibrosas (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008; RAO *et al.*, 1998).

### **2.2 Fermentação Semi-sólida**

Fermentação é um processo que acompanha o desenvolvimento dos micro-organismos, sendo uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, etc. (SCHMIDELL *et al.*, 2001; PANDEY, 2003).

O processo fermentativo semi-sólido (FSS) pode ser definido como o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, na ausência de água livre no meio (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001; MOO-YOUNG, MOREIRA e TENGARDY, 1983).

Ao longo dos anos vários autores estudaram assuntos relacionados à elaboração, histórico e desenvolvimento científico da FSS. A produção de alimentos

e produção de enzimas foram áreas onde a FSS originou-se. A utilização dos princípios da FSS para a produção de alimentos está relatada desde o ano 1000 a.C., há registros sobre a obtenção queijo por *Penicillium rouquefortii* na Ásia e na China, com a produção de molho de soja. Em 2000 a.C, quando os povos egípcios utilizaram a SSF na elaboração do pão. No ano 500 a.C., também os chineses, iniciaram a produção de “Chiang”, um alimento similar ao “miso”, que é obtido a partir da FSS.

Observa-se que aspectos religiosos impulsionaram a prática da FSS nos países orientais, uma vez que o budismo, introduzido na China no século 4 a.C. e no Japão no século 5 a.C., proíbe o uso da carne, incentivando, assim, a utilização de vegetais, destacando-se o arroz, a soja e o amendoim. Durante este período, houve várias menções de alimentos fermentados como tempeh, miso, entre outros produtos que utilizam sementes de leguminosas como substrato sólido para a fermentação, empregando fungos não patogênicos como *Rhizopus sp*, em muitos países do Sudeste Asiático (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001; PANDEY, SOCOOL e LARROCHE, 2008).

Porém, a partir da segunda Guerra Mundial, os processos submersos tornaram-se mais conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação de penicilina, tornando-se modelos tecnológicos para a produção de qualquer composto por fermentação. Assim, o progresso no desenvolvimento da tecnologia da fermentação submersa levou a uma estagnação da FSS nos países ocidentais. 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 (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001; PANDEY, SOCOOL e LARROCHE, 2008).

No entanto, foi o enriquecimento protéico de rações animais a principal atividade que motivou a utilização da FSS nos países Ocidentais após 1940, pois se tratava de um processo que permitia a utilização de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e, em alguns casos, minimizando a poluição causada por estes resíduos (PANDEY, 2003). Este aspecto, característico da FSS, é de interesse global e influência em um contínuo aumento do número de estudos relativos a este processo. Porém, em níveis industriais, os processos fermentativos submersos continuam sendo o principal sistema de geração de

produtos obtidos por fermentação, sendo pequeno o número de empresas que utilizam a FSS para estes fins (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

### **2.2.1 Micro-organismos utilizados na FSS**

O tipo de micro-organismo que pode crescer e formar produtos, em FSS, é determinado, principalmente pelo valor de atividade de água ( $A_w$ ) do meio. De acordo com Mitchell, Berovic e Krieger (2000), valores de  $A_w$  na ordem de 0,95 – 0,98 podem ser considerados típicos para os meios das FSS. Este intervalo de  $A_w$  é ideal para o crescimento de fungos, principalmente os fungos filamentosos, os quais apresentam crescimento favorável no intervalo de  $A_w$  entre 0,96 e 0,98 no meio. Existem, ainda, situações em que fungos filamentosos suportam condições de  $A_w$  próximo a 0,90 para o seu crescimento. Como consequência, a maioria dos processos em meio sólido são conduzidos por fungos filamentosos, sendo mais comumente utilizados os Phicomycetos (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetos (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidiomicetos (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

Nigam e Singh (1994) relatam que os fungos filamentosos são os micro-organismos de maior importância industrial usados em FSS, pois estes podem crescer naturalmente em frutas, grãos e resíduos agrícolas e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas as condições naturais de crescimento.

Existem outras características dos fungos filamentosos que os tornam mais atrativos para utilização na FSS como, a facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade destes em produzir esporos, o que facilita o preparo do inóculo e a estocagem das células, na forma vegetativa, por longos períodos de tempo (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000).

Bactérias e leveduras crescem em meios com elevados valores de  $A_w$ , na ordem de 0,99 e tem seu crescimento inibido em condições de  $A_w$  de 0,90. Portanto, existe um número menor de trabalhos, na literatura, enfocando a utilização destes micro-organismos na condução de FSS. Entretanto, estudos recentes mostrando a utilização de leveduras para produção de etanol e para o enriquecimento protéico de substratos sólidos amiláceos (MITCHELL BEROVIC e KRIEGER, 2000). Já as bactérias são utilizadas em menor frequência nos processos em estado sólido.

Porém, Pandey, Soccol e Mitchell (2000) ressaltam que existe grande potencial no uso destas na produção de enzimas, como inulinase e ácido glutâmico.

Neste sentido, a FSS tem-se mostrado apta a realizar vários tipos de transformações metabólicas, realizadas por fungos, leveduras ou bactérias, o que irá determinar a escolha da linhagem mais apropriada, durante a fase de seleção do micro-organismo, será o estudo detalhado do processo, visando obter um meio de cultivo adequado e as melhores condições ambientais da fermentação (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

### **2.2.1.1 *Aspergillus oryzae***

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

Entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus oryzae* é conhecido pelo seu potencial de produção de várias enzimas. A evolução da engenharia genética levou a aplicação do *A. oryzae* na produção industrial de enzimas. O genoma do *A. oryzae* foi sequenciado, os genes que foram descobertos através da pesquisa do genoma e os resultados da pesquisa foram apresentados por Machida e seu grupo de pesquisa em 2005.

Quando comparado com o sequenciamento do genoma de duas outras espécies do gênero *Aspergillus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus*, foi observado que o genoma do *A. oryzae* era maior do que das outras duas espécies citadas, relacionados ao metabolismo, em especial ao metabolismo secundário (MACHIDA *et al.*, 2005).

A capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas e o desenvolvimento de um sistema de transformação deve ter facilitado o uso de *A. oryzae* em processos de biotecnologia moderna. A constatação de uma maior expressão dos genes envolvidos no metabolismo, particularmente aquelas para a síntese de metabolitos secundários, onde especifica os genes de secreção de enzimas hidrolíticas e metabolismo de aminoácidos confirmam que *A. oryzae* é um

micro-organismo ideal para a fermentação (MACHIDA *et al.*, 2006; MACHIDA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, a tecnologia de DNA recombinante tem sido utilizada para aumentar a produção de enzimas industriais por *A. oryzae* (MACHIDA *et al.*, 2008, SHARMA *et al.*, 2009) A produção de enzimas por tecnologia do DNA recombinante e a engenharia de proteínas permitiram a modificação das propriedades cinéticas e da estabilidade que contribuíram para o desenvolvimento de novas soluções ao nível da tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização (MENDES, CASTRO e GIORDANO, 2011).

As características do *A. oryzae* em meios sintéticos, naturais e a manipulação sua informação genética estão disponíveis em diversos artigos da literatura (KAPNOOR e VEERAPPA, 2010; WANG; LAW e WEBB, 2005). Extensos estudos sobre a estrutura e as propriedades de *A. oryzae* de protease também são relatados (GARCÍA-GÓMEZ, 2009; SANDHYA *et al.*, 2005).

Diferentes sub-produtos 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 linhagens (WANG; LAW e WEBB, 2005).

### **2.2.2 Substratos**

O emprego de um substrato apropriado ao desenvolvimento do micro-organismo é um fator importante para a FSS. Os materiais sólidos não solúveis podem atuar apenas como suporte físico para o micro-organismo ou exercer a função de suporte e de substrato, fornecendo nutrientes para o crescimento microbiano. Os sólidos podem 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).

Alguns substratos fazem-se necessário a adição de água ao meio ou nutrientes como, fonte de carbono, nitrogênio e/ou minerais (PANDEY, 2003). E outros substratos brutos precisam de um pré-tratamento para tornarem-se adequados a utilização em processos de FSS como: redução de tamanho das partículas utilizando moagem, raspagem ou corte; hidrólise enzimática, física ou química para aumentar a disponibilidade do substrato para o micro-organismo;

tratamento a vapor para uma pré-degradação das estruturas macromoleculares e eliminação de contaminantes.

O problema mais significativo da FSS é a grande heterogeneidade dos substratos, relacionado à estrutura não uniforme do substrato (amido, lignocelulose, pectina), variabilidade entre a amostragem do substrato, 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, dificultando uma amostragem representativa (RAIMBAULT, 1998).

Contudo, os materiais provenientes de matérias-primas, produtos e/ou resíduos agroindustriais têm apresentado preferências nas pesquisas científicas, devido ao baixo custo ou nenhum valor comercial (DANTAS e AQUINO, 2010; KAPNOOR E MULIMANI, 2010; MACCHIONE *et al.*, 2008; MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011; SINGHANIA, 2009).

### **2.2.3 Biorreatores para FSS**

Os biorreatores para o cultivo em FSS ainda não alcançaram o grau de desenvolvimento obtido para os reatores utilizados em cultivo submerso ou fase aquosa. Os fatores que contribuem para isso são as dificuldades de manutenção da uniformidade do substrato e os controles de processo, visto que a maioria dos casos o substrato sólido não conduz o calor gerando durante o processo com eficiência (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

As principais variáveis operacionais avaliadas em biorreatores semi-sólidos são agitação, aeração, umidade e temperatura. A agitação visa manter a homogeneidade do meio de cultivo e a aeração, e o transporte dos gases durante o processo, além de poder ser utilizado para manutenção da temperatura no meio durante a fermentação. O controle da temperatura na FSS, 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 (HASAN *et al.*, 1998). A Figura 2.1 apresenta ilustrações de biorreatores de FSS, divididos em grupos: com aeração superficial e agitação, com aeração forçada e agitação.

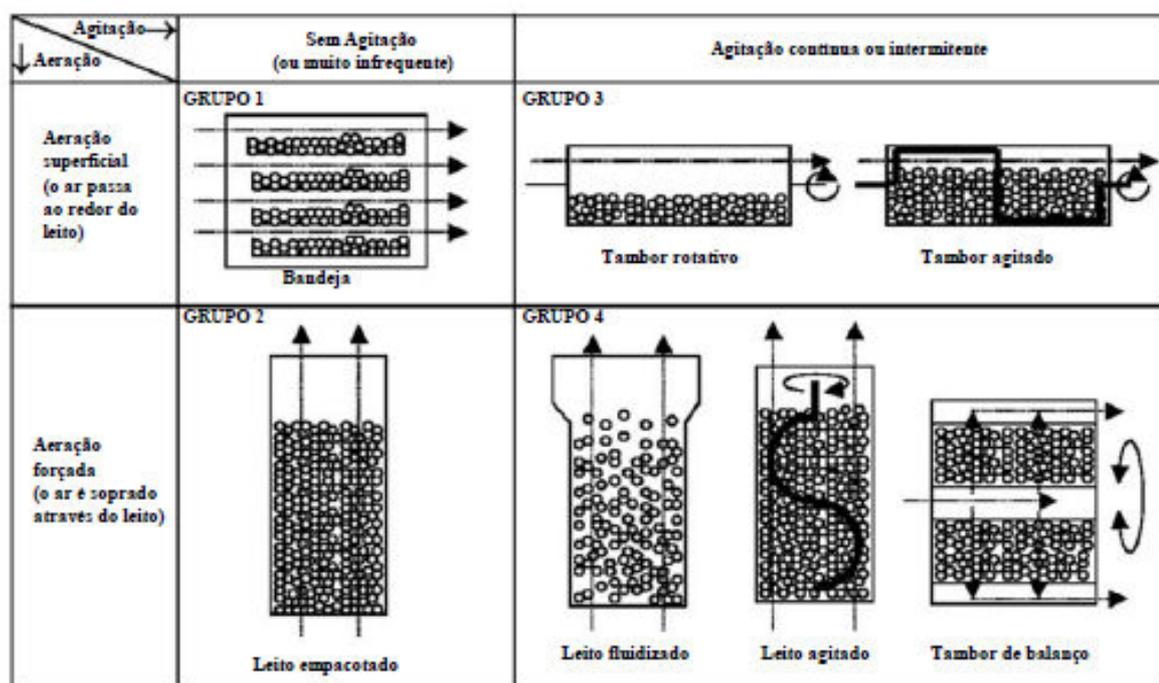


Figura 2.1 – Classificação dos biorreatores de FSS em função das características de aeração e agitação. As setas indicam o sentido da aeração. Adaptado de Mitchell, Berovic e Krieger (2000).

Os biorreatores com aeração superficial e sem agitação (grupo 1) são compostos basicamente por reatores de bandejas, que podem ser dispostos em salas ventiladas e climatizadas, estufas de bancada ou bandejas individuais. As bandejas podem ser de material em madeira, bambu, aço ou materiais poliméricos, onde o substrato é disposto em finas camadas. Apresenta desvantagem, pois requer maiores espaços no escalonamento da produção (PANDEY *et al.*, 2001).

O grupo 2, compreende os reatores com aeração forçada e sem agitação, leito fixo, onde não há a movimentação do meio de cultivo. É usualmente composto por coluna com base porosa contendo o substrato sólido, o mecanismo de aeração é feito com injeção de ar através do substrato. O controle da temperatura é realizado através da circulação externa da água em sistemas encamisados ou utiliza-se banho termostático (RAIMBAULT, 1998).

Os biorreatores com aeração superficial e com agitação são representados pelos reatores tambor rotativo e tambor agitado (grupo 3). No biorreator tambor rotativo a rotação permite a exposição total do meio de cultivo ao fluxo gasoso, responsável pela remoção do calor e gases gerados durante o processo, já o reator

tambor agitado o revolvimento do meio de cultivo é realizado através de pás que giram no interior do tambor estático. A principal limitação é o volume útil do reator, que acima de 30% apresenta dificuldades na mistura e controle dos mecanismos de transferência de massa (RODRÍGUEZ COUTO e SAN ROMÁN, 2006).

Os biorreatores com agitação e aeração forçada (grupo 4), apresentam uma maior variedade de parâmetros de controle de processo com a temperatura, teor de umidade e fluxo de ar e intensidade da mistura. Apresenta melhor transferência de calor, porém, podem provocar danos na fisiologia do fungo, devido a força de cisalhamento (RODRÍGUEZ COUTO e SAN ROMÁN, 2006).

O Quadro 2.1 apresenta aplicações de diferentes tipos de biorreatores, utilizado em FSS, para obtenção de diversos produtos, pode-se observar que a maior parte dos tipos de reatores baseiam-se em dois modelos, o tipo bandeja ou o tipo tambor, com ou sem dispositivos de mistura.

Quadro 2.1 – Desenvolvimentos dos modelos de fermentadores na FSS

<b>Tipo de fermentador</b>	<b>Produto</b>	<b>Micro-organismo</b>
Bandejas de madeira (1923)	Fermentação do Koji	<i>Aspergillus oryzae</i>
Tambor rotativo (1962)	Compostagem	Culturas mistas
Tambor rotativo (1964)	Fermentação do Koji	<i>A. oryzae</i>
Tambor rotativo (1969)	Enzimas	<i>A. oryzae</i>
Tambor horizontal (1976)	Enzimas	Linhagens de Fungos
Misturador de cimento (1977)	Fermentação de milho	Linhagens de fungos e leveduras
Filme poroso (sacos Valmic) (1985)	Micotoxinas	<i>A. flavus</i>
Colunas de vidro (1999,2000)	Ácido cítrico, ácido giberélico	Cepas de fungos
Câmara de FSS (2006)	Produção de conídios	Cepas de fungos

Fonte: adaptado de Pandey, Soccol e Larroche (2008).

## 2.2.4 Controle do processo

Nos processos fermentativos o controle dos parâmetros de processo se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. A atividade de água, umidade, temperatura, transferência de calor, aeração e transferência de oxigênio, assim como a escolha adequada do micro-organismo e substrato são os principais fatores que determinam a eficiência no bioprocessamento por FSS e a qualidade do produto final obtido.

### 2.2.4.1 Atividade de água e umidade

A umidade é um fator que está intimamente relacionado com a definição do processo fermentativo semi-sólido, o teor de umidade do substrato é considerado um dos principais parâmetros que influencia no sucesso da FSS. Já o parâmetro  $A_w$  está relacionado ao favorecimento da quantidade de água não ligada viável à disposição dos micro-organismos (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001). Estes parâmetros são fundamentais para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

As características do substrato, o tipo de produto e as necessidades do micro-organismo determinam o nível de umidade e  $A_w$  a ser utilizado. Maior parte das bactérias crescem em alta  $A_w$  (acima de 0,98) enquanto que muitos fungos podem crescer em valores mais baixos (0,90 – 0,95). Os micro-organismos que são capazes de executar suas atividades metabólicas em  $A_w$  inferiores, tais como os fungos filamentosos, são os mais apropriados para os processos de fermentação em estado sólido (NIGAM e SINGH, 1994).

O nível de umidade para um determinado valor de atividade de água é influenciado pela natureza do substrato. Umidade elevada resulta em um leito com baixa porosidade e baixa difusão do oxigênio, aumentando o risco de contaminação bacteriana, formação de um micélio aéreo, compactação de meio e com isso diminuindo a troca gasosa. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato podem prejudicar o crescimento microbiano, uma vez que a difusão dos nutrientes e do oxigênio será comprometida, podendo levar a falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (LONSANE *et al.*, 1985).

O teor de umidade inicial que geralmente varia na faixa de 15 – 80%, porém, ao longo do processo fermentativo em meio sólido ocorre a evaporação da água

devido ao calor gerado pelas atividades metabólicas do micro-organismo. Para evitar este evento, pode-se manter a umidade relativa do ambiente entre 90–97% ou, se as condições operacionais permitirem, adicionar ar umidificado ao longo do reator, bem como instalar umidificadores no sistema fermentativo (PANDEY, SOCCOL e LARROCHE, 2008).

#### **2.2.4.2 Temperatura e transferência de calor**

A temperatura é considerada um fator crítico devido ao acúmulo do calor gerado pelo metabolismo do micro-organismo durante todo o processo fermentativo, que afeta diretamente o crescimento, a esporulação e a formação do produto. Uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo, devido às atividades metabólicas dos micro-organismos e da altura da camada de substrato (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

Devido à dificuldade na remoção do calor durante o processo de FSS formam-se gradientes de temperatura, podendo ocorrer a formação de zonas com temperatura alta que afeta negativamente o crescimento microbiano e a formação do metabólito desejável (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, apresentam-se disponíveis em qualquer ponto do reator. No entanto, no decorrer da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam e por sua vez, liberam calor, o qual não é facilmente dissipado devido a baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura, e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos, dependendo dos parâmetros de controle do sistema (MOO YOUNG, MOREIRA e TENGEDY, 1983; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

As características térmicas dos materiais orgânicos e a baixa umidade presente na FSS levam a dificuldades especiais na transferência de calor destes sistemas. Embora a FSS seja uma alternativa para a maioria dos processos convencionais de fermentação, o controle de temperatura, em larga escala, é um difícil desafio a ser resolvido (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

#### **2.2.4.3 pH**

O controle do pH durante a FSS é considerando o fator mais crítico devido a heterogeneidade e à consistência do material. É desejável que o micro-organismo

utilizado no processo 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 (LONSANE et al, 1985).

O monitoramento durante o processo fermentativo ainda é um problema não resolvido na FSS, devido a falta de equipamentos adequados para a determinação do pH em materiais sólidos (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

#### **2.2.4.4 Aeração e Agitação**

A aeração e a agitação são operações importantes para prover o suprimento de oxigênio adequado para manutenção das condições aeróbicas e na transferência de calor e massa durante a fermentação. Entretanto, em muitos processos fermentativos, não podem ser aplicado elevada agitação, uma vez que uma forte agitação pode danificar o micélio do fungo. Por outro lado, a agitação tem seus efeitos benéficos como, proporcionar uma homogeneidade durante todo o período da fermentação, promover o crescimento sobre partículas individuais do substrato, expor as partículas do substrato à atmosfera do biorreator, promover a transferência de gás e de calor, e promover a distribuição do inóculo no início do processo (LONSANE *et al.*, 1985).

O valor da taxa de aeração aplicada vai depender de cada processo, pois dependendo da taxa de aeração pode ocasionar uma perda de umidade do meio de cultivo devido à exaustão do ar, provocando a secagem não desejada do substrato. Tornando-se necessário a utilização de umidificadores de ar antes da introdução do mesmo no reator (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

A quantidade de ar a ser utilizada no processo fermentativo vai depender da natureza do micro-organismo, da quantidade de calor metabólico liberado, da espessura da camada de substrato, da quantidade de CO<sub>2</sub> e metabólitos voláteis a serem eliminados (LONSANE *et al.*, 1985).

#### **2.2.4.5 Aplicações da FSS**

A FSS desenvolveu-se a partir da produção de alimentos tradicionais fermentados, e 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. 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, entre outros (SINGHANIA, 2009).

Alguns autores dividem a aplicação comercial da FSS em aplicações sócio-econômicas como a compostagem de resíduos e aproveitamento de resíduos agroindustriais e aplicações economicamente lucrativas como a produção de enzimas e ácidos orgânicos (DALSENTER, 2000; RAMANA-MURTHY *et al.*, 1993).

Utiliza-se a FSS para produzir uma variedade de enzimas, principalmente aquelas de origem fúngica. No continente Asiático, a FSS é utilizada em escala industrial para produzir enzimas tais como, amilases e proteases para a hidrólise do amido e das proteínas vegetais durante a produção de alimentos como, o molho de soja, tempeh, miso e saquê (NAGEL *et al.*, 2002). Porém, sua aplicação nos países ocidentais ainda é pequena devido à falta de informações sobre o mecanismo que determina o comportamento microbiano durante a FSS e também à falta de estratégias bem estabelecidas para escalonamento do processo (PANDEY *et al.*, 1999).

Vários processos de cultivo semi-sólido têm sido pesquisado e desenvolvidos, com aplicações diversas como: produção enzimática, biomassa, suplementação nutricional do meio sólido, avaliação dos parâmetros de processo, entre outros. O Quadro 2.2 mostra alguns exemplos de estudos onde o processo de FSS foi aplicado, com os respectivos substratos e micro-organismos.

Quadro 2.2 – Aplicações da Fermentação semi-sólida

Produto	Micro-organismo	Referência
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	GHILDYAL <i>et al.</i> , (1985)
Alfa amilase	<i>Bacillus licheniformis</i>	LONSANE e RAMESH (1990)
Protease	<i>Aspergillus niger</i>	PADMANABHAN <i>et al.</i> , (1993)
Beta galactosidase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	BECERRA e GONZÁLEZ SISO (1996)
Penicilina	<i>Penicillium crysogenum</i>	DOMINGUEZ e BARRIOS-GONZALEZ (2000)
Esporos de fungo	<i>Verticillium lecanii</i>	FENG <i>et al.</i> , (2000)
Quitosana	<i>Gongronella butleri</i>	NWE <i>et al.</i> , (2001)
Ácido giberélico	<i>Gibberela fujikurai</i>	GELMI <i>et al.</i> , (2002)
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	PRADO <i>et al.</i> , (2004)
Celulase	<i>Aspergillus niger</i>	FARINAS <i>et al.</i> , (2011)
Lipase e Protease	<i>Candida utilis</i>	MOFTAH <i>et al.</i> , (2012)

#### 2.2.4.6 Vantagens do processo fermentativo semi-sólido

O processo fermentativo semi-sólido apresenta algumas vantagens operacionais em relação ao processo submerso. Vários trabalhos relatam este assunto, sempre fazendo um comparativo com o processo submerso. Algumas destas características listadas por Lonsane, (1994) e Raimbault (1998) são resumidas a seguir:

- Relativa resistência a contaminação, devido aos baixos valores de  $A_w$ ;
- Utilização de substrato barato, como a utilização de resíduos agroindustriais;
- Menor geração de efluentes líquidos, o que reduz os gastos com tratamento de efluentes e redução de problemas ambientais;

- Produto final mais concentrado, reduzindo os custos na etapa de *Downstream*;
- Menor volume de reator é requerido, devido a menor quantidade de água utilizada;
- Utilização de substrato que não necessitam de suplementação do meio com nutrientes;
- Condições favoráveis de crescimento e similares ao *habitat* natural dos fungos filamentosos.

Contudo, a FSS apresenta limitações, alguns autores indicam que a escolha do tipo de processo, deve basear-se principalmente, no custo e na eficiência do processo.

**3**

# **Material e Métodos**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi desenvolvido em duas unidades de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na Embrapa de Agroindústria Tropical localizada na cidade de Fortaleza/CE e Embrapa Instrumentação Agropecuária localizada em São Carlos/SP.

Neste capítulo estão descritos os procedimentos que foram necessários para a realização de cada etapa experimental deste trabalho.

#### **3.1 Micro-organismo**

O micro-organismo estudado no presente trabalho foi a linhagem de fungo filamentosos *Aspergillus oryzae* CCBP 001 pertencente a coleção de trabalho da Embrapa Agroindústria Tropical, selecionado previamente por Freitas (2009).

##### **3.1.1 Conservação e ativação da linhagem**

Os esporos de *A. oryzae* CCBP 001 armazenados em solo estéril a -18 °C foram reativados em duas etapas. Na primeira etapa realizou-se a transferência destes para meio ágar batata dextrose, cuja composição encontra-se detalhada no anexo A e incubação a 30 °C por 7 dias, com posterior conservação a 4 °C. Após este tempo os conídios foram novamente transferidos para um tubo com meio ágar batata dextrose inclinada e incubados sob mesma condição e período, completando assim a reativação da linhagem, estando pronta para uso, conforme Pinto (2003).

##### **3.1.2 Preparo do inóculo em farelo de trigo**

Os esporos da segunda etapa de ativação foram suspensos mediante a adição de 10 mL de solução de Tween 80 (0,3% m/v) estéril. O volume de 1 mL da suspensão de esporos foi utilizado como inóculo em 10 g de meio de farelo de trigo. 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<sub>4</sub> e 2,0% (m/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

O meio foi esterilizado a 1atm a 121 °C por 15 minutos. (composição no anexo A) em frascos Erlenmeyers de 125 mL. O meio inoculado foi incubado a 30 °C

por 5 dias em estufa. Após a esporulação em farelo de trigo, o inóculo foi conservado a 4 °C para ser utilizado nas fermentações.

Para a extração dos esporos em farelo de trigo foram adicionados 40 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,3% (m/v) e agitados manualmente com bastão de vidro para a liberação dos esporos. Em seguida, a suspensão de esporos foi obtida pelo processo de filtração em gaze estéril. Posteriormente quantificou-se o número de esporos, para a determinação do volume de inóculo para a fermentação.

O volume de inóculo foi calculado visando obter uma concentração final de  $10^7$  esporos/g de meio sólido. O volume necessário para a inoculação foi determinado após a contagem em câmara de Neubauer. A distribuição dos quadrantes para a contagem pode ser observada na Figura 3.1. O volume da suspensão de esporos em mL foi calculado pela Equação 3.1.

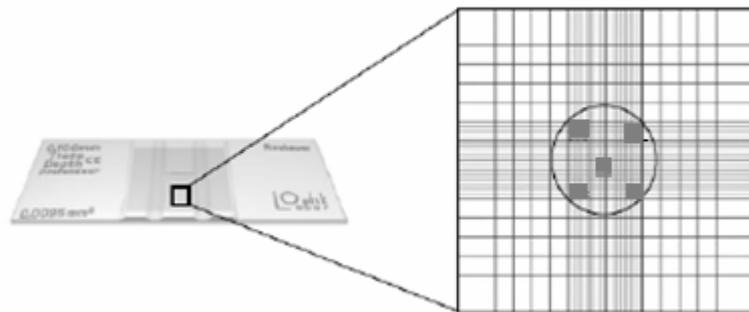


Figura 3.1- Câmara de Neubauer usada para a contagem de esporos (Adaptado de BARGA, 2007).

$$V_i = m_s \times C_e \times (F \times V_{cam} \times \Sigma)^{-1} \quad \text{Equação (3.1)}$$

Onde:  $C_e$  = Concentração inicial de esporos desejada (esporos/g de substrato)

$F$  = Fator de diluição

$\Sigma$  = Soma da contagem de esporos em 5 quadrantes da Câmara de Neubauer

$m_s$  = Massa de substrato

$V_{cam}$  = Volume da câmara de Neubauer

### **3.2 Substratos da FSS**

Os substratos utilizados nos processos fermentativos semi-sólido foram os resíduos agroindustriais: torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da casca da castanha de caju e farelo de algodão, gentilmente cedidos pelas empresas Celena Alimentos S/A, localizada em Eldorado do Sul/RS, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, localizada em Londrina/PR, Moinho Dias Branco localizado em Fortaleza/CE, Iracema Indústria e Comércio de Castanha de caju Ltda, localizada em Fortaleza/CE, e Bunge Alimentos S/A, com escritório localizado em Fortaleza/CE, respectivamente.

Para obtenção do meio de fermentação, as tortas e farelos foram utilizados sem passar por tratamento adicional, apenas por umidificação com diferentes volumes de água destilada foram estudados. Após a adição da água, realizou-se uma homogeneização manual e submeteu-se ao processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min.

A Figura 3.2 apresenta o fluxograma de obtenção do extrato enzimático proteolítico em cada experimento.

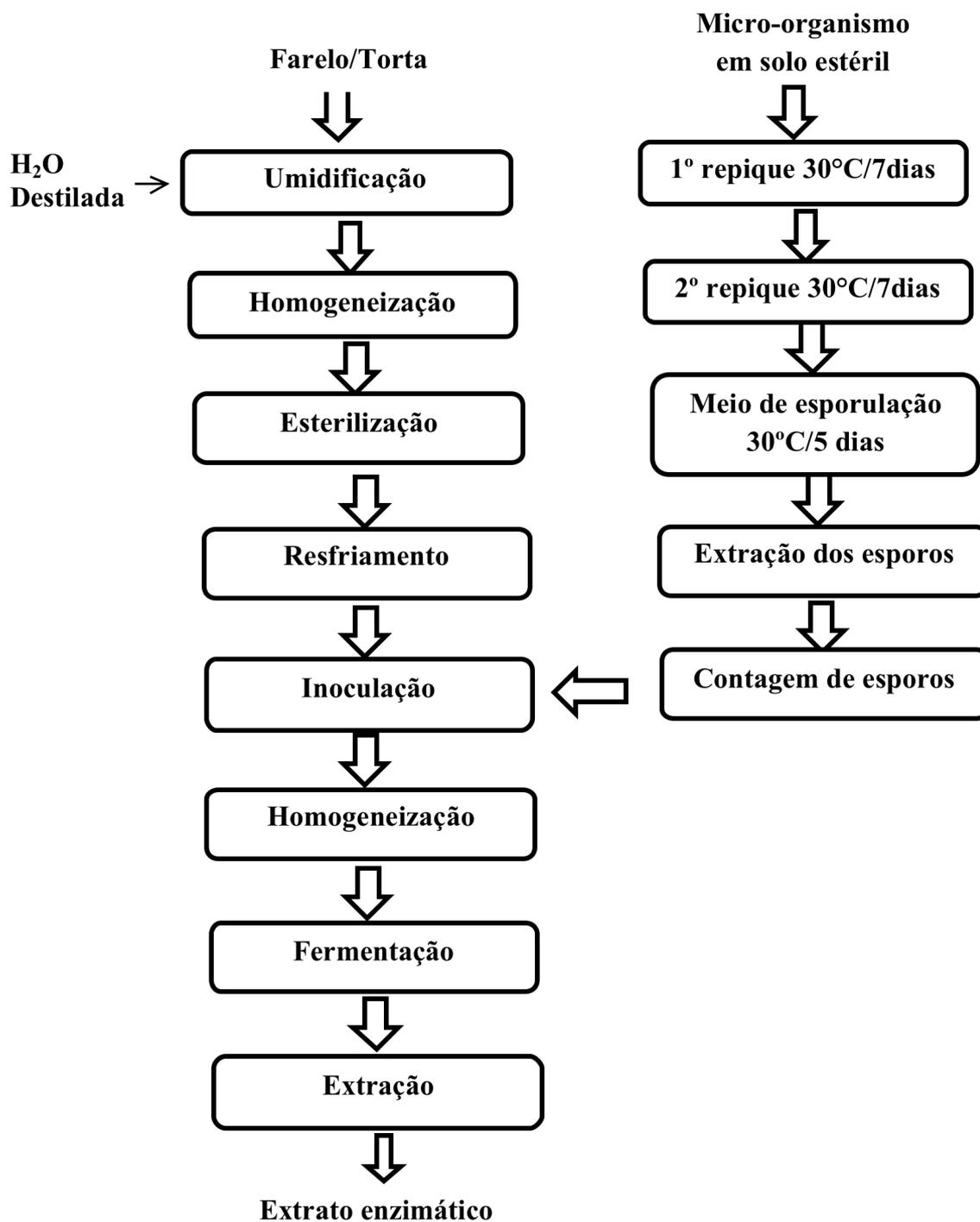


Figura 3.2- Fluxograma de obtenção do extrato enzimático proteolítico em cada experimento.

### **3.3 Fermentação semi-sólida em frasco Erlenmeyer**

O meio para a fermentação foi basicamente o substrato umidificado com água destilada. A massa de substrato foi colocada em béquer de polipropileno, adicionou-se lentamente água destilada e realizou-se a homogeneização. Posteriormente, foram transferidos 40 g do meio para Erlenmeyer de 500 mL, diâmetro interno de boca de 50 mm, e levado à autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os meios foram inoculados com suspensão de esporos. O volume da suspensão foi calculado de acordo com o descrito no item 3.1.3 e incubados a 20 °C durante 96 horas de processo fermentativo.

O extrato enzimático foi extraído do meio amostrado, a cada tempo fermentativo, 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, homogeneizado manualmente, permanecendo incubado em estufa a 30 °C por um período de 1 hora. Em seguida foi realizada uma filtração a vácuo, utilizando papel de filtro qualitativo, e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade enzimática.

#### **3.3.1 Seleção do substrato para a síntese de protease**

##### **3.3.1.1 Adição de diferentes volumes de água**

Foi estudada a umidificação do substrato, em diferentes volumes de água destilada, para a seleção de um substrato para a produção protease. Também, observou-se o efeito da adição de diferentes volumes de água no meio durante o processo fermentativo sobre a síntese da enzima, avaliou-se a umidade inicial do meio fermentativo e a atividade de água ( $A_w$ ). As proporções de água adicionada foram: 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mL para cada 100 g de substrato (torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da casca da castanha de caju e farelo de algodão). As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers durante 96 h, com amostra sendo retirada a cada 24 h.

Os substratos que apresentaram maior síntese de protease, na melhor condição de volume de água adicionada, foram incubados em diferentes temperaturas.

### **3.3.1.2 Temperatura de incubação**

A influência da temperatura (20, 25, 30 e 35 °C) na produção de protease usando os substratos, torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo e farelo de algodão, foi estudada. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers, durante 96 h com amostra sendo retirada a cada 24 h.

### **3.3.2 Suplementação do substrato com fonte de carbono e nitrogênio**

Avaliou-se a suplementação do melhor substrato com glicose (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio). Para isso, realizaram-se experimentos com adição de 1% (m) de extrato de levedura e com 7,5% (m) de glicose, comparados com experimento controle, sem a adição de fontes de carbono e nitrogênio. Os valores das concentrações das fontes de suplementação foram baseados em resultados apresentados por Freitas (2009).

### **3.4 Fermentação semi-sólida em biorreator de coluna instrumentado**

Após a seleção de um substrato com potencial de produção de protease na primeira etapa do trabalho e a etapa de suplementação do meio com fonte de carbono e nitrogênio, os experimentos posteriores foram realizados utilizando biorreator de coluna instrumentado. O modelo do biorreator em escala de laboratório foi adaptado de Raimbault e Germon (1976) citado por Durand (2003), apresentado na Figura 3.3.



Figura 3.3 - Foto ilustrativa do biorreator de colunas utilizado nas FSS.

O sistema de biorreatores de coluna utilizado nesta pesquisa é constituído de 12 colunas de vidro de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, dispostas em banho termostático, com sistema de controle *on-line* de vazão e umidade relativa do ar. O funcionamento do sistema baseia-se em manter uma vazão entre o ar seco com outra de ar saturado com água de forma a obter um fluxo de ar e umidade constantes, de acordo com a necessidade do operador. Cada uma dessas linhas de entrada possui um controlador de fluxo de massa que apresenta medida de fluxo na saída entre 0 a 1000 mL/min.

As medidas de umidade relativa e temperatura do ar, resultante da mistura ar seco e ar saturado, é feita por um conjunto de sensores. O sensor de umidade possui um resistor de platina para medir a temperatura. A sequência de medidas, o armazenamento dos dados, o desenho gráfico obtido em tempo real e o acionamento dos controles de fluxo de massa são feitas com auxílio de um pacote de programação por interface gráfica, LabView, da Nacional Instruments, EUA (BERTUCCI e COURI, 1996; BERTUCCI *et al.*, 2009). Um módulo de medida da quantidade total de CO<sub>2</sub> (VAISALA, Finlândia) é conectado com a saída de ar de circulação de duas colunas para o monitoramento da liberação de CO<sub>2</sub> em função do tempo de fermentação.

Esta tecnologia foi desenvolvida pelo Laboratório de Agroenergia na Embrapa Instrumentação Agropecuária.

#### **3.4.1 Metodologia de experimentos para a FSS em biorreator de colunas**

Os experimentos em biorreator instrumento de colunas foram conduzidos em colunas cilíndricas de vidro, o meio de fermentação foi previamente esterilizado e inoculado de acordo com o descrito no item 3.3. A temperatura foi mantida a 20 °C pela imersão das colunas em banho termostático com circulação de água. A unidade de fermentação utilizada para realização do processo permite o controle e variação da umidade e vazão do ar. Portanto os parâmetros avaliados nesta etapa foram umidade relativa do ar, vazão do ar e umidade inicial do substrato. Os intervalos foram definidos a partir do trabalho de Freitas (2009), que definiu 40% de umidade inicial do substrato como a melhor para produção de protease em Erlenmeyer, e Farinas *et al.*, (2011) que estudaram as variações de umidade e vazão do ar para produção de endoglucanase.

Visando a comparação entre as condições (dinâmica) no biorreator de colunas e (estática) em Erlenmeyers foram realizadas em paralelo FSS em Erlenmeyers de 500 mL com condições iniciais de umidade de substrato similares aos experimentos em biorreator de colunas.

#### **3.4.2 Obtenção dos Extratos Enzimáticos**

Os extratos enzimáticos foram obtidos do meio após 96 h de processo fermentativo, com a transferência do meio fermentado das colunas para frascos Erlenmeyers e 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 estufa a 30 °C por um período de 1 h. Posteriormente foi filtrado à vácuo utilizando papel de filtro qualitativo e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade enzimática.

#### **3.4.3 Análise Respirométrica**

Monitorou-se o consumo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) utilizando um sensor de CO<sub>2</sub> (VAISALA, Finlândia). O módulo para medida foi conectado à linha de gás em duas colunas selecionadas e a medida foi realizada durante todo o período fermentativo. A quantidade total de CO<sub>2</sub> produzida foi estimada usando parâmetros como a área total da curva da produção gasosa em função do tempo fermentativo (FARINAS *et al.*, 2011).

#### **3.4.4 Planejamento Experimental**

Realizaram-se planejamentos experimentais durante a pesquisa com o intuito de estabelecer condições adequadas para a síntese de protease pelo *A. oryzae* CCBP 001.

##### **3.4.4.1 Avaliação das condições operacionais e umidade do substrato**

Os experimentos de estudo da produção de extrato enzimático proteolítico utilizando biorreator em coluna instrumentado foram realizados baseados em um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, resultando em 11 experimentos, incluindo 3 pontos centrais. Este planejamento foi realizado para avaliar os efeitos da taxa de fluxo de ar, umidade relativa do ar e umidade inicial do substrato sobre a eficiência da produção de protease. Os valores das variáveis independentes e seus níveis

codificados são apresentados na Tabela 3.1. A seleção dos valores foi baseada em experimentos preliminares.

Tabela 3.1- Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial  $2^3$ .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Umidade relativa do ar (%) – $X_1$	60	70	80
Fluxo de ar (mL/min) – $X_2$	12	24	36
Umidade inicial do substrato (%) – $X_3$	30	40	50

#### 3.4.4.2 Otimização das condições operacionais da FSS

Um delineamento composto central rotacional que consistiu em um planejamento completo  $2^2$  com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, objetivando-se a otimização das variáveis umidade do substrato e umidade do ar na atividade proteolítica através da metodologia de superfície de resposta. Os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados são apresentados na Tabela 3.2. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi Statistica (versão 7.0, Tulsa, E.U.A.).

Tabela 3.2 - Codificação e distribuição das variáveis utilizadas no DCCR

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Umidade do ar (%) – $X_1$	66	70	80	90	94
Umidade do substrato (%) – $X_2$	16	20	30	40	44

### **3.5 Cinética da fermentação**

Nas condições operacionais otimizadas (DCCR) foi acompanhada a cinética de produção enzimática no período de 10 dias a 20 °C, em reator de colunas. Foram realizados experimentos em frascos Erlenmeyers na mesma umidade do substrato, com o intuito de comparar a produção de protease em condições estática e dinâmica. Sendo realizadas amostragens a cada 24 horas para determinar a atividade de protease e a estimativa da biomassa (teor de glicosamina). O monitoramento da concentração de CO<sub>2</sub> foi realizado durante todo o período fermentativo.

### **3.6 Purificação parcial do extrato enzimático**

Realizaram-se experimentos utilizando torta de canola como substrato, nas condições otimizadas em frascos Erlenmeyers, umidade do substrato 40 g/100 g de meio, inoculado com *A. oryzae* CCBP 001 na concentração de esporos de 10<sup>7</sup> esporos/g de meio e incubado na temperatura de 20 °C, para obtenção do extrato enzimático proteolítico. Este foi submetido à precipitação com sulfato de amônio e liofilizado.

#### **3.6.1 Precipitação do extrato enzimático com sulfato de Amônio**

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada conforme a metodologia descrita por Bracht e Ishii-Iwamoto (2003). Para a operação foram utilizadas as seguintes concentrações de sulfato de amônio de 20, 40, 60, 80 e 100% de saturação. A adição era feita com agitação branda e em banho de gelo. Após completa solubilização, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, 4 °C por 10 min e o sobrenadante foi removido. Posteriormente, precipitado e sobrenadante, de cada tratamento, foram imediatamente submetidas à dessalinização por processo de diálise em membrana de celulose a 4 °C por 72 h com trocas sucessivas. O precipitado e sobrenadante foram dialisados com água destilada por 72 h a 4 °C. Após a diálise, a fração protéica foi liofilizada.

### 3.6.2 Liofilização do extrato enzimático

A concentração das amostras dialisadas foi realizada em liofilizador Terroni Fauvel - LC1500 em condições a vácuo e -55 °C. Após a concentração, foi determinada a atividade de protease e quantificação dos teores de proteínas.

### 3.7 Determinações da atividade enzimática

#### 3.7.1 Atividade enzimática de protease

A atividade de protease foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), a mistura de reação constituiu de 1 mL de solução de azocaseína 0,5% (m/v) 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 este tempo, a reação foi paralisada com adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% (m/v), objetivando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação 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 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.

Uma unidade de atividade proteolítica (IU) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições de reação estabelecidas. A atividade enzimática foi determinada de acordo com a Equação 3.2.

$$A = \frac{((Média_{Abs} - Branco_{enz}) \times Dil) / U_i}{t}$$

Equação 3.2

Onde:

A = atividade em U/g de substrato

Média<sub>Abs</sub> = média das Absorbâncias

Branco<sub>enz</sub> = branco enzimático (substituição do extrato enzimático por água destilada)

Dil = diluição do extrato enzimático

$U_1$  = 0,01 unidade de absorvância

t = tempo de reação em minutos

#### **3.7.2 Atividade de coagulação do leite pelo extrato enzimático proteolítico**

A atividade do extrato enzimático produzido pelo fungo *A. oryzae* CCBP 001 na coagulação do leite foram determinados de acordo com o método de Berridge (1952). Os extratos liofilizados de *A. oryzae* CCBP 001, nas diferentes frações obtidas pela precipitação utilizando sulfato de amônio descritos no item 3.8, foram dissolvidos na proporção de 1 mg/20 mL em solução de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, o tempo de coagulação foi medido utilizando-se a mistura de 1 mL da enzima dissolvida em  $\text{CaCl}_2$  10 mM com 1 mL da solução de leite reconstituído (12% (m/v) de leite em pó desnatado comercial Molico/Nestlé, em pH 6,5 dissolvido em  $\text{CaCl}_2$  10 mM), e incubadas a 37 °C até o tempo de coagulação do leite. A atividade coagulante foi determinada considerando que uma unidade de (1U) de coagulação equivale a quantidade de miligrama de enzima (extrato liofilizado) capaz de coagular 1 mL de leite em 1 minuto a 37 °C.

#### **3.8 Estudo do efeito do pH na atividade proteolítica**

##### **3.8.1 pH**

Nesta etapa avaliaram-se diferentes pH do tampão na extração do extrato enzimático e diferentes pH do tampão diluente do substrato padrão de determinação da atividade de protease. A determinação do pH ótimo, tampão de extração e do tampão diluente do substrato padrão de determinação da atividade proteolítica, foi realizada em diferentes faixas de pH. Nas faixas de pH 4,0 e 5,0 utilizou-se acetato de sódio 200 mM, e nas faixas 6,0 a 8,0 utilizou-se fosfato de potássio 200 mM.

#### **3.9 Zimografia**

Com o objetivo de estimar a massa molar das proteases, foram realizadas análises de zimografia das enzimas após os procedimentos de precipitação com sulfato de amônio, diálise e liofilização.

A atividade proteolítica nas amostras de protease de *Aspergillus oryzae* CCBP 001 foi analisada por zimografia, método adaptado a partir do método de Dib (1998). Uma quantidade de 4 mg de extratos enzimático foram adicionados a 1 mL de tampão de amostra composto de 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 com 5% (m/v) de Dodecil sulfato de sódio (SDS), 1% (m/v) de sacarose e 0,05% (m/v) de azul de bromofenol. Um volume de 10 µL de cada solução das diferentes precipitações foram carregado em géis de SDS-PAGE contendo 0,1% (m/v) de gelatina. Eletroforese (SDS-PAGE) foi conduzida a 4 °C durante 150 minutos a 500 V, 60 mA e 30 W de acordo com Laemmli e Favre (1973). Após a migração eletroforética, o gel foi lavado duas vezes com 2% (v/v) em Triton X-100 por 30 minutos. A reação de hidrólise aconteceu no gel durante a incubação a 37 °C por 48 h em tampão Tris-HCl 0,05 mM/15 mM de CaCl<sub>2</sub> em pH 7,5. A atividade da enzima foi revelada como bandas translúcidas depois da incubação do gel, numa primeira etapa, numa mistura de 40% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético e de 0,1% (m/v) azul de Coomassie R-250 durante 60 minutos e, em uma segunda etapa, incubado uma solução de descoloração contendo 30% (m/v) de etanol e 7,5% (v/v) de ácido acético com várias lavagens. O peso molecular utilizado como marcador foi Bio Rad código 161-0317.

#### **3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os extratos enzimáticos precipitados com sulfato de amônio em diferentes concentrações, posteriormente dialisados e liofilizados foram utilizados nas corridas de eletroforeses em gel de poliacrilamida na condição redutora desnaturante (SDS-PAGE) realizadas de acordo com o protocolo descrito por Laemmli e Favre (1973), utilizando géis a 15% (v/v). A voltagem e o volume de amostra carregada foram 500 V e 80 µL, respectivamente. O procedimento de coloração foi realizado com azul de Comassie e nitrato de prata descrito por Morrysey (1981).

#### **3.11 Estudo da secagem do extrato enzimático por atomização utilizando “spray dryer”**

Para avaliar o tempo de estocagem e manutenção da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto obtido pelas FSS, realizou-se um estudo de secagem em “spray dryer”.

### 3.11.1 Equipamento

A secagem por atomização foi conduzida em Mini Spray Dryer Büchi B-290 com capacidade máxima de secagem de 1,0 L de água por hora e bico atomizador integrado de duplo fluido com 0,7 mm de diâmetro. O atomizador de secagem Büchi B-290 funciona segundo o princípio da corrente de ar e de produto em sentido concorrente (BÜCHI, 2005). O processo de secagem ocorre de acordo com o desenho esquemático da Figura 3.4.

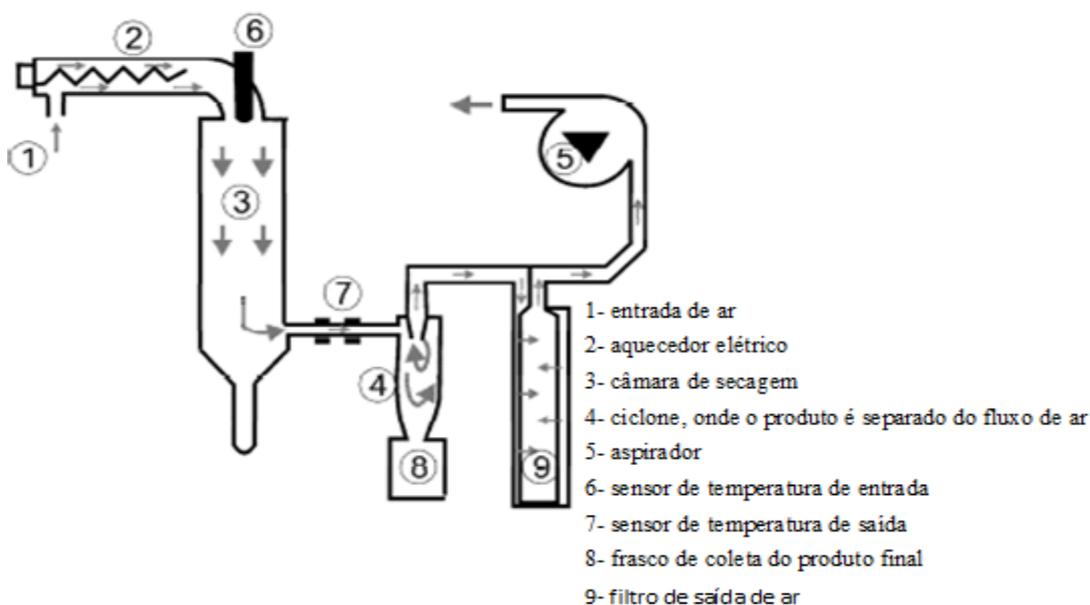


Figura 3.4- Desenho esquemático do “spray dryer” com fluxo de secagem concorrente adaptado de Moreira (2007).

### 3.11.2 Condições de secagem

A temperatura de entrada do ar de secagem foi de 110 °C, temperatura de saída do ar de 90 °C, vazão de ar comprimido para a atomização de 742 L/h, aspiração de 90% e vazão de alimentação da suspensão de 0,1 L/h. O bico atomizador utilizado foi de 1,5 mm.

### 3.11.3 Adjuvante utilizados na secagem

Foram realizados experimentos a fim de se avaliar a eficiência de alguns materiais comumente utilizados como agente adjuvante em processos de secagem por atomização: maltodextrina DE 5 dextrose equivalente (Sigma Aldrich); glicose P.A. (Vetec) e carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma Aldrich). As

condições de secagem e os intervalos das concentrações de glicose e maltodextrina foram definidos a partir do estudo realizado por Namaldi, Çalik e Uludag (2006).

Foi aplicado um delineamento fatorial  $2^3$ , resultando em 8 experimentos, mais 3 pontos centrais, para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de adjuvantes para a secagem do extrato enzimático. Os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados são apresentados na Tabela 3.3. A seleção dos valores foi baseada em dados de experimentos preliminares. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi Statistica® (versão 7.0, Tulsa, E.U.A.).

Tabela 3.3 - Valores das variáveis independentes utilizadas no delineamento fatorial completo  $2^3$  na etapa do estudo de secagem do extrato enzimático utilizando diferentes adjuvantes.

Variáveis (%)	Níveis		
	-1	0	1
Glicose - $X_1$	0,4	1,0	1,6
Maltodextrina - $X_2$	0,4	1,0	1,6
Carboximetilcelulose - $X_3$	0,02	0,05	0,08

### 3.12 Avaliação do tempo de estocagem do extrato atomizado

Após a obtenção do extrato enzimático em pó, pelo processo de atomização, o mesmo foi estocado a temperatura ambiente (em torno de 28 °C) durante o período de 90 dias, sendo determinada a atividade de protease com: 0, 2, 4, 8, 18, 30, 60 e 90 dias de estocagem.

### 3.13 Métodos Analíticos

#### 3.13.1 Determinação da Umidade

Foi determinada pelo método descrito por IAL (2004). Pesaram-se 3 g da amostra em um cadinho de porcelana previamente tarado. Levou-se a estufa a 105

°C por 16 horas até peso constante do material. A umidade foi estabelecida de acordo com a Equação 3.3.

$$U = \frac{100 \times N}{P}$$

Equação 3.3

Onde:

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra (massa inicial da amostra)

### 3.13.2 Determinação da atividade de água (*A<sub>w</sub>*)

A atividade de água foi determinada através do medidor digital de *A<sub>w</sub>* utilizando o equipamento AQUALAB CX-2, com sensibilidade de 0,001 a 28°C ± 2°C.

### 3.13.3 Determinação de proteína total no extrato enzimático

A determinação de proteína seguiu o método de Lowry *et al.*, (1951), com a curva padrão determinada nos intervalos de 10 a 100 mg/L de solução albumina bovina. As soluções foram preparadas conforme apresentado no anexo B, a partir da solução padrão de albumina bovina P.A. (BAS), feita imediatamente antes do uso. Foram adicionados 1 mL de cada uma das soluções preparadas em tubos de ensaio. Em seguida, foi feita a dosagem de proteína usando como branco, 1 mL de água destilada.

### 3.13.4 Estimativa da produção de biomassa

Utilizou-se o método da determinação de glicosamina para o acompanhamento da produção de biomassa durante a fermentação (BLIX, 1948 & SAKURAI *et al.*, 1977).

Para extração de glicosamina contida na amostra, retiraram-se aproximadamente 0,5 g de meio fermentado, acondicionando-o em tubo de ensaio com tampa de rosca, adicionaram-se 2 mL de solução de ácido sulfúrico 70% (v/v), sendo então, mantido por 24 horas para digestão do mesmo pelo ácido. Diluiu-se a amostra, então digerida, com 5 mL de água destilada. Submeteu-se a autoclave por 1 hora a 121 °C. Em seguida, a solução foi filtrada quantitativamente e neutralizada com solução hidróxido de sódio 5 N, sendo aferida para 100 mL. Retirou-se 1 mL da

amostra neutralizada e adicionou-se 1 mL de solução acetilacetona, colocando a mistura em banho-maria a 96 °C por 20 minutos. A temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de etanol, e imediatamente, 1 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído, seguindo de agitação até completa dissolução, adicionando-se 5 mL de etanol novamente. Após 45 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 530 nm. Paralelamente, foi construída uma curva padrão de glicosamina, utilizando-se diluições (1 a 10 mg/L) de uma solução padrão de glicosamina P.A. (Sigma) com concentração 100 mg/L preparada no momento da análise. Esta foi submetida também, a leitura espectrofotométrica a 530 nm.

A concentração de glicosamina por meio fermentado seco, foi expressa pela Equação 3.4.

$$G = \frac{G'}{(MS \times 10)} \quad \text{Equação 3.4}$$

Onde G é a concentração de glicosamina por meio fermentado seco, expressa em mg/g de meio fermentado seco; G' é a concentração de glicosamina calculada pela curva padrão, expressa em mg/L, MS é a massa de meio fermentado expresso por seu conteúdo seco da amostra, calculado utilizando-se, inicialmente, a umidade da amostra.

Os gráficos gerados e apresentados nos resultados foram elaborados por meio do software ORIGIN 6.0 (OriginLab Corporation, Massachussets, USA).

# 4

# Resultados e Discussão

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Seleção do substrato**

A seleção de um substrato sólido adequado para FSS e a umidade do meio são fatores críticos no processo fermentativo e, portanto, envolvem estudos de diversos resíduos agroindustriais para o crescimento microbiano e formação de produto. Nesta etapa do estudo avaliou-se a produção de protease frente a adição de diferentes volumes de água ao substrato (25, 50, 75, 100, 125 e 150 mL/100 g de substrato) e posteriormente variou-se a temperatura de incubação do meio (20, 25, 30 e 35 °C) em diferentes substratos, para a seleção de um substrato com potencial para a produção de proteases.

#### **4.1.1 Avaliação das proporções de água adicionada ao substrato**

A determinação da atividade de água ( $A_w$ ), ou teor de água livre, a qual estará disponível para reações físicas, químicas e microbiológicas nos materiais, que permitindo o desenvolvimento e reprodução dos micro-organismos, apresenta-se como melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas nos materiais (DEL BIANCHI; MORAES E CAPALBO, 2001).

Os valores de  $A_w$  e atividade de protease determinados nos meios com variação do volume de água adicionada na formulação do meio fermentativo encontram-se nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente.

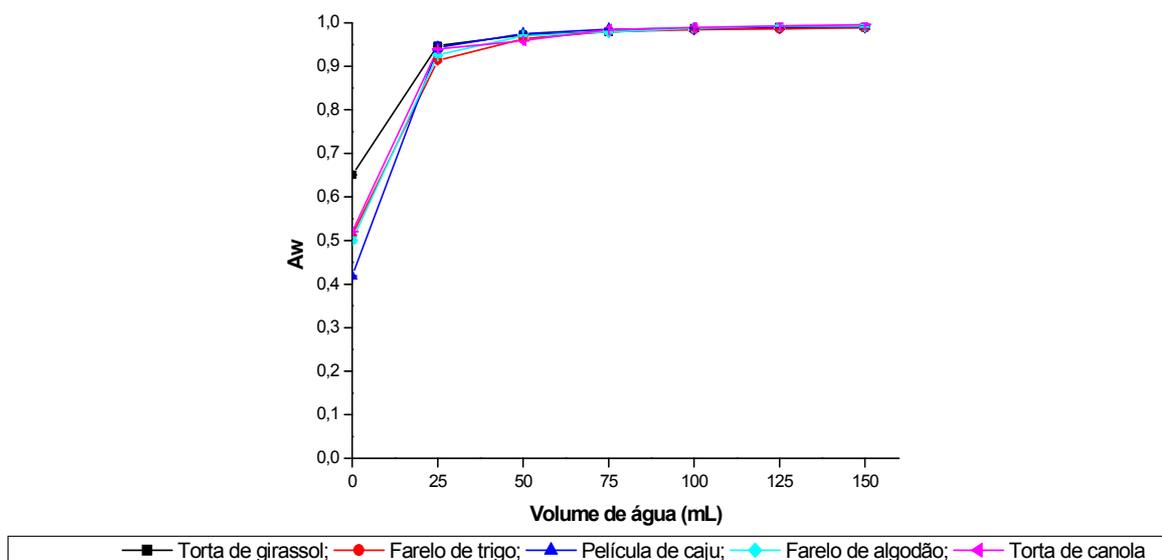


Figura 4.1 – Atividade de água nos diferentes substratos frente à adição de água nos volumes de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mL para 100 g de sólido.

Os resíduos apresentaram diferentes valores de  $A_w$  antes da adição de água, a película da casca da castanha de caju apresentou o menor valor (0,42), enquanto que com a torta de girassol obteve-se o maior valor (0,65). Após a adição de água, observou-se que independente do substrato utilizado, a  $A_w$  mostrou-se similar para cada quantidade de água adicionada (Figura 4.1). Em estudos da influência de  $A_w$  na síntese de enzimas extracelulares, os valores de  $A_w$  entre 0,95 e 0,98 são considerados ótimos para a produção de enzimas por fungos filamentosos em FSS, valores estes encontrados para todos os substratos utilizados neste trabalho (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000; MACIEL, 2006; ALCÂNTARA; ALMEIDA; SILVA, 2008).

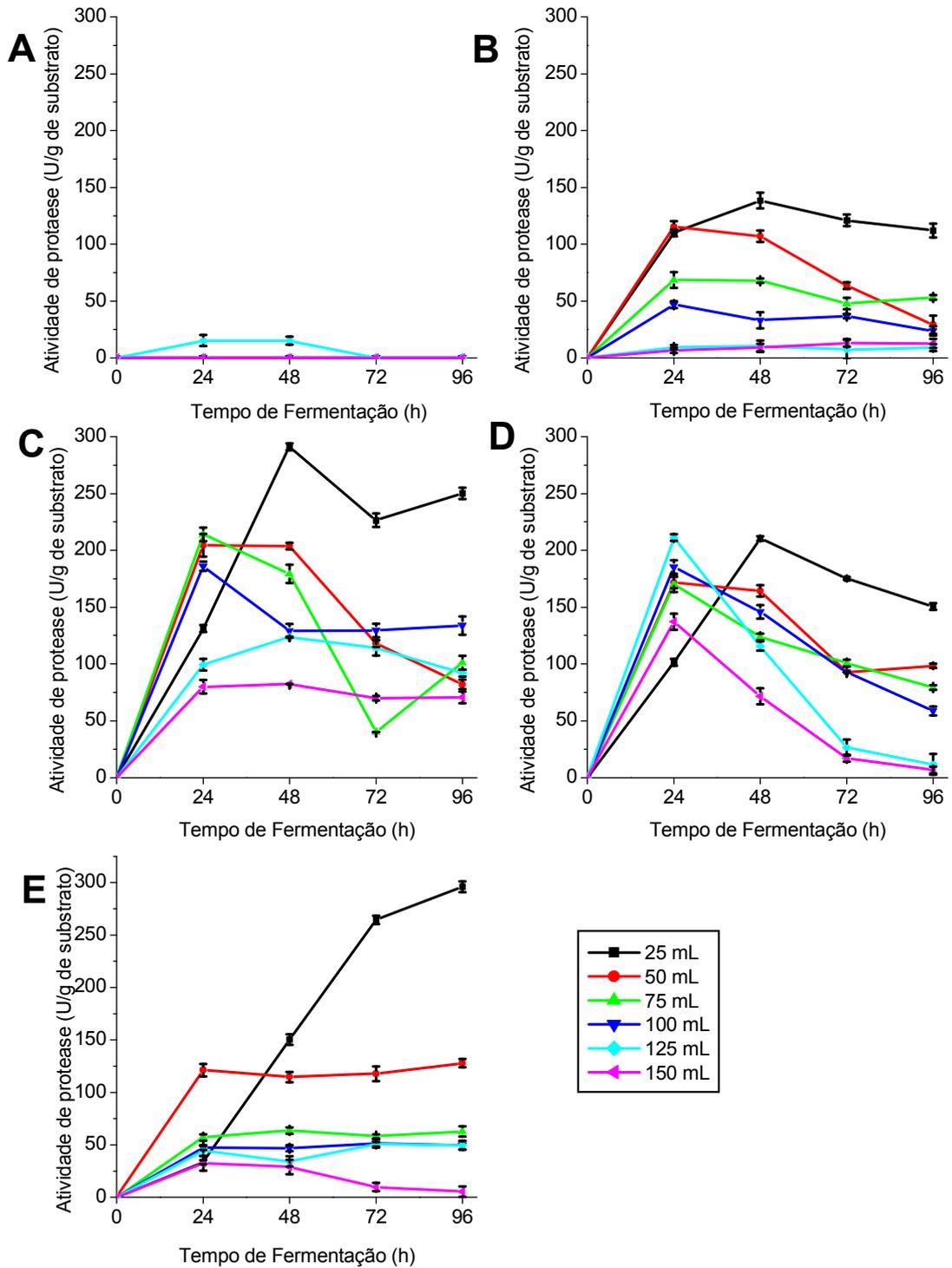


Figura 4.2 – Efeito da adição de água sobre a síntese de protease de *A. oryzae* CCBP 001 utilizando diferentes resíduos como substrato: película da casca da castanha de caju (A), torta de girassol (B), farelo de algodão (C), farelo de trigo (D) e torta de canola (E), na temperatura de incubação de 20 °C e em condições estática.

Na Figura 4.2 observa-se que os resíduos utilizados como substrato neste estudo permitiram a síntese enzimática proteolítica em todos os volumes de água avaliados, com exceção da película da casca da castanha de caju, onde a atividade proteolítica só foi detectada nos tempos de 24 h e 48 h mediante a adição de 125 mL de água para cada 100 g de resíduo com produção média de 15,16 U/g de protease (Figura 4.2A).

A adição de volumes maiores de água aos substratos prejudicou a produção da enzima pelo micro-organismo, uma vez que os maiores valores de atividade de protease concentraram-se nos meios com adição de 25 a 75 mL de água por 100 g de substrato, sendo observadas as maiores produções de protease nos meios com 25 mL de água por 100 g de farelo de trigo, algodão, girassol e torta de canola, obtendo-se 210; 290,9; 138 U/g em 48 h de fermentação e 294 U/g em 96 h (Figuras 4.2 B, C, D e E), respectivamente. O nível de umidade da FSS tem grande impacto sobre as propriedades físicas dos substratos. Substratos com umidade elevada, os espaços vazios em que os sólidos são preenchidos com água, limitando a troca gasosa. Porém, o crescimento do micro-organismo fica restrito quando o teor de umidade for muito baixo, impactando na produção enzimática (RAGHAVARAO *et al.*, 2003; RATHAKRISHNAN e NAGARAJAN, 2011).

Anandan, Marmer e Dudley (2007) avariaram a umidade inicial do farelo de trigo (30 a 100%) na produção de protease por *Aspergillus tamaris* e observaram um pico de atividade com 65% de umidade inicial, umidades acima de 65% reduziram a atividade enzimática. Porém, Sandhya *et al.* (2005) estudaram a produção de protease por *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e mostraram que a maior produção de enzima foi obtida com adição de 43,6% de umidade, apresentando atividade de 30,5 U/g de substrato.

Alguns autores justificam que o aumento da umidade do meio sólido reduz a porosidade, o que limita a transferência de oxigênio levando a diminuição da atividade enzimática (DIVAKAR *et al.*, 2006).

Portanto, para as próximas etapas, o farelo de algodão, torta de canola, farelo de trigo e torta de girassol foram escolhidos como substratos da FSS da etapa seguinte. E a proporção de água adicionada ao substrato selecionado para a etapa seguinte foi 25 mL/100 g de substrato.

## 4.1.2 Avaliação da temperatura de incubação

A Figura 4.3 apresenta os resultados de atividade enzimática proteolítica do farelo de algodão, torta de canola, farelo de trigo e torta de girassol, incubado nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, durante os tempos amostrais de 24, 48, 72 e 96 h de fermentação.

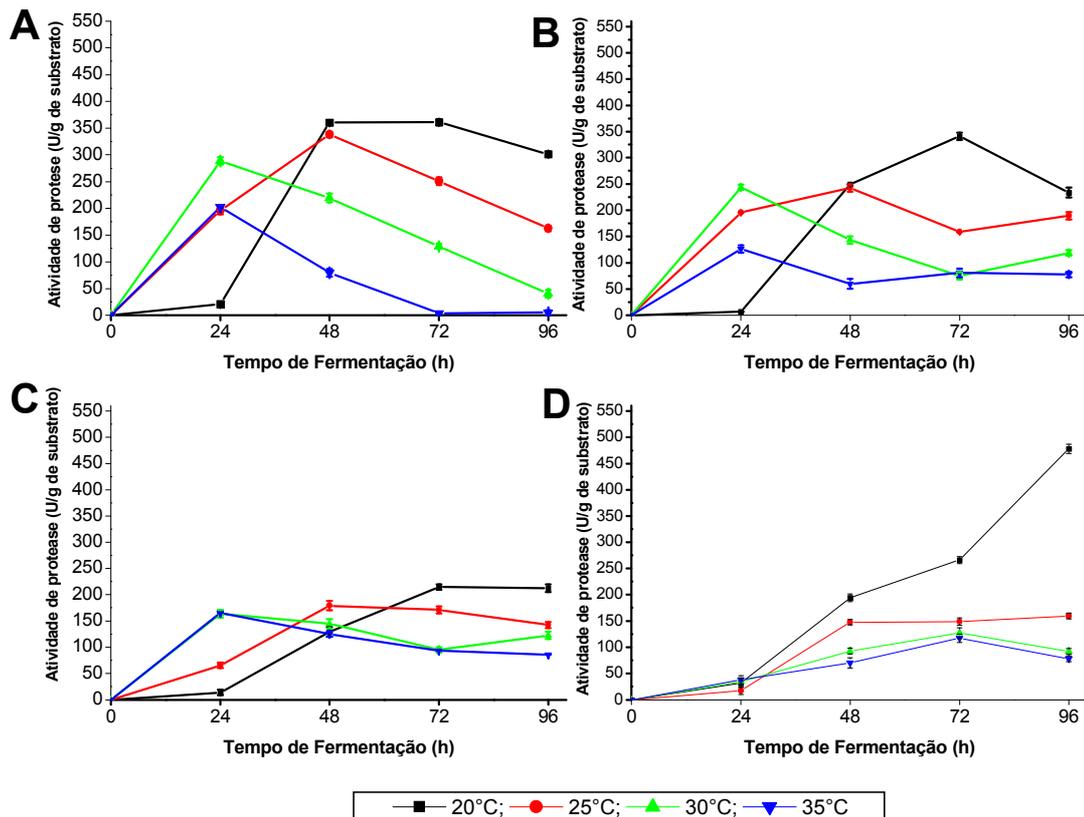


Figura 4.3 – Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de protease utilizando diferentes resíduos como substrato: farelo de trigo (A), farelo de algodão (B) e torta de girassol (C) e torta de canola (D), com concentração de inóculo de  $10^7$  esporos/g de meio, 25 mL de água para cada 100 g de sólido, em condição estática.

Observa-se, que em todos os meios incubados a 25 °C, o pico de produção da enzima foi em 48 h de fermentação, a partir deste tempo fermentativo houve um decréscimo na produção da enzima, exceto o meio com torta de canola. Já os meios incubados nas temperaturas de 30 e 35 °C apresentaram pico de produção em 24 h, exceto os meios que utilizavam a torta de canola como substrato, onde estes apresentam máxima produção em 72 h de fermentação (Figura 4.3B).

Os maiores valores de atividade proteolítica foram observados nos meios incubados a 20 °C em todos os substratos avaliados, o meio utilizando a torta de girassol como substrato apresentou uma produção de 212 U/g de protease com 96 h, o farelo de algodão e o farelo de trigo apresentaram máxima atividade de protease em 72 h de processo fermentativo com 340 e 361 U/g, respectivamente. Já o meio contendo a torta de canola como substrato apresentou a maior produção de protease comparada aos demais substratos, com 477 U/g em 96 h de fermentação (Figura 4.3D). A torta de canola e farelo de trigo são substrato rico em proteína e carboidratos, apresentam propriedades físicas como textura e porosidade que favorecem a FSS (DIVAKAR *et al.*, 2006; FREITAS, 2009; SILVEIRA e FURLONG, 2007), características que favoreceram a elevada atividade enzimática proteolítica.

A temperatura de incubação é considerada um fator importante na FSS, pois interfere no crescimento celular, formação de esporos, germinação e fisiologia do micro-organismo, em geral afeta a formação do produto, pois cada micro-organismo apresenta particularidades nas condições de cultivo (KAPNOOR E MULIMANI, 2010; BANERJEE, MUKHERJEE e PATRA, 2005; GUERARD, GUIMAS e BINET, 2002).

Thanapimmetha *et al.*, (2012) investigaram o efeito da temperatura sobre a produção de protease por *A. oryzae* cultivado em FSS usando a torta de sementes de *Jatropha curcas* como substrato. A temperatura ótima para a produção de protease foi de 30 °C, e houve uma redução drástica na produção da enzima quando a temperatura de incubação foi aumentada para 35 °C. Vishwanatha *et al.*, (2010) estudaram a produção de proteases por *A. oryzae* MTCC 5341 por FSS de farelo de trigo, constatou que a temperatura de incubação durante o crescimento teve uma influência significativa na produção de protease. Sendo a temperatura ótima para o crescimento do fungo e para a produção de protease de 30 °C, enquanto que uma temperatura de 25 °C era sub-ótima para o crescimento, e que o crescimento microbiano parou em temperaturas acima de 35 °C.

Diante dos resultados, estabeleceu-se como ideal para o cultivo do fungo *A. oryzae* CCBP 001 e para a produção de protease nas próximas etapas deste estudo a utilização da torta de canola como substrato e temperatura de incubação de 20 °C. Estes experimentos foram importantes porque proporcionaram um conhecimento da temperatura ótima de cultivo de *A. oryzae* CCBP 001 e observar o perfil de produção de protease em diferentes temperaturas de incubação.

#### 4.2 Suplementações dos meios com fonte de carbono e nitrogênio inorgânico

Após a etapa de seleção do substrato, avaliou-se a influência da suplementação da torta de canola com 1% (m/v) de glicose com fonte de carbono e 7,5% (m/v) de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, suplementados individualmente em relação ao meio sólido. A Figura 4.4 apresenta os resultados dos meios suplementados e da fermentação controle (torta de canola e água destilada). A produção de protease foi crescente ao longo do processo fermentativo, apresentado os maiores valores de atividade em todas as condições avaliadas no maior tempo amostral (96 h). Os meios suplementados com extrato de levedura, glicose e meio controle apresentaram uma produção de protease em 96 h de fermentação de 317, 245 e 290 U/g, respectivamente. Portanto, sugere-se que a diferença de atividade do meio controle em relação aos meios suplementados foi insuficiente para compensar os gastos financeiros com a suplementação do meio, uma vez que a torta de canola umidificada apresenta valores de atividade superior aos meios suplementados durante 72 h de fermentação (Figura 4.4).

Existem vários estudos mostrando que diferentes fontes de carbono e nitrogênio inorgânico apresentam diferentes influências na produção de enzimas extracelulares por fungos (BENAZIR *et al.*, 2011; NEHRA *et al.*, 2002; WANG e LEE, 1996). BENAZIR *et al.*, (2011) afirma que o mecanismo de formação de enzimas extracelulares é influenciada pela disponibilidade destes precursores para a síntese de proteínas.

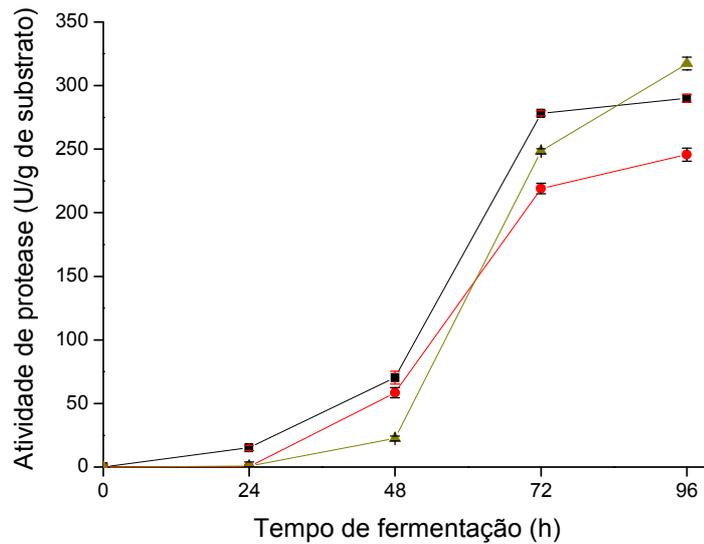


Figura 4.4 – Atividade proteolítica em função do tempo de fermentação em meio torta de canola (■ - controle), torta de canola suplementada com 1% (m/v) de extrato de levedura (▲) e torta de canola suplementada com 7,5% (m/v) de glicose (●), concentração de inóculo de  $10^7$  esporos/g de meio, temperatura de incubação de 20 °C, em condição estática.

Diante destes resultados, determinou-se a não suplementação do meio fermentativo nas etapas posteriores, utilizando apenas torta de canola e água na formulação do meio de fermentação, na temperatura de incubação de 20 °C e tempo fermentativo de 96 h.

### 4.3 FSS em biorreator de coluna instrumentado e frascos Erlenmeyers

A literatura é ampla em estudos que avaliam as variáveis temperatura e atividade de água, bem como estas influenciam na atividade microbiana, principalmente no seu crescimento e na produção de enzimas. Entretanto, a maioria dos estudos sobre a influência da temperatura na atividade microbiana em FSS, enfoca a influência desta variável ambiental em sistema sem monitoramento. Estudos com monitoramento de variáveis operacionais, em processo FSS são mais escassos. Nesta etapa do estudo da produção de protease, os experimentos foram realizados em biorreator de colunas monitorando a umidade do ar e vazão do ar durante o processo fermentativo.

### 4.3.1 Seleção das variáveis

Utilizou-se um planejamento experimental para estudar as melhores condições operacionais e umidade do substrato. Inicialmente, realizou-se um planejamento fatorial completo e avaliou-se o efeito de 3 variáveis independentes: umidade do substrato (g/100g de substrato), umidade do ar (%) e vazão do ar (mL/min) através de um delineamento  $2^3$ , com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Os valores das variáveis independentes (codificadas e reais) e a resposta para atividade enzimática de protease após 96 h de FSS utilizando a torta de canola como substrato são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Matriz experimental com os valores das variáveis independentes e variável resposta para a produção de protease utilizando torta de canola como substrato

Ensaio	Variáveis			Atividade de protease (U/g)*
	Umidade relativa do ar <sup>1</sup> (X <sub>1</sub> )	Fluxo de ar <sup>2</sup> (X <sub>2</sub> )	Umidade do substrato <sup>3</sup> (X <sub>3</sub> )	
1	-1 (60)	-1 (12)	-1 (30)	244,1 ± 3,1
2	1 (80)	-1 (12)	-1 (30)	305,5 ± 1,6
3	-1 (60)	1 (36)	-1 (30)	195,3 ± 3,12
4	1 (80)	1 (36)	-1 (30)	284,2 ± 4,3
5	-1 (60)	-1 (12)	1 (50)	259,4 ± 4,5
6	1 (80)	-1 (12)	1 (50)	355,5 ± 2,6
7	-1 (60)	1 (36)	1 (50)	261,4 ± 3,9
8	1 (80)	1 (36)	1 (50)	355,3 ± 1,4
9	0 (70)	0 (24)	0 (40)	295,0 ± 5,02
10	0 (70)	0 (24)	0 (40)	294,4 ± 5,3
11	0 (70)	0 (24)	0 (40)	285,3 ± 7,1

<sup>1</sup>Umidade relativa do ar (%); <sup>2</sup>fluxo de ar (mL/min); <sup>3</sup>Umidade do substrato g/100g de substrato, \* atividade de protease (U/g) em base úmida.

Pode-se notar que os valores da atividade de protease variaram entre 195,3 e 355,5 U/g, observou-se que o máximo valor de produção enzimática proteolítica alcançado foi de 355 U/g, quando o reator estava operando nas condições de máxima umidade relativa do ar e umidade do substrato, variando apenas a vazão do ar em valores de máximo e mínimo testados (ensaios 6 e 8). Estes resultados mostraram que a vazão do ar não interferiu em uma maior produção de protease.

Obteve-se um aumento de 20% na produção da enzima, mudando apenas a umidade relativa do ar nos ensaios 1 e 2, com 60 e 80%, respectivamente. Com as mesmas condições de umidade inicial do substrato (30 mL/100 g de substrato) e fluxo de ar (12 mL/min).

A Tabela 4.2 apresenta os resultados dos efeitos, erro padrão e valores de t e p-valor para a atividade de protease. Neste experimento, as variáveis umidade relativa e vazão do ar, umidade do substrato e a interação da vazão com a umidade do substrato foram consideradas significativas. Já a interação umidade relativa do ar com a vazão e com umidade do substrato não mostraram efeito significativo na produção da enzima protease com confiança de significância de 90%. As variáveis umidade relativa do ar e umidade do substrato apresentaram efeito positivo sobre a atividade de protease, porém o aumento da vazão apresentou efeito negativo dentro da faixa estudada (12 a 36 mL/min) indicando que maiores valores de atividade de protease são atingidos com menores taxa de vazão.

Tabela 4.2- Efeitos dos valores estudados no planejamento  $2^3$  sobre a atividade de protease realizado a 20 °C em reator instrumentado

<b>Fatores</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(3)</b>	<b>p-valor</b>
Média	285,03	2,66	106,83	0,000002
Umidade relativa do ar - $X_1$	85,08	6,26	13,59	0,000860
Vazão - $X_2$	-17,03	6,26	-2,72	0,072
Umidade do substrato - $X_3$	50,63	6,26	8,09	0,003
$X_1 \times X_2$	6,33	6,26	1,01	0,38
$X_1 \times X_3$	9,92	6,26	1,58	0,21
$X_2 \times X_3$	17,96	6,26	2,87	0,06

Nível de confiança = 90%; p-valor  $\leq$  0,1

O coeficiente de determinação foi igual a 97%, e o teste o teste F, mostra que o valor do F calculado foi 8,8 vezes maior ao valor tabelado. A falta de ajusta não foi significativa (Tabela 4.3). Estes dados indicam que o modelo é muito bem ajustado aos resultados experimentais.

Tabela 4.3 – Análise de variância para atividade proteolítica do planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	20828,23	4	5207,06	80,7
Resíduo	387,15	6	64,53	
Falta de ajuste	563,26	4	140,82	4,79
Erro puro	58,79	2	29,4	
Total	21450,28	10		

$R^2 = 97\%$ ,  $F(4; 6; 0,1) = 9,15$ ;  $p$  valor = 0,000002

A utilização do fluxo de ar elevado resultou no ressecamento do meio de cultivo, como podem ser observados nas partes escuras das Figuras ilustrativas 4.5A, 4.5C e 4.5E, quando o reator estava operando com 24 e 36 mL/min. Já as Figuras 4.5B e 4.5D mostra que quando utilizou-se o volume de 12 mL/min de fluxo de ar, o ressecamento do meio não foi observado.

Farinas *et al.* (2011) realizaram estudo da produção de endoglucanases, nas mesmas condições operacionais de umidade relativa do ar e taxa vazão deste trabalho e umidade do substrato mais elevada, também foi observado o efeito negativo na taxa de vazão e efeito positivo na umidade inicial do substrato. ZÚÑICA (2010) também avaliou a influência das variáveis umidade inicial do substrato, umidade relativa do ar e vazão na produção de FPase e CMCase e verificou que em relação a vazão do ar no reator, esta não mostrou significância estatística no intervalo de 15 a 45 mL/min.

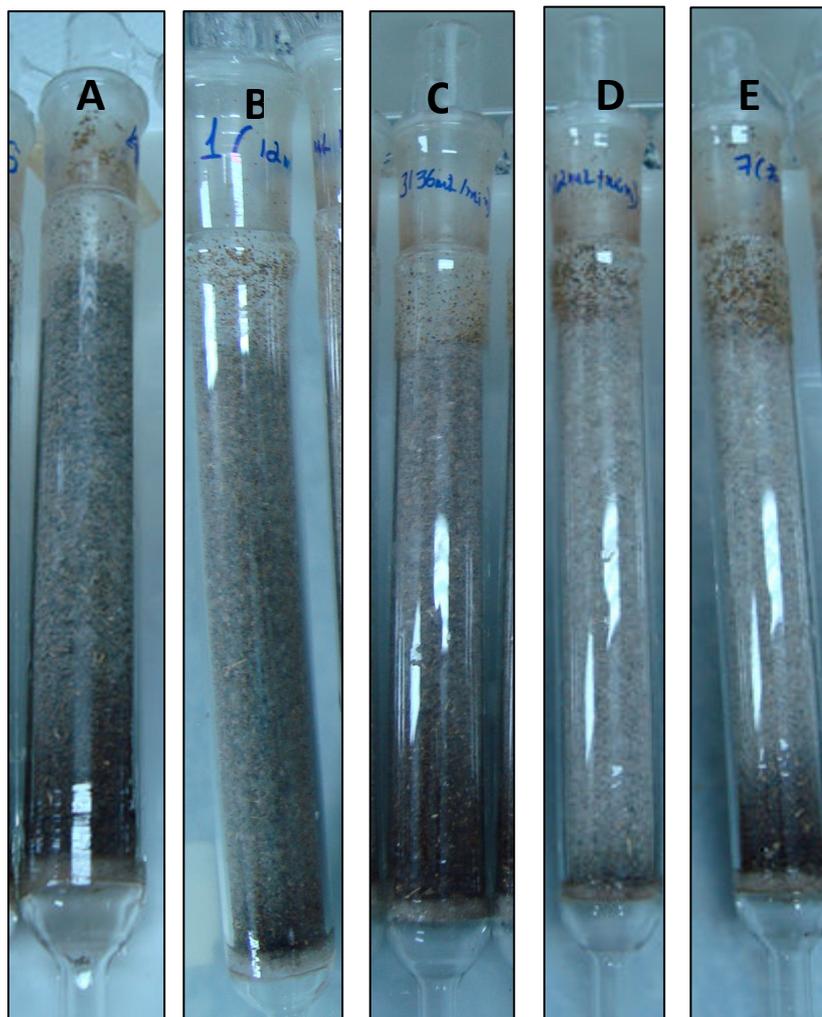


Figura 4.5 – Colunas com meio fermentados em diferentes condições de fluxo de ar, umidade do ar e umidade do substrato: A – umidade do ar: 70%, umidade do substrato 40% e vazão do ar: 24 mL/min; B – umidade do ar: 60%, umidade do substrato 50% e vazão do ar: 12 mL/min; C – umidade do ar: 60%, umidade do substrato 50% e vazão do ar: 36 mL/min e D – umidade do ar: 80%, umidade do substrato 50% e vazão do ar: 12 mL/min; E - umidade do ar: 80%, umidade do substrato 50% e vazão do ar: 36 mL/min.

A quantificação da liberação de CO<sub>2</sub> e consumo de O<sub>2</sub> tem sido utilizada por vários autores como medida indireta do crescimento microbiano e a sua relação com a síntese de biomoléculas (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; SPIER *et al.*, 2007). A Figura 4.6 apresenta os resultados da liberação de CO<sub>2</sub> durante 96 h de processo fermentativo nas diferentes condições de umidade do substrato, umidade do ar e fluxo do ar. Observa-se que nas primeiras horas de fermentação a liberação de CO<sub>2</sub> é pequena, apresentando valores mais expressivos a partir de 16 horas de fermentação. Quando os meios foram submetidos a mesmas condições de umidade do substrato e umidade do ar, variando apenas a vazão, foi possível observar uma maior liberação de CO<sub>2</sub> nos meios incubados com taxa de 12 ml/min de fluxo de ar. O maior pico de liberação de CO<sub>2</sub> ocorreu no meio incubado com 60% de umidade relativa do ar, 50% de umidade do substrato e 12 mL/min com 35 h de fermentação (2,9%). Zúñiga (2010) avaliou a produção de celulases por *Aspergillus niger* em reator de colunas nas condições de 80% de umidade relativa do ar e 30 mL/min de fluxo de ar e observou o pico de liberação de CO<sub>2</sub> (1,0%) em 12 h de processo fermentativo.

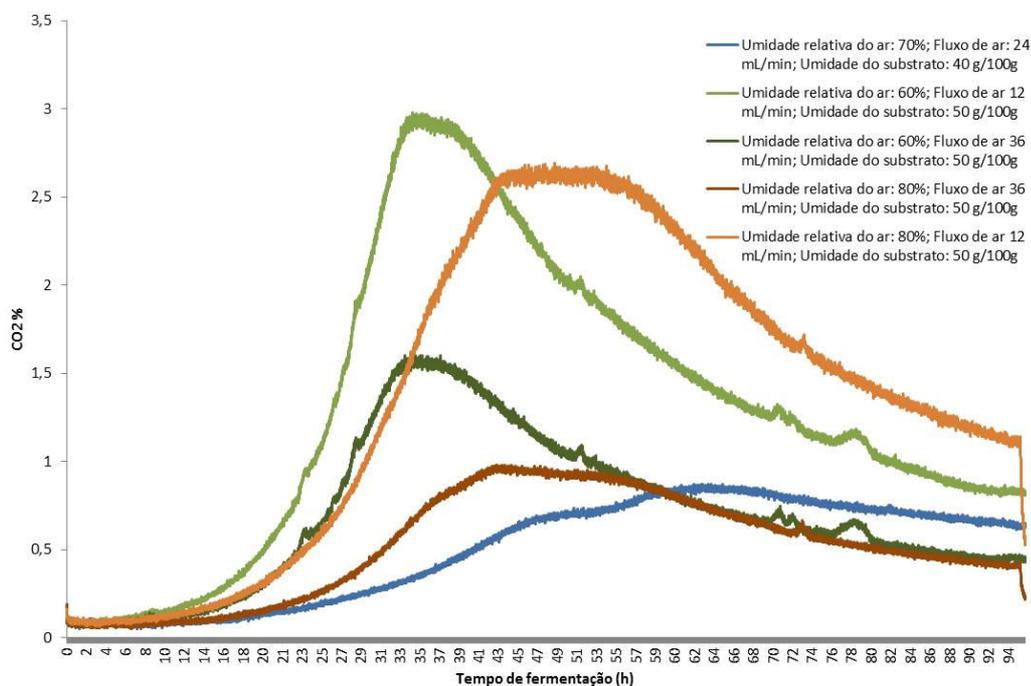


Figura 4.6 – Evolução de CO<sub>2</sub> durante a FSS em diferentes condições de umidade inicial do substrato e umidade relativa do ar.

Para diminuir os problemas de ressecamento do meio durante o processo fermentativo, favorece o crescimento do fungo e elevação da atividade de protease, seria necessário testar volumes menores de vazão ar ou aumentar o diâmetro das colunas para diminuir o impacto do volume de fluxo de ar sobre o meio durante o processo fermentativo, mas por indisponibilidade de colunas com estas características e devido limitações do equipamento de operar com taxa de vazão inferior a 12 mL/min, nas etapas seguintes fixou-se o valor da taxa de vazão em 12 mL/min e avaliou-se as variáveis independentes: umidade do ar e umidade do substrato em um delineamento composto central rotacional.

#### **4.3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)**

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, desenvolveu-se um DCCR com a finalidade de otimizar a produção de protease. A matriz dos experimentos com valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como as respostas obtidas para a atividade de protease, a atividade de protease predita pelo modelo, erro relativo e a estimativa da biomassa (teor de glicosamina) estão apresentados na Tabela 4.4. Os experimentos foram realizados utilizando vazão do ar de 12 mL/min, substrato torta de canola e tempo fermentativo de 96 h.

Observou-se que os valores da variável resposta para a atividade proteolítica apresentaram valores variando entre 38,75 e 337,81 U/g, apresentando variações próximas aos valores previstos pelo modelo, que é confirmado pelos valores do erro relativo. Os maiores valores de atividade obtidos ocorreram quando a umidade do substrato estava em 30% (ensaios 5, 6, 9 10 e 11), nos ensaios 2 e 4 onde os meios apresentavam umidade inicial do substrato de 40% obtiveram atividade de 313,44 e 307,81 U/g com reator operando em umidade relativa do ar de 70 e 90%, respectivamente. Nos ensaios 5 e 6, o reator operava nas condições nos pontos axiais (-1,41 e 1,41, respectivamente) para a variável umidade do ar e 30% de umidade do substrato para ambos os ensaios, apresentaram atividade de protease de 337,1 U/g (ensaio 6) e 334U/g (ensaio 5), portanto verifica-se que a umidade inicial do substrato foi determinante na obtenção de elevadas atividade de protease.

Tabela 4.4 – Matriz do DCCR com variáveis reais e codificadas, valores preditos pelo modelo e desvios relativos para a atividade de protease e variável resposta da estimativa de biomassa, em reator de colunas a 20 °C durante 96 h de fermentação

Ensaio	Umidade Relativa do ar (X <sub>1</sub> ) <sup>1</sup>	Umidade do Substrato (X <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	Atividade de protease (U/g) <sup>3</sup>	Atividade de Protease predita <sup>4</sup>	Erro relativo (%) <sup>5</sup>	Estimativa da biomassa (mg/g)
1	-1 (70)	-1 (20)	131,88 ± 5,67	136,29	- 3,34	2,46 ± 0,64
2	-1 (70)	1 (40)	313,44 ± 6,51	323,37	- 3,16	9,33 ± 0,71
3	1 (90)	-1 (20)	222,0 ± 5,63	206,72	6,88	5,63 ± 0,57
4	1 (90)	1 (40)	307,81 ± 3,86	298,06	3,16	8,93 ± 0,26
5	-1,41 (66)	0 (30)	333,75 ± 6,83	322,50	3,37	10,3 ± 0,89
6	1,41 (94)	0 (30)	337,81 ± 7,06	354,40	- 4,91	9,14 ± 0,46
7	0 (80)	-1,41 (16)	38,75 ± 2,5	45,33	-16,98	3,92 ± 0,94
8	0 (80)	1,41 (44)	243,44 ± 6,02	242,20	0,50	10,8 ± 0,71
9 (C)	0 (80)	0 (30)	329,38 ± 2,4	326,44	0,89	8,73 ± 0,47
10 (C)	0 (80)	0 (30)	329,93 ± 3,1	326,44	1,06	11,1 ± 0,94
11 (C)	0 (80)	0 (30)	320,0 ± 6,04	326,44	-2,01	10,9 ± 0,71

<sup>1</sup> Umidade relativa do ar (%); <sup>2</sup> Umidade do substrato (g/100g de torta de canola); <sup>3</sup> Atividade de protease (U/g) em base úmida; <sup>4</sup> Atividade de protease preditos pelo modelo obtido após análise no programa Statistica; <sup>5</sup> Erro relativo = (resposta experimental – resposta predita pelo modelo/resposta experimental)\*100.

Todos os ensaios apresentaram desvio relativo abaixo de 7% para os valores de atividade de protease, indicando uma boa reprodutibilidade do processo. A biomassa foi quantificada através do conteúdo de glicosamina presente na parede celular dos fungos. Os valores máximos quantificados ocorreram nos experimentos 10 e 11 (11,1 e 10,9 mg/g, respectivamente) que representam os pontos centrais do planejamento, sendo estes os ensaios que apresentaram os maiores valores de atividade de protease.

Realizou-se a avaliação dos resultados pelo cálculo dos coeficientes de regressão e o modelo matemático que descrevem a influência das condições experimentais sobre a variável resposta (atividade de protease e estimativa de biomassa). Os coeficientes permitiram determinar a significância estatística das

variáveis avaliadas e constituir um modelo empírico com termos lineares e quadráticos para a produção de protease e quantificação da biomassa.

A Tabela 4.5 apresenta os coeficientes de regressão, Erro Padrão e o p-valor com significância estatística a 90% para as variáveis resposta atividade de protease e estimativa da biomassa. Os coeficientes lineares positivos indicam a direta relação entre a atividade de protease com as variáveis avaliadas, já os efeitos negativos sugerem a relação inversa. Todos os termos avaliados para variável resposta atividade de protease foram significativos para a atividade de protease, exceto o termo quadrático umidade relativa do ar. Já para a variável resposta estimativa de biomassa, os termos significativos foram umidade do substrato linear e quadrático.

Tabela 4.5 – Resultados dos coeficientes de regressão, valores de t e p-valor do DCCR

Atividade de protease					Estimativa de biomassa			
Fatores	Regressão	Erro			Regressão	Erro		
		Padrão	t (5)	p-valor		Padrão	t (5)	p-valor
Média	326,45	7,98	40,89	0,00	10,21	0,94	10,87	0,00014
X <sub>1</sub> (L)	11,28	4,89	2,31	0,06	0,14	0,58	0,26	0,81
X <sub>1</sub> (Q)	6,01	5,82	1,03	0,34	-0,73	0,68	-1,07	0,33
X <sub>2</sub> (L)	69,61	4,88	14,24	0,000031	2,47	0,58	4,31	0,007
X <sub>2</sub> (Q)	-91,33	5,82	15,69	0,000019	-1,92	0,68	-2,81	0,03
X <sub>1</sub> (L)×X <sub>2</sub> (L)	-23,94	6,91	-3,46	0,02	-0,89	0,81	-1,09	0,32

X<sub>1</sub>: Umidade relativa do ar; X<sub>2</sub>: Umidade do substrato; Nível de confiança = 90%; p-valor ≤ 0,1

As Equações 4.1 e 4.2 representam os modelos codificados ajustada das funções respostas para a atividade de protease e a estimativa de biomassa, respectivamente.

$$\text{Protease (U/g)} = 326,45 + 11,28X_1 + 69,61X_2 - 91,33X_2^2 - 23,94X_1X_2 \quad \text{Equação 4.1}$$

$$\text{Estimativa de biomassa (mg/g)} = 10,21 + 2,47X_2 - 1,92X_2^2 \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde os valores codificados:

$$X_1 = \text{Umidade relativa do ar (\%)}$$

$$X_2 = \text{Umidade do substrato (\%)}$$

Para a construção do modelo reduzido para variável resposta atividade de protease (Equação 4.1), os parâmetros considerados como significativos ( $p < 0,1$ ) foram: umidade relativa do ar linear, componente linear e quadrático da umidade do substrato e a interação entre a umidade do ar linear e umidade do substrato linear. Na Equação 4.2, os parâmetros considerados como significativos ( $p < 0,1$ ) foram: os componentes linear e quadrático da umidade do substrato. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA). O modelo foi submetido ao processo de validação pela ANOVA para o cálculo do valor F (Teste Fisher) de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - ANOVA do modelo quadrático para a predição da atividade de protease (U/g) e estimativa de biomassa (mg/g) variando a umidade relativa do ar e a umidade do substrato

Fatores	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados	F <sub>calc</sub>	p<0,1
<b>Atividade de Protease (AP)</b>					
Regressão	95652,79	4	23913,19	123,74	0,00001
Resíduo	1159,51	6	193,25		
Falta de ajuste	1097,21	4	274,3	8,8	0,11
Erro puro	62,30	2	31,15		
Total	96812,3	10			
<b>Estimativa da biomassa (EB)</b>					
Regressão	67,11	2	33,56	13,64	0,0001
Resíduo	19,68	8	2,46		
Falta de ajuste	16,36	6	2,73	1,66	0,43
Erro puro	3,32	2	1,64		
Total	86,79	10			
AP: $R^2 = 98,8\%$ ; $F_{\text{tab}(4; 6; 0,1)} = 9,15$ EB: $R^2 = 77,3\%$ ; $F_{\text{tab}(2; 8; 0,1)} = 8,65$					

A verificação dos resultados na Tabela 4.5 mostra a superioridade no valor de F calculado frente ao do F tabelado das variáveis resposta, fato que valida o modelo

na região estudada com 90% de confiança. O valor de  $R^2$  de 98,8% para a atividade de protease mostra que o modelo se ajusta bem aos resultados experimentais. Já variável resposta estimativa da biomassa a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi de 77,3%, este valor de  $R^2$  foi considerado bom, devido a grande variabilidade inerente ao processo fermentativo. Não houve falta de ajuste para as variáveis respostas atividade de protease e estimativa de biomassa, indicando que a estimativa de variância está correta.

As superfícies de resposta resultantes dos modelos (Equações 4.1 e 4.2) para a atividade de protease e estimativa de biomassa são apresentadas nas Figuras 4.7 A e 4.7 B, respectivamente. Na Figura 4.7A mostra o efeito da umidade do ar e a umidade inicial do substrato sobre a atividade de protease, onde pode-se observar que o estudo das condições de umidade do substrato foi decisivo para a produção de protease, que resultaram em maior valor de atividade, e que a faixa ótima para produção da enzima é de 30 a 40% de umidade do substrato independente da umidade relativa do ar (66 a 94%). Para o parâmetro umidade do ar, os níveis de máximo e mínimo avaliados não influenciaram expressivamente nos resultados da função resposta, ou seja, o deslocamento na direção de máximo ascendente ou mínimo descendente não provocou o decréscimo da atividade de protease.

A Figura 4.7B mostra o efeito da umidade do ar e umidade do substrato sobre a estimativa da biomassa, observa-se que as condições de maior estimativa de biomassa foram determinadas nas condições utilizadas no ponto central para a variável umidade do substrato (80%) e ponto central (30%) e nível +1(40%), pontos experimentais onde se obteve os maiores valores de atividade de protease, o que mostra a relação direta entre a atividade de protease e o crescimento do fungo.

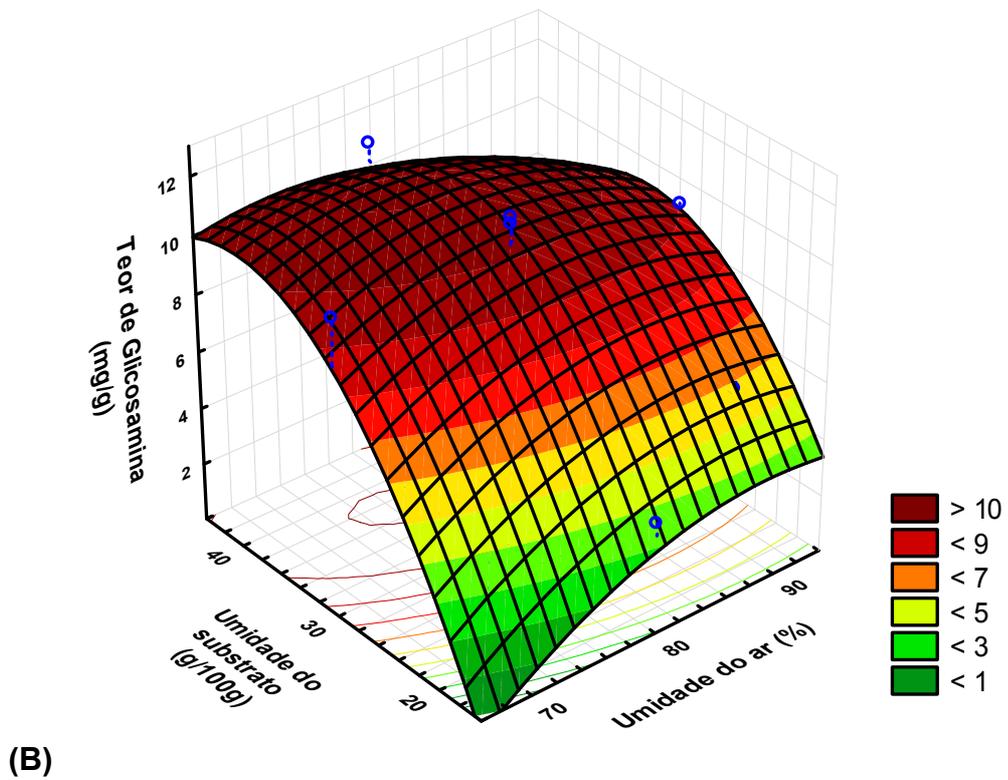
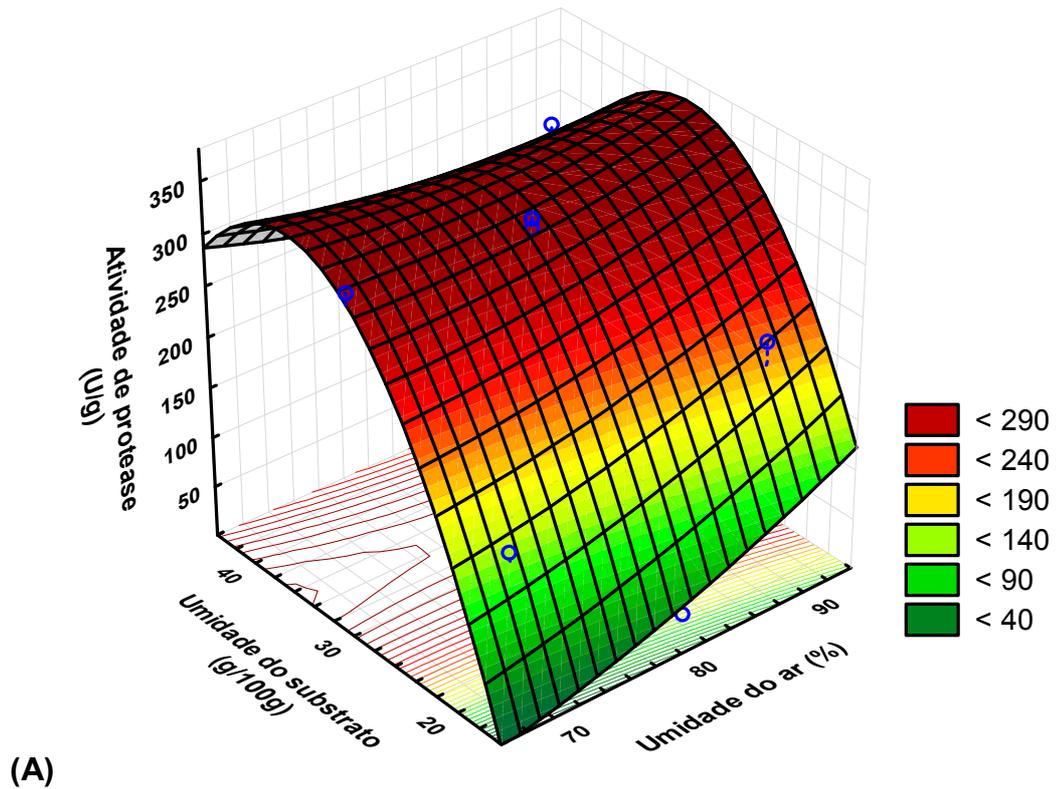


Figura 4.7 – superfície de resposta para a atividade de protease (A) e estimativa de biomassa (B) em função da umidade relativa do ar e umidade do substrato, em reator de colunas a 20 °C durante 96 h de fermentação.

### 4.3.3 Cinética fermentativa e acompanhamento de CO<sub>2</sub>

A produção de protease neste experimento foi realizada em condições dinâmicas no reator de colunas instrumentado com vazão do ar de 12 mL/min, umidade inicial do substrato de 30% e umidade relativa do ar de 100%. E para fins comparativos realizou-se experimentos utilizando umidade inicial do substrato 30% em condições estáticas em frasco Erlenmeyer, durante 240 h de processo fermentativo. Estas condições foram estabelecidas pela análise dos resultados do item 4.3.2. Durante 10 dias foram acompanhada a produção de protease (Figura 4.8) e a liberação de CO<sub>2</sub> (Figura 4.9).

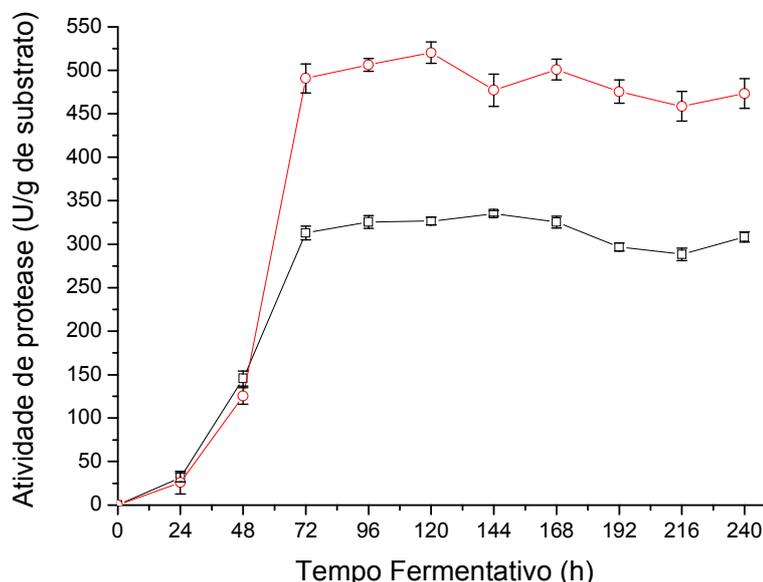


Figura 4.8 – Cinética fermentativa da produção de protease em reator de colunas (vazão do ar de 12 mL/min e umidade relativa do ar 100%) ( □ ) e frascos Erlenmeyers ( ○ ) 30% de umidade inicial do substrato e temperatura de incubação de 20 °C.

A produção de protease em 24 h foi de 25 U/g em condições estáticas e 31 U/g em condições dinâmicas, a atividade apresentou-se de forma crescente até 144 h (335 U/g) nos meios incubados em reator de colunas e de 120 h (520 U/g) para os meios incubados em Erlenmeyers, a partir destes tempos a produção apresentou decréscimo na atividade enzimática até o término da fermentação.

Em condições estáticas, a produção de protease em foi maior quando comparados com a atividade proteolítica dos meios incubados em reator de colunas.

A atividade proteolítica obtida no reator de colunas pode ter sido prejudicada devido o pequeno diâmetro da coluna, sendo necessário um aumento desta, na tentativa de minimizar os possíveis problemas que a aeração pode causar sobre o micélio do fungo durante o processo fermentativo, ou trabalhar com reator operando com fluxo de ar menor que 12 mL/min. Em relação à literatura, alguns autores verificaram um aumento na produção enzimática e crescimento microbiano em fermentação semi-sólida, quando utilizaram um maior nível de aeração (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003), já os autores Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010) e Zúñica (2010), obtiveram maiores valores de atividade de FPase e Xilanase, respectivamente, com o decréscimo da aeração. Portanto, pode-se dizer que a taxa de aeração ideal e seus efeito no ressecamento do meio e na fisiologia do fungo durante o processo fermentativo são específicos para cada bioprocessos.

Porém, mesmo apresentando uma maior conversão da enzima proteolítica, o escalonamento da produção nas condições estáticas só é possível por reator tipo leito fixo ou bandejas. Estes reatores apresentam desvantagens associadas à remoção de calor, que ocorre apenas por condução e os substratos sólidos apresentam baixa condutividade térmica, tornando o processo caro quando se opera em escala comercial, necessitando de equipamentos grandes e que apresentam elevada fração de vazios, e não possibilitam um controle adequado dos parâmetros de processo (LONSANE, *et al.*, 1992; PRABHAKAR *et al.*, 2005; RAIMBAULT, 1998).

Reatores fermentativos semi-sólido, operando em condições dinâmicas instrumentados, possibilitam um controle adequado dos parâmetros de processo, apresenta facilidade de amostragem, diminuição da ocupação espacial na ampliação de escala e podem ser utilizado para produção de diferentes metabólitos de interesse agroindustriais (LONSANE, *et al.*, 1992; SERMANNI e TISO, 2008). Além de favorecer a manutenção da temperatura e dissipação do CO<sub>2</sub>, através da aeração forçada (RAGHAVARÃO *et al.*, 2003).

Na Figura 4.9 observou-se baixos valores de CO<sub>2</sub> no início do processo fermentativo, até 24 h, uma vez que nos tempos iniciais da fermentação o micro-organismo está adaptando-se ao meio, mas nos tempos entre 48 e 96 h observam-se a maior liberação de CO<sub>2</sub>. A maior concentração foi de 3,5% entre 24 e 48 h de fermentação. A partir deste pico, há decréscimo na quantidade de CO<sub>2</sub> liberado até

192 h, onde permanece constante (0,5%) até o término do processo fermentativo, mostrando que o fungo permanece respirando. O pico de produção nas condições dinâmicas (335 U/g) em 144 h que correspondeu a uma geração de aproximadamente 1% de CO<sub>2</sub>. Os resultados mostram que a síntese da enzima em maior concentração ocorre após a máxima produção de biomassa microbiana (Figura 4.9). Villegas *et al.*, (1993) observaram em seus estudos que a produção de protease por *A. niger* em FSS foi fortemente relacionada com a atividade metabólica representada pelo total de CO<sub>2</sub> produzido durante a fermentação.

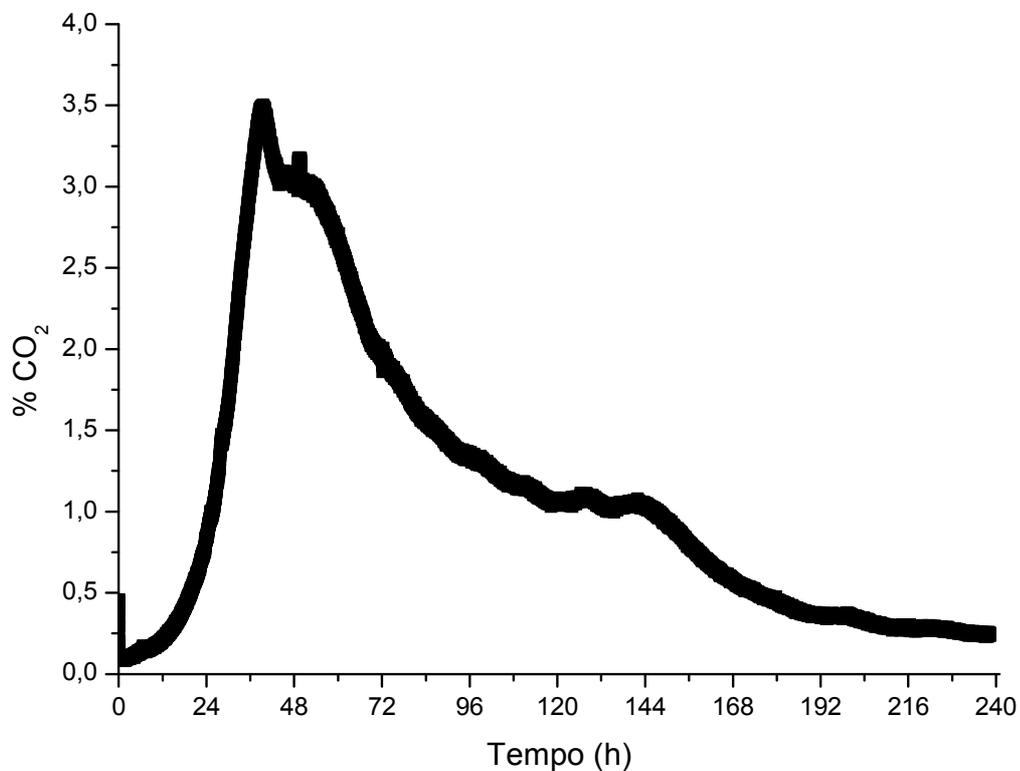


Figura 4.9 – Evolução de CO<sub>2</sub> durante a FSS nas condições de umidade inicial do substrato de 30%, vazão do ar de 12 mL/min e 100% de umidade relativa do ar, em condições dinâmicas a 20 °C.

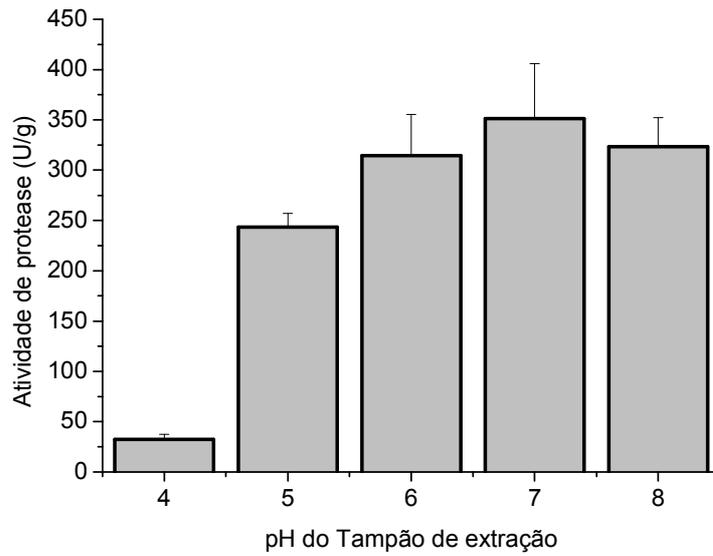
#### 4.4 Estudo da influência do pH na extração e na atividade da protease

Nas Figuras 10A e 10B estão representados os valores da atividade de protease nos diferentes pH do tampão de extração da enzima do meio fermentado (Figura 10A) e do tampão diluente da azocaseína (substrato utilizado na metodologia de determinação da atividade proteolítica) (Figura 10B).

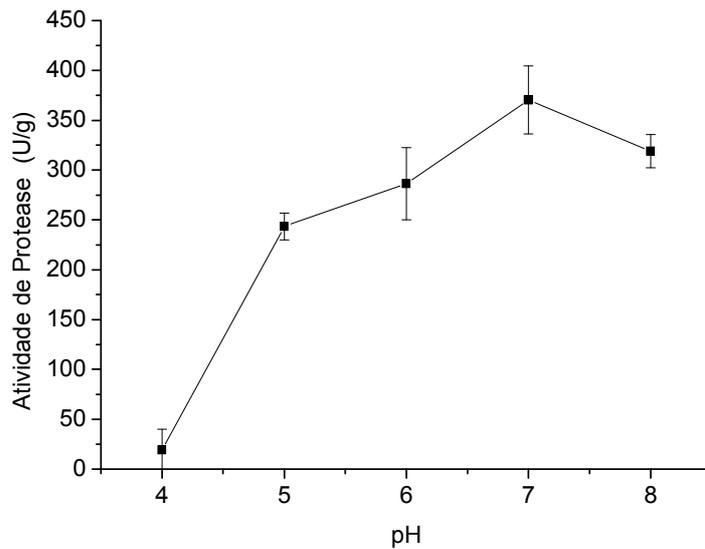
Foi possível obter uma elevada recuperação da protease produzida em todos os valores de pH do tampão de extração avaliados, com a exceção do pH 4,0 (Figura 10A). A melhor recuperação (354,3 U/g) foi obtida utilizando tampão fosfato de sódio em pH 7,0. Ikasari e Mitchell (1996), também observaram uma maior recuperação da protease produzida por *Rhizopus oligosporus* por FSS no farelo de arroz, quando o pH da solução de extração foi aumentado, atingindo uma atividade máxima em pH 7.

A atividade enzimática é fortemente influenciado pelo pH, uma vez que os sítios ativos das enzimas são muitas vezes compostos por grupos iônicos, cuja conformação deve ser mantida, para permitir com sucesso a ligação com o substrato e, portanto, permitir a reação ocorra (SEGEL, 1993).

O substrato geralmente possui um ou mais grupos iônicos que se podem ligar preferencialmente a enzima. A influência do pH sobre a atividade de protease foi avaliado através de ensaios de atividade entre pH 4,0-8,0 (Figura 10B). A atividade proteolítica máxima (371 U/g) ocorreu no pH 7,0, caracterizando a enzima produzida como uma protease neutra. De acordo com Rao *et al.*, (1998), o fungo *A. oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas. Proteases ácidas fungicas têm um pH ótimo entre 4 e 4,5. Proteases neutras fungicas são mais ativos em pH 7,0, e dada a atividade peptidase acompanhante e sua capacidade específica para hidrolisar as ligações de aminoácidos hidrofóbicos, podem complementar a ação da planta, animal e proteases bacterianas na redução do sabor amargo dos alimentos hidrolisados proteicos.



(A)



(B)

Figura 10 – Efeito do pH na extração e determinação da atividade de protease.

A grande diversidade de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido é extensamente relatada na literatura, entre as quais pode-se mencionar proteases ácidas, alcalinas e neutras. Vishwanatha, Rao e Singh (2010), realizaram um estudo da estabilidade de uma protease produzida por *A. oryzae* MTCC 5341 e verificaram que a enzima manteve-se estável numa faixa de pH entre 2,5 - 6,5, com atividade máxima nos pH entre 3,0 e 4,0. Seong *et al.*, (2004) relataram que a

atividade máxima observada para a produção de proteases por *Streptomyces tendae* ocorreu em pH 6,0, mantendo-se estável numa faixa de 4,0-9,0. Ikasari e Mitchell (1996) avaliaram o efeito do pH da análise da atividade de uma protease produzida por *Rhizopus oligosporus* no intervalo entre 1,5 e 11 e observaram que a enzima apresenta atividade em pH entre 1,5 e 5,0, com atividade máxima a pH 2,0.

Os dados relatados na literatura são consistentes com os resultados obtidos no presente trabalho, especialmente no que diz respeito à estabilidade de protease em relação ao pH. Todos os resultados mostraram enzimas agindo na faixa de pH ácido, alcalino ou neutro.

#### **4.5 Determinações de massa molar do extrato enzimático proteolítico**

Com o intuito de determinar da massa molecular da protease presente no extrato enzimático de *A. oryzae* CCBP 001, utilizou-se uma técnica simples de purificação parcial, composta de precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações, diálise e liofilização. Após a obtenção do material liofilizado, realizou-se a zimografia e eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

##### **4.5.1 Zimografia**

Uma análise através de zimograma deste extrato enzimático foi realizada mostrando a existência de inúmeras bandas com atividade proteolítica quando coradas com azul de Coomassie-R250 (Figura 4.11). Uma elevada atividade proteolítica foi observada na região com massa molecular acima de 31 kDa , sugerindo a existência de inúmeras proteases nesta região. Foram também observadas 2 bandas bem definidas abaixo de 31 KDa, quando utilizou-se maior concentração do material (30 µL), indicando que existem no mínimo 3 proteases diferentes no extrato enzimático avaliado.

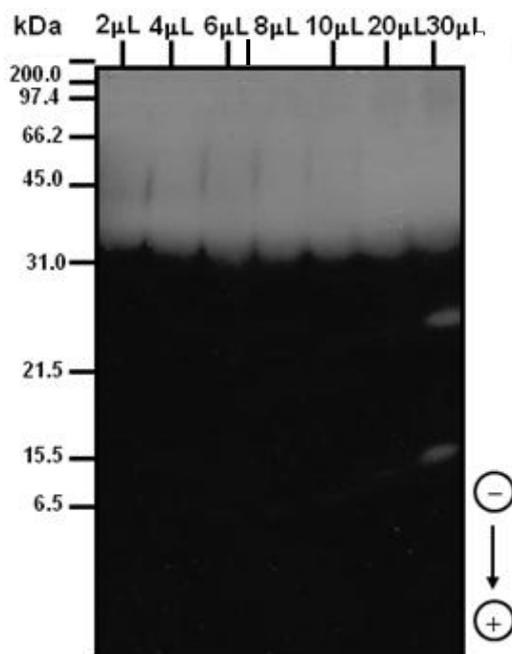


Figura 4.11 – Análise zimograma de gelatina feita por electroforese em gel SDS-PAGE em extrato bruto de *A. oryzae* CCBP 001 liofilizados. Condições experimentais: 15% (m/v) de poliacrilamida, pH 8,8, 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio, na presença de gelatina; volumes de 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 30  $\mu$ L. Os padrões de massa molecular (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram miosina (200,0 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbónica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (15,5 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

De acordo com Vishwanatha et al., (2009), o *A. oryzae* possui uma extensa série de genes hidrolíticos, incluindo 135 genes que codificam protease alcalina, ácida e neutra. Esta grande diversidade de genes, adicionado ao fato de as variações na glicosilação podem ocorrer dependendo das condições de cultivo, fornece uma explicação para a presença de diferentes proteases observados na análise zimograma.

Outras espécies de *Aspergillus* tem mostrado comportamento similar, com predominância das proteases com peso molecular acima de 31 KDa, como *A. nidulans* apresentando peso molecular de 42 kDa (CHARLES et al., 2008), *A. clavatus*, com 35 kDa (TREMACOLDI et al., 2007), *A. terreus*, com 37 kDa (CHAKRABARTI et al., 2000), *A. fumigatus*, com 124 kDa (WANG et al., 2005) e de

33 kDa (MONOD *et al.*, 1991). Sendo, também observados proteases em *Aspergillus* com peso molecular abaixo de 31 kDa, como o fungo *A. parasiticus* com 23 kDa (TUNGA *et al.*, 2003).

#### **4.5.2 Determinação da massa molar da protease produzida por *Aspergillus oryzae***

Eletroforese em gel desnaturante é uma ferramenta muito utilizada para caracterização de componentes protéicos e detecção de proteínas após separação do polipeptídeo desnaturado. A Figura 4.12 mostra o perfil eletroforético do extrato enzimático liofilizado bruto e as condições de saturação com sulfato de amônio de 20, 40, 60, 80 e 100%. Procedeu-se a separação das bandas de proteínas em SDS-PAGE (15%) da amostra bruta e as diferentes amostras em condições de saturação após a corrida, ambas coradas com azul de Coomassie (Figura 4.12 A) e nitrato de prata (Figura 4.12 B) que possibilitou a obtenção de até 4 bandas visíveis, com pesos moleculares que variaram entre 31 e 116,2 kDa (Figura 4.12 B). Destas bandas, 3 estão fortemente coradas em corante Coomassie (Figura 4.12 A) e 1 apresentam baixa intensidade, na condição de 60% de saturação. A coloração com nitrato de prata possibilitou a visualização de todas as bandas com maior intensidade. Esta diferença entre os métodos de coloração era esperada devido à maior sensibilidade da coloração com nitrato de prata que é capaz de detectar de 0,1 a 1,0 ng de proteína, enquanto a sensibilidade do azul de Coomassie é de 100 ng de proteínas (PATTON, 2002).

Dentre as condições de saturação avaliada e o extrato bruto, a condição que apresentou maior atividade de protease foi a de 60% de saturação, onde obtendo 3085,1 U, o que mostra a uma maior concentração das proteínas pelo método de precipitação com sulfato de amônio nesta condição.

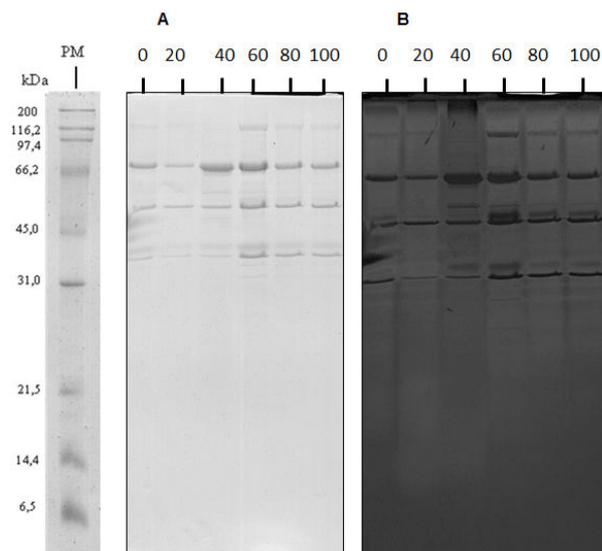


Figura 4.12 – Análise de SDS-PAGE de extrato de protease precipitados do com sulfato de amônio, dialisados e liofilizados, volume de 80  $\mu$ L. \*PM (peso molecular), 0 (extrato bruto) e 20, 40, 60, 80, 100% (frações proteicas do extrato enzimático saturadas com diferentes concentrações de sulfato de amônio), corado com azul de Comassie (A) e nitrato de prata (B).

#### 4.6 Determinação da atividade de coagulação do leite pelo extrato enzimático

Os extratos enzimáticos liofilizados obtidos do cultivo do fungo *Aspergillus oryzae* CCBP 001 nas condições de 40, 60, 80 e 100% de saturação com sulfato de amônio e o extrato bruto apresentaram atividade coagulante no leite quando submetidos ao teste de Berridge (1952). Porém, a amostra com 20% de saturação não apresentou coagulação, durante 5 horas de incubação.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados do tempo de coagulação, a atividade de protease e atividade específica da enzima, nas diferentes amostras. A coagulação com o extrato bruto ocorreu após 150 minutos de incubação, comprovando a atividade do extrato sobre as proteínas do leite. O tempo de coagulação decresceu de 25 para 5 minutos a partir da condição de saturação de 40 a 80% o que comprova a concentração da enzima pelo processo de precipitação com sulfato de amônio. Na amostra com 100% de saturação, o tempo de coagulação subiu para 10 minutos, apresentando uma atividade de protease de 2942,2 U e proteína total de 86,4 mg, quando comparado com 80%.

Tabela 4.7 - Atividade coagulante no leite do extrato enzimático bruto e das frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio

Amostra	Tempo de coagulação do leite (min)	Atividade total de protease (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)
Extrato bruto	150	431,1 ± 0,01	173,3 ± 0,01	2,5 ± 0,05
20% de saturação	-	706,3 ± 0,01	17,6 ± 0,01	40,2 ± 0,03
40% de saturação	25	1917,3 ± 0,01	167,8 ± 0,02	11,4 ± 0,03
60% de saturação	5	3085,1 ± 0,04	148,6 ± 0,03	20,8 ± 0,01
80% de saturação	5	3101,2 ± 0,08	119,9 ± 0,01	25,9 ± 0,01
100% de saturação	10	2942,2 ± 0,1	86,4 ± 0,08	34,1 ± 0,01

Muitas proteases extracelulares de origem microbiana atuam de forma semelhante a quimosina na sua capacidade para clivar os macro peptídeos caseína da k-caseína, o que desencadeia a desestabilização das micelas da caseína. Este mecanismo induz a coagulação do leite e pode, portanto, ser utilizado na produção de queijo (JACOB *et al.*, 2011).

Estes resultados demonstraram que o extrato proteolítico de *A. oryzae* CCBP 001 tem a capacidade de coagulação do leite, embora sejam necessários mais estudos sobre a qualidade da enzima e do produto formado, a fim de confirmar a sua utilidade na indústria de laticínios.

#### 4.7 Secagem do extrato enzimático

Com o objetivo de retirar a umidade e concentrar o extrato enzimático proteolítico extraído após o processo fermentativo, realizou a secagem do extrato em “spray dryer” para proteger a enzima da desnaturação que pode ocorrer durante o processo de secagem e manter a atividade enzimática do extrato enzimático seco por atomização, realizou-se inicialmente uma etapa de secagem utilizando adjuvantes: glicose, maltodextrina DE 5 e carboximetilcelulose, avaliados individualmente e posteriormente realizou-se um planejamento experimental para avaliar a interação em diferentes concentrações destes adjuvantes.

Os parâmetros de secagem, tais como, a temperatura de entrada do ar na câmara de secagem (110 °C), vazão de ar comprimido para a atomização (742 L/h), taxa de aspiração (90%) e vazão de alimentação da suspensão (0,1 L/h) foram determinados de acordo como as melhores condições de secagem realizadas por Namaldi, Çalik e Uludag (2006) na secagem da enzima protease alcalina serina. As concentrações dos adjuvantes glicose e maltodextrina, também foram observadas.

#### **4.7.1 Testes iniciais de secagem**

Inicialmente foi avaliada a necessidade do uso de adjuvante na secagem por “spray dryer” do extrato enzimático de protease, através de um experimento inicial, sem adição de adjuvante e comparou-se com os resultados obtidos com a adição de 1% (m/v) de glicose, 0,04% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC) ou 0,5% (m/v) de maltodextrina DE 5, adicionados individualmente. Avaliou-se a atividade de protease logo após o término do processo de secagem (zero hora de secagem), 2 e 4 dias após a secagem de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.8.

Em todos os experimento de secagem foi possível recolher o pó seco no coletor ao final do processo, no experimento controle (sem adição de adjuvante) uma parte do material injetado ficou aderido às paredes do ciclone e apresentou facilidade de absorção da umidade do ar. Já os experimentos com adição de adjuvantes foi possível recolher um material em pó no coletor com mais facilidade, sem aderência nas paredes do coletor. O experimento controle apresentou atividade de protease em 0 h de aproximadamente 1300 U/g, nos ensaios utilizando CMC e glicose a atividade foi de aproximadamente 1700 U/g e quando utilizou-se a maltodextrina DE 5 com adjuvante a atividade proteolítica foi de 1932 U/g.

O material seco foi armazenado a temperatura ambiente (~28°C) em recipiente de vidro, após 4 dias de secagem o experimento sem adição de adjuvante apresentou-se totalmente aderido as paredes do recipiente e apresentou uma perda de atividade de 22% comparada a atividade inicial. Nos experimentos utilizando adjuvantes os mesmos apresentaram facilidade de manuseio do pó durante a coleta da amostra para determinação da atividade proteolítica. Os experimentos secos com adição de glicose, carboximetilcelulose e maltodextrina DE 5 apresentaram uma perda de atividade de 15, 23 e 9,3% após 4 dias da secagem, respectivamente.

Estes resultados apontam a necessidade do uso de adjuvantes durante o processo de secagem.

Tabela 4.8 – Avaliação preliminar das condições de secagem do extrato enzimático proteolítico sem adição de adjuvante (controle), com adição de 1% (m/v) de glicose, 0,04% (m/v) de Carboximetilcelulose e 0,5% (m/v) de maltodextrina DE 5

Tempo (h)	Controle	Adjuvantes de secagem		
		Glicose	Cmc	Maltodextrina
0	1302,71±0,01	1736,88±0,01	1787,29±0,02	1936,04±0,01
2	1192,08±0,01	1696,25±0,01	1501,04±0,01	1767,71±0,01
4	1007,5±0,02	1466,46±0,03	1359,79±0,01	1756,25±0,05

#### 4.7.2 Planejamento experimental

A Tabela 4.9 apresenta os resultados do estudo onde utilizou-se um planejamento fatorial e avaliou-se o efeito e a significância de 3 variáveis independentes: glicose (%), maltodextrina (%) e carboximetilcelulose (%) com os ensaios experimentais. A fim de avaliar o efeito do processo de secagem na atividade da enzima, a atividade de protease foi determinada logo após a obtenção do pó (tempo de 0 h) de secagem do extrato enzimático. A maior atividade de protease foi observada no ensaio 5 (1388,25 U/g), onde o extrato enzimático foi seco com adição de 0,4% de glicose e maltodextrina DE 5 e 0,08% de carboximetilcelulose, a menor atividade proteolítica ocorreu quando utilizou-se 1,6% de glicose, 0,4% de maltodextrina DE 5 e 0,02% de CMC (ensaio 2) apresentando 372,9 U/g.

Tabela 4.9 - Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com atividade da protease determinada no tempo de zero hora de estocagem do extrato enzimático seco (U/g)

Ensaio	Glicose	Maltodextrina	CMC*	Atividade de protease (U/g)
1	-1(0,4)	-1(0,4)	-1(0,02)	895,83 ± 0,002
2	1(1,6)	-1(0,4)	-1(0,02)	372,92 ± 0,04
3	-1(0,4)	1(1,6)	-1(0,02)	1044,83 ± 0,06
4	1(1,6)	1(1,6)	-1(0,02)	918,83 ± 0,1
5	-1(0,4)	-1(0,4)	1(0,08)	1388,25 ± 0,05
6	1(1,6)	-1(0,4)	1(0,08)	838,92 ± 0,1
7	-1(0,4)	1(1,6)	1(0,08)	1133,25 ± 0,31
8	1(1,6)	1(1,6)	1(0,08)	844,17 ± 0,05
9	0(1,0)	0(1,0)	0(0,05)	864,67 ± 0,08
10	0(1,0)	0(1,0)	0(0,05)	880,17 ± 0,012
11	0(1,0)	0(1,0)	0(0,05)	830,83 ± 0,05

\*CMC (carboximetilcelulose)

De acordo com análise estatística, todas as três variáveis analisadas, bem como o termo relacionado com a sua interação mostrou uma significância estatística, dentro de um limite de confiança de 95% sobre a atividade de protease, exceto a variável maltodextrina e o termo relacionado com a interação entre a glicose com carboximetilcelulose (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Coeficientes de regressão estimados, erro padrão, teste t-Student e *p* valor para atividade proteolítica após secagem utilizando planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t (3)	p valor
Média	910,24	19,03	47,16	0,000021
Glicose - X <sub>1</sub>	-185,92	22,63	-8,21	0,0037
Maltodextrina - X <sub>2</sub>	55,65	22,63	2,45	0,090
Carboximetilcelulose - X <sub>3</sub>	121,52	22,63	5,36	0,012
X <sub>1</sub> × X <sub>2</sub>	82,15	22,63	3,62	0,014
X <sub>1</sub> × X <sub>3</sub>	-23,69	22,63	-1,05	0,37
X <sub>2</sub> × X <sub>3</sub>	-118,08	22,63	-5,21	0,013

Nível de confiança = 95%; p-valor ≤ 0,05

Em relação às variáveis avaliadas, tanto a adição da maltodextrina DE 5 e carboximetilcelulose como adjuvante mostraram um efeito positivo, enquanto que a adição de glicose mostrou um efeito negativo sobre a atividade de protease. O efeito positivo dos fatores significa que um aumento em um dos fatores avaliados vai favorecer a atividade de enzima, enquanto que a interação significa que estes efeitos não podem ser interpretados separadamente, isto é, o efeito destes fatores não pode ser explicado pela soma dos efeitos individuais. As interações entre a glicose e maltodextrina, maltodextrina e carboximetilcelulose resultaram em um efeito positivo, o que indica que quando utiliza-se uma maior concentração glicose é necessário aumentar a concentração de maltodextrina, o mesmo ocorreu para uma maior concentração de maltodextrina é necessário aumentar a concentração de carboximetilcelulose, a fim de obter uma atividade mais elevada de protease. O efeito da interação entre a concentração de glicose e carboximetilcelulose e das 3 variáveis simultaneamente foi negativa e não significativo, apesar de cada efeito separado ter sido positivo (Figura 4.13).

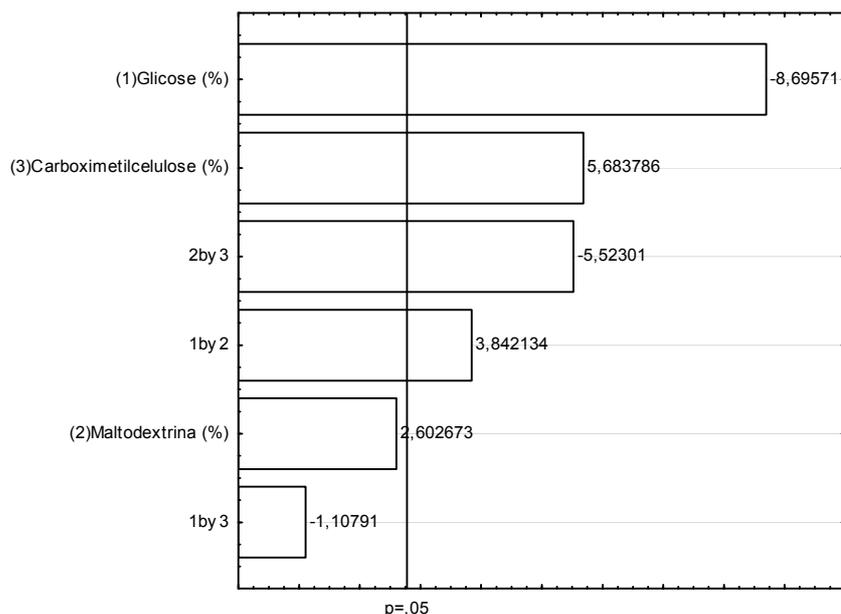


Figura 4.13 – Diagrama de Pareto com efeito das variáveis glicose ( $X_1$ ), maltodextrina ( $X_2$ ) e CMC ( $X_3$ ) e suas interações sobre a produção de protease.

A ANOVA (Tabela 4.11) indica que a regressão foi significativa, visto que o F calculado foi 5,6 vezes maior que o F tabelado, resultando em alta significância ( $p < 0,001$ ). O coeficiente de múltipla correlação foi de 0,97, ou seja, o modelo é capaz de explicar 97% das variações das respostas, podendo ser utilizado para prever as respostas de atividade proteolítica nas condições de processo avaliadas. Porém a falta de ajuste foi significativo, indicando que o modelo não é linear para a secagem do extrato enzimático.

Tabela 4.11 – Análise de variância para atividade proteolítica do planejamento experimental fatorial  $2^3$

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	584.963,1	5	116.992,6	30,56
Resíduo	19.116,5	5	3.823,296	
Falta de ajuste	17843,57	3	5947,9	9,34
Erro puro	1272,9	2	636,5	
Total	604.079,6	10		

$R^2 = 97\%$ ,  $F(0,05; 5,5) = 5,05$ ,  $p$  valor = 0,0009

De acordo com a literatura, pode-se dizer que a utilização de carboidratos na estabilização de proteínas possa protegê-las devido à formação de ligações de hidrogênio com o produto seco servindo como um substituinte da água quando a hidratação da proteína é removida (CARPENTER e CROWE, 1984; NAMALDI, ÇALIK e ULUDAG, 2006; SILVA, 2010).

O mecanismo de proteção proteica por diversos adjuvantes estar relacionada com a formação vítrea no estado sólido, outro efeito da adição de adjuvantes é o efeito de “diluição”, o qual vai reduzir a possibilidade das moléculas proteicas interagirem umas com as outras formando aglomerado, ação que pode ocorrer também no estado sólido. Uma das principais funções da maltodextrina é fortalecer a matriz vítrea e melhorar a estabilidade do pó (NAMALDI, ÇALIK e ULUDAG, 2006).

#### **4.7.3 Estudo da estocagem do extrato proteolítico seco por atomização**

A umidade e  $A_w$  do extrato enzimático seco obtido por atomização utilizando diferentes ensaios experimentais foi determinada em 0 h de estocagem. Os valores de umidade apresentaram-se entre 13 a 16% e  $A_w$  entre 0,189 e 0,388 de acordo com a Tabela 4.12. Baixo teor de umidade e água livre são fatores importantes para um maior período de estocagem do extrato enzimático seco.

A variação de umidade determinas logo após a retirado do extrato seco do spray dryer nos 11 ensaios, não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey, exceto o ensaio 2 quando a concentração dos adjuvantes foram: glicose (1,6%), maltodextrina (0,4%) e Cmc (0,02%). Já a  $A_w$  nos onze experimentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey.

Tabela 4.12 - Valores de umidade e Aw no tempo de 0h de secagem do extrato enzimático dos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

Ensaio	Umidade (%)	AW
1	13,70 <sup>a</sup> ± 0,69	0,388 <sup>d</sup> ± 0,001
2	14,70 <sup>b</sup> ± 0,26	0,372 <sup>a</sup> ± 0,003
3	13,47 <sup>a</sup> ± 0,96	0,271 <sup>a</sup> ± 0,061
4	14,88 <sup>a</sup> ± 0,21	0,312 <sup>abc</sup> ± 0,003
5	16,06 <sup>a</sup> ± 0,28	0,277 <sup>bcd</sup> ± 0,005
6	15,22 <sup>a</sup> ± 0,12	0,343 <sup>abcd</sup> ± 0,019
7	13,84 <sup>a</sup> ± 1,50	0,302 <sup>abcd</sup> ± 0,038
8	13,38 <sup>a</sup> ± 0,69	0,210 <sup>ef</sup> ± 0,005
9	14,47 <sup>a</sup> ± 0,61	0,189 <sup>f</sup> ± 2,20
10	15,58 <sup>a</sup> ± 0,38	0,376 <sup>cd</sup> ± 2,41
11	15,74 <sup>a</sup> ± 0,07	0,291 <sup>ab</sup> ± 2,67

\*médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A Tabela 4.13 mostra os resultados da atividade de protease residual durante a etapa de estocagem do extrato enzimático seco por atomização utilizando glicose, maltodextrina DE 5 e carboximetilcelulose como adjuvante durante 90 dias a temperatura ambiente (~28°C). Todos os ensaios apresentaram a atividade após 90 dias de estocagem, os ensaios no ponto central (ensaios 9, 10 e 11) apresentaram os menores valores de atividade residual, sendo os ensaios 1 e 2 os que apresentaram maior atividade após 90 dias de estocagem.

Dentre as combinações, o extrato enzimático adicionado do adjuvante maltodextrina DE 5 na concentração 0,4% (m/v), glicose na concentração 0,4% (m/v) e 0,08% (m/v) de carboximetilcelulose, resultou em um pó com maior teor de umidade de 16,06% e atividade de água 0,278.

O extrato enzimático seco sem a adição de adjuvantes e nas mesmas condições operações dos ensaios experimentais do planejamento apresentou atividade de 1242 U/g no tempo de 0 h de secagem, a correlação entre o ensaio que apresentou maior atividade de protease do planejamento (ensaio 5) com o extrato enzimático seco sem adição de adjuvantes, o ensaio 5 apresentou uma atividade relativa de 111, 2% no tempo 0h de secagem. O ensaio 5 (0,4% (m/v) de glicose e

maltodextrina DE 5, 0,08% (m/v) de carboximetilcelulose) apresentou a melhor condições para concentração da enzima pelo processo de secagem e eficiência no processo de estocagem, onde após 90 dias de estocagem apresentou atividade relativa de 23,5%. O concentração de adjuvantes no ensaio 5 foram determinante para a eficiência do método de secagem, uma vez que a umidade no tempo 0 h de secagem não difere estatisticamente dos demais ensaios, exceto do ensaio 2.

A melhor condição de secagem do extrato enzimático ocorreu no ensaio 7, quando utilizou-se a menor concentração de glicose (0,04%) e maiores concentrações de maltodextrina (1,6%) e carboximetilcelulose (0,08%). Nestas condições de secagem foi possível observar uma maior retenção da atividade de protease e manutenção desta durante os 90 dias de estocagem, apresentando uma atividade residual de 49,48%.

Tabela 4.13 - Atividade de protease no tempo de 0 hora e atividade residual (%) dos extratos secos por atomização durante 90 dias de estocagem a 28 °C

Ensaio	Tempo de estocagem							
	Atividade (U/g)	Atividade residual (%)						
	0h	2 dias	4 dias	8 dias	18 dias	30 dias	60 dias	90 dias
1	895,8 ± 0,001	93,21 ± 0,09	91,37 ± 0,01	90,54 ± 0,003	75,17 ± 0,03	57,18 ± 0,01	57,11 ± 0,05	51,77 ± 0,07
2	372,9 ± 0,003	100,0 ± 0,05	99,15 ± 0,01	98,75 ± 0,01	89,75 ± 0,01	83,80 ± 0,16	78,15 ± 0,12	71,37 ± 0,05
3	1044,8 ± 0,06	71,10 ± 0,05	65,15 ± 0,01	65,71 ± 0,01	64,73 ± 0,01	63,57 ± 0,05	63,65 ± 0,04	31,5 ± 0,01
4	918,8 ± 0,003	78,61 ± 0,01	76,37 ± 0,05	75,29 ± 0,03	74,21 ± 0,01	69,83 ± 0,03	69,65 ± 0,04	34,91 ± 0,01
5	1388,3 ± 0,005	83,06 ± 0,07	78,77 ± 0,12	69,88 ± 0,01	69,15 ± 0,003	68,86 ± 0,01	65,37 ± 0,01	23,53 ± 0,03
6	838,9 ± 0,01	93,92 ± 0,12	84,36 ± 0,06	83,57 ± 0,01	76,25 ± 0,01	75,99 ± 0,07	71,62 ± 0,01	33,97 ± 0,01
7	1133,3 ± 0,03	85,38 ± 0,06	80,61 ± 0,01	77,28 ± 0,01	71,78 ± 0,01	68,24 ± 0,05	57,29 ± 0,05	49,48 ± 0,04
8	844,6 ± 0,005	99,66 ± 0,01	87,49 ± 0,001	86,34 ± 0,01	86,08 ± 0,03	85,0 ± 0,05	62,30 ± 0,12	20,92 ± 0,18
9	864,7 ± 0,01	99,70 ± 0,01	85,04 ± 0,003	84,65 ± 0,08	84,04 ± 0,01	83,27 ± 0,01	82,31 ± 0,01	31,6 ± 0,07
10	880,2 ± 0,01	92,00 ± 0,08	82,52 ± 0,06	82,53 ± 0,07	82,18 ± 0,01	80,76 ± 0,03	78,39 ± 0,01	6,58 ± 0,05
11	830,8 ± 0,05	95,40 ± 0,07	83,99 ± 0,12	83,53 ± 0,05	81,75 ± 0,01	79,74 ± 0,01	66,26 ± 0,05	15,94 ± 0,05

## **5** **Conclusões e Sugestões**

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

Nesta estudo foram determinados os parâmetros operacionais da produção de protease por *Aspergillus oryzae* CCBP 001 em condições dinâmicas e comparados com o processo estático e a avaliação da atividade das proteases produzida.

Na otimização da produção de proteases de *A. oryzae* CCBP 001 por FSS foi organizado em etapas experimentais visando a maior produção proteolítica, cujas conclusões diante dos resultados obtidos foram:

A torta de canola foi selecionada como substrato para produção de protease por FSS, onde esta apresentou uma produção 33% superior aos demais substratos testados. A maior atividade de protease utilizando a torta de canola como substrato foi na temperatura de 20 °C e sem a necessidade de tratamento inicial ou suplementação de nutrientes.

No estudo das condições operacionais para produção de protease em reator de colunas instrumentado, a umidade do substrato inicial foi um parâmetro relevante para alcançar maiores atividade de protease. Os valores de atividade proteolítica foram superiores em condições estáticas, quando comparado com o sistema dinâmico. Porém, a fermentação em condições estáticas apresenta desvantagem no escalonamento e monitoramento durante o processo.

A secagem por atomização do extrato enzimático proteolítico possibilitou concentrar e estocar a enzima. A utilização de glicose, maltodextrina e carboximetilcelulose como adjuvantes se mostraram eficientes com relação à manutenção da atividade de protease durante o processo de secagem utilizando “spray dryer”, onde foi possível obter um produto seco com baixos valores de umidade e  $A_w$ , importante para o processo de estocagem do extrato enzimático.

Na purificação parcial e avaliação da atividade do extrato enzimático, foi possível avaliar a eficiência do processo de precipitação com sulfato de amônio, onde este foi capaz de purificar parcial do extrato enzimático. E através do perfil eletroforético do extrato enzimático bruto e em diferentes condições de saturação é possível afirmar que o extrato enzimático proteolítico produzido possui atividade

sobre as proteínas do leite, que a protease apresenta atividade utilizando a gelatina com substrato.

Os resultados obtidos na etapa de variação do pH de extração da enzima e do pH de determinação da atividade, verificou-se que o extrato enzimático proteolítica apresentava valores de atividade de protease em todas as faixas de pH estudadas, podendo haver a existências de mais de uma protease no extrato. Através dos resultados da zimografia é possível concluir existem pelo menos 3 proteases no extrato enzimático de *A. oryzae* CCBP 001 utilizando a torta de canola com substrato para a FSS.

## **5.2 Sugestões**

Os resultados deste trabalho podem servir como guia para o desenvolvimento de novas pesquisas que possam:

- Avaliar a produção do extrato enzimático em diferentes reatores em condições dinâmicas.
- Utilização de colunas de maior diâmetro para minimizar os problemas que a aeração possa causar na forma de micélio do fungo.
- Comparar diferentes métodos de concentração do extrato enzimático.
- Realizar zimografia em baixas concentrações de protease de *A. oryzae* CCBP 001 para identificação individual das bandas das proteínas.
- Realizar um perfil cromatográfico das proteases de *A. oryzae* CCBP 001.
- Testar formas de aplicação do extrato enzimático bruto de *A. oryzae* CCBP 001.
- Utilização de ferramentas de modelagem e simulação a serem executadas com base nos resultados do presente estudo.
- Realizar estudo de reutilização do resíduo final do processo FSS em posteriores processo fermentativo semi-sólido.
- Melhorar as condições de obtenção do pó por atomização.

## **6** **Referências Bibliográficas**

ABE, K.; GOMI, K.; HASEGAWA, F.; MACHIDA, M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. **Mycopathologia**. v.162, p.143–153, 2006.

ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. **Cinética de produção de poligalacturonases por fermentação semi-sólida utilizando pedúnculo de caju**. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, 2008.

ANANDAN, D.; MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamari*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p.339–347, 2007.

BARGA, M. C. **Modelo da influencia para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de Fermentação no estado sólido**. Dissertação programa Interdisciplinar de pós-graduação em Engenharia – PIPE. Setor de tecnologia Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BECERRA, M.; GONZÁLEZ SISO, M. I.; Yeast Beta galactosidase in Solid-state fermentation. **Enzyme Microbial Technology**, v.19, p.39-44, 1996.

BENAZIR J. F.; SUGANTHI, R.; ANJANA H.; RAMESH K. V.; ASWATHI, M.P.; NIRAIMATHI, G.; MALA, M.K.; SUKANYA, S.; SANTHI, R. Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease. **Asiatic Journal of Biotechnology Resources**. v. 2, n. 4, p. 422-435, 2011.

BERRIDGE, N. J. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. **Journal Dairy Research**. v.19, p.328-329, 1952.

BERTUCCI, N.; COURI, S. Instrumentação para automação de processo de fermentação semi-sólida. Comunicado técnico, **EMBRAPA BOLETIM DE P&D**, N 7, p.1-7, 1996.

BERTUCCI-NETO, V.; FONSECA, R. F.; FARINAS, C.S.; COURI, S. Automação de reatores de fermentação sólida para produção de enzimas. **EMBRAPA BOLETIM DE P&D**, N 7, 2009. Embrapa Instrumentação Agropecuária Ed., São Carlos. 2009.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: A practical Approach**. New York: Oxyford University Press, 1996, 257p.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 388–394, 2007.

BLIX, S. The determination of hexosamines according to Elson and Morgam. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 2, p. 467-78, 1948.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

- BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.
- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Ed. Manole, São Paulo, 2003.
- BÜCHI. **Manuel d'instructions atomiateur de séchage B-290**. 2005
- CARPENTER, J.; CROWE, J. H. An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v. 28, p. 3916-3922, 1984.
- CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 205-210, 1985.
- CHAKRABARTI, S. K.; MATSUMURA, N.; RANU, R. S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). **Current Microbiology**, v. 40, p. 239–244, 2000.
- CHARLES, P.; DEVANATHAN, V.; ANBU, P.; PONNUSWAMY, M. N.; KALAICHELVAN, P. T.; BYUNG-KI HUR.; Purification, characterization and crystallization of extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 347–352, 2008.
- 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, Maria Alice Zatur; SALGADO, Andréia Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, EPUB, 2008, 13 p.
- DALSENTER, F. D. H. **Contribuição ao estudo da proposta zero para um resíduo agroindustrial utilizando processo biotecnológico**. Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.81-87, 2010.
- 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. **Biотecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v. 2, 2001.
- DIB, R.; CHOBERT, J. M.; DALGALARRONDO, M.; BARBIER, G.; HAERTLE T. Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcusabyssi*, strain st 549, hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal ecosystem. **FEBS Letters**, v.431, p.279–284, 1998.
- DIVAKAR, G.; SUNITHA, M.; VASU, P.; SHANKER, P. U.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for alkaline protease production under solid-state fermentation by *Thermoactinomyces thalophilus* PEE I4. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 80-83, 2006.

DOMÍNGUEZ, A.; RIVEL, I.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Design of a new rotating drum bioreactor for lignolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on a inet support. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 549-554, 2001.

DOMINGUÉZ, M.; MEJÍA, A.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Respiration Studies on Penicillin Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.89, p.409-413, 2000.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113–125, 2003.

EGITO A.S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLE', D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**.v.17, p. 816–825, 2007.

FARINAS, C. S.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Modeling the effects of solid fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and products**. v.34, p.1186-1192, 2011.

FERNANDEZ-LAHOPE, H. M. AUDAY, R. M., FRAILE, E. R., BISCOGLIO DE JIMENEZ BONINO, M., PIRPIGNANI, L., MACHALINSKI, C., CASCONE, O. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor sp.* solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**, v .53, p.599- 605, 1999.

FREITAS, A. C. **Produção de Proteases por *Aspergillus* em Fermentação Semi-Sólida utilizando torta de canola**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Ceará, Engenharia Química, Fortaleza, 2009.

GARCÍA-GÓMEZ, M.J.; HUERTA-OCHOA, S.; LOERA-CORRAL, O.; PRADOBARRAGÁN, 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.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling *Gibberela fujikuroi* growth and GA<sub>3</sub> production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. V.37, p.1033-1040, 2002.

GHILDYAL, N. P.; LONSANE, B. K.; SREEKANTIAH, K. R.; SREENIVASA MURTHY, V. Economics of submerged and solid state fermentation of the production of amyloglucosidase. **Journal in Food Science & Technology**. v.22, p.171-176, 1985.

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.

HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

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

IKASARI, L.; MITCHELL, D. A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 171-175, 1996.

Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, 64(1), p.14-33. 2011.

KAPNOOR, S.; MULIMANI, V. H. Production of  $\alpha$ -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through Solid-state Fermentation and its Application in Soymilk Galactooligosaccharide Hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n. 1, p. 211-218, 2010.

KHAN, M. R.; BLAIN, J. A.; PATTERSON, J. D. E. Extracellular Proteases of *Mucor pusillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 719-724, 1979.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Bioquímica dos alimentos: teoria e prática.** Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2010. 2 p

LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **Journal of Molecular Biology**, v. 80, p.575–599, 1973.

LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D.; TRONCHIN, G. Purification and characterization of a fibrinolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. **FEBS Letters**, v. 308, p. 65–69, 1992.

LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Blucher, v. 3, 2001. 351 p.

LONSANE, B. K.; RAMESH, M. V. Production of bacterial thermostable alfa amylase by solid state fermentation: A potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hidrolysis. **Applied Microbiology**. v.35, p.1-56, 1990.

LONSANE, B. K., SAUCEDO-CASTANEDAY, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZALEZ, G., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., KRISHNAIAH, M. M. Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 259-273, 1992.

LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 22, p. 85-94, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**; v 193; p 265- 75, 1951.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo**

**de soja.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2006.

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.

MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**. v.15, p.173-183. 2008.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, MOTOAKI.; TANAKA, TOSHIHIRO.; KUMAGAI.T.; TERAJ, G.; KUSUMOTO, K.; ARIMA, T.; AKITA, O.; KASHIWAGI, K.; ABE, K.; GOMI, K.; HORIUCHI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, M.; DENNING, D. W.; GALAGAN, G. E.; NIERMAN, W. C.; YU, J.; ARCHER, D. B.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; FEDOROVA, N. D.; GOTOH, O.; HORIKAWA, H.; HOSOYAMA, A.; ICHINOMIYA, M.; IGARASHI, R.; IWASHITA, K.; JUUVADI, P. R.; KATO, M.; KATO, Y.; KIN, T.; KOKUBUN, A.; MAEDA, H.; MAEYAMA, N.; MARUYAMA, J.; NAGASAKI, H.; NAKAJIMA, T.; ODA, K.; OKADA, K.; PAULSEN, I.; SAKAMOTO K.; SAWANO, T.; TAKAHASHI, M.; TAKASE, K.; TERABAYASHI, Y.; WORTMAN, J. F.; YAMADA, O.; YAMAGATA, Y.; ANAZAWA, H.; HATA, Y.; KOIDE, Y.; KOMORI20, T.; KOYAMA, Y.; MINETOKI, T.; SUHARNAN, S.; TANAKA, A.; ISONO, K.; KUHARA, S.; OGASAWARA, N.; KIKUCHI, H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p.22/29, 2005.

MENDES, A. A.; CASTRO, P. C. O. H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MERHEB-DINI, C., CABRAL, H., LEITE SR, R., ZANPHORLIN, L. M., OKAMOTO, D. N., RODRIGUEZ, B., JULIANO, L., ARANTES, E. C., GOMES, E., SILVA, R. Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.

MERHEB, C. W., CABRAL, H., GOMES, E., DA-SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MERHEB-DINI, C., GOMES, L., BOSCOLO, M., DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010.

MITCHEL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, M. Biochemical aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.68, p. 61-138. 2000.

MOFTAH, O. A. S.; GRBAVCIC, S.; ZUZA, M.; LUKOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil

Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation. **Applied Biochemical Biotechnology**. v.166, p.348–364, 2012.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENDERDY, R.P. Principles of Solid-Substrate Fermentation. In: SMITH, D.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B. (Eds). **The Filamentous Fungi**. v 4, p.117, 1983.

MONOD, M.; TOGNI, G.; RAHALISON, L.; FRENK, E. Isolation and characterization of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *Journal Medical Microbiology*, v. 35, p. 23–28, 1991.

MOREIRA, G. E. G. **Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Engenharia Química, Natal, 2007.

MORRYSSEY, J. H. Silver strain for proteins in polyacrylamine gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**. v. 117, p.307-310, 1981.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**. v. 8, p. 199-205, 2010.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**. v. 4, p. 137 – 148, 2011.

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.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v.72, p.219-230, 2001.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v. 24 p: 1495–1500, 2006.

NEHRA, K.S.; DHILLON, S.; CHAUDHARY, K.; SINGH, R. Production of alkaline protease by *Aspergillus* species under submerged and solid state fermentation. **Indian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 43-47, 2002.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v.6, p.405 – 423, 1994.

NOVOZYMES. **Enzyme Business**. Disponível em: <<http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business>>. Acesso em: 18 de outubro de 2012.

NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F.; MAW, T.; TAN, T. K.; KHOR, E.; WONG, S. M. Production of fungal Chitosan by solid state and Submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**: in press, 2001.

OLIVEIRA, L. F. Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. **Alimentação e nutrição**. v. 12, p. 215 – 226, 2001.

PADMANABHAN, S.; RAMANA MURTHY, M. V.; LONSANE, B. K. Potential of *Aspergillus oryzae* CFRTI 1480 for producing proteinase in high titres by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.40, p.499-503, 1993.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**. v.77, p.149-152, 1999.

PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; LEO, J. A. R.; NIGAM, P.; **Solid-state fermentation in Biotechnology**, Asia tech Publishers, Inc., New Delhi, 2001. p.221.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in Solid-state Fermentation**. Process Biochemistry, Springer science, 2008. p. 4–10.

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

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 3-31, 2002.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003. p.209.

POLITZER, Kurt.; BON, Elba Pinto da Silva. **Enzimas Industriais e Especiais**. Rio de Janeiro: CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006. 10 p.

POZA, M., SIEIRO, C., CARREIRA, L., BARRROS-VALÁZQUEZ, J., VILLA, T. G. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus Xanthus* strain 422. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 691-698, 2003.

PRABHAKAR, A., KRISHNAIAH, K., JANAUN, J., Bono, A. An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1(2), p.10-16, 2005.

PRADO, F. C.; VANDERBERGHE, L. P. S.; LISBOA, C.; PACA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in Solid-state fermentation. **Engineering in Life Science**. v.4, p.179-186, 2004.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

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

RAMANA-MURTHY, M.V.; KARANTH, N.G.; RAO, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: **Advances in Applied Microbiology**: v.38, p.99-147, 1993.

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.

RATHAKRISHNAN, P.; NAGARAJAN, P. Red gram husk: A potent substrate for production of Protease by *Bacillus cereus* in Solid-State Fermentation. **International Journal of ChemTech Research**. v. 3, p. 1526-1533, 2011.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulose by *Thichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food bioproducts Process**, v. 88, p. 61-66, 2010.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SAN ROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, p. 291-302, 2006.

RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ, D. E.. **Current developments in Solid-state Fermentation: Factors Affecting Solid-state Fermentation**. Process Biochemistry, Springer science, 2008. p. 24–30.

SAKURAI, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. On the convenient for glucosamine estimation in Koji, **Agriculture Biology Chemistry**, v. 41(4), p. 619-24, 1977.

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.

SAXENA, R.; SINGH, R. Characterization of a metallo-protease produced in solid state fermentation by a newly isolated *Bacillus* strain. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55, p.13-18, 2011.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**. Wiley, New York. 1993.

SEONG, C.; JO, J. S.; KIM, S. W.; LEE, O.; HEE, J.; YOO, J. C. Production, purification and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 907-909, 2004.

SERMANNI, Giovanni Giovannozzi; TISO, Nicola. Current Developments in Solid-state Fermentation: **Aspects of Desig Bioreactors in SSF**. Springer, New delhi, 2008, 117-145 p.

SHARMA, R.; KATOCH, M.; SRIVASTAVA, P. S.; QAZI, G. N. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 2083 – 2094, 2009.

SHARNA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627 -662, 2001.

SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em ‘spray dryer’ de lipases produzidas pelo fungo *Cercosporakikuchii***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, p.208-431, 2009.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermented bran. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 805-811, 2007.

SIM, Y-C.; LEE, S-G.; LEE, D-C.; KANG, B-Y.; PARK, K-M.; LEE, J-Y.; KIM, MS.; CHANG, I-S.; RHEE, J-S. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**, n. 22, p. 137-140, 2000.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SPIER, M. R.; GREINER, U. K.; GREINER, R.; CARVALHO, J. C.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.;WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCOOL, C. R. Relation between respirometric data and amyolytic enzyme production by SSF in column-type bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v.5, p.1-10, 2007.

SRINIVASAN, R. A.; IYENGAR, M. K. K.; BABBAR, I. J.; CHAKRAVORTY, S. C.; DUDANI, E. M.; IYA, K. K. Milk-clotting enzymes from microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 475-478, 1964.

SUKHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B., VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447- 451, 2003.

Thanapimmetha, A., Luadsongkram, A., Titapiwatanakun, B., Srinophakun, P. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 37(1), p.1-5. 2012.

TREMACOLDI, C. R.; MONTI, R.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; CARMONA, E. C. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 295–299, 2007.

TREVAN, M. D., BOFFEY, S., GOULDING, K. H. e STANBURY, P. **Biotecnología: Principios biológicos**. Zaragoza: Acribia, p. 284.1990.

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

VILLEGAS, E.; AUBAGUE, S.; ALCANTARA, L.; AURIA, R., REVAH, S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> environments. **Biotechnology Advances**. v.11, p.387-397, 1993.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A.; SINGH, S. A. Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemical**, v. 114, p. 402-407, 2010.

WANG, S. L.; CHEN, Y. H.; WANG, C. L.; YEN, Y. H.; CHERN, M. K. Purification and characterization of a serine peptidase extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 660–665, 2005.

WANG, Y e LEE, M. Influence of culture and nutritional condition on the production of protease from thermophilic strain *Aspergillus* species NTIJ-FC-671. **Journal of Chinese Agricultural and Chemical Society**.v.34, p.732-742, 1996.

ZHANG, X.; MO, H.; ZHANG, J.; LI, Z. A solid state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 417-420, 2003.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, W. C.; FRASSON, A. P.; GRAEFI, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

ZÚÑICA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2010. p.209.

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.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991.

## ANEXOS

### ANEXO A - Composição dos meios de cultura

#### 1. Ágar Batata Dextrose (HiMedia)

Tabela 7.1 – Ingredientes do meio Ágar Batata Dextrose

Ingredientes g/L	
Infusão de batatas	200,00
Dextrose	20,00
Ágar	15,00

pH final (a 25°C): 5,6 ± 0,2

#### 2. Meio de farelo de trigo

Constituído por 10,0 g de farelo de trigo, 4 mL de uma solução 1,7% (m/v) NaHPO<sub>4</sub> e 2,0% (m/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**ANEXO B – Curva padrão Método Lowry**

Preparo de soluções para curva padrão de proteína (Lowry, 1951), as concentrações das soluções estão apresentadas na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Concentrações das soluções para obtenção da curva padrão de proteína

<b>Solução mãe (BSA)</b> <b>(mL)</b>	<b>Água destilada</b> <b>(mL)</b>	<b>Concentração final</b> <b>(mg/L)</b>
10	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90