

Estudo do crescimento de *A. asiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas

Study of the growth of A. asiellus in conventional soybean meal for enzyme production

Leandro Daniel De Paris

Mestre em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química
Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil
leandroparis@hotmail.com

Fabiano Bisinella Scheufele

Graduado em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR, Brasil
fabianoscheufele@gmail.com

Ademir Teixeira Júnior

Graduado em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR, Brasil
texera_dm@hotmail.com

Thiago Luiz Guerreiro

Graduado em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR, Brasil
tlg877@hotmail.com

Salah Din Mahmud Hasan

Doutor em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR, Brasil
salahdmh@gmail.com

Resumo

O farelo de soja é um dos principais resíduos da agroindústria brasileira, tendo em vista a grande produção nacional do grão. Este subproduto apresenta características que tornam interessante sua utilização como substrato nos processos de fermentação em estado sólido (FES). Apesar de não ser tão utilizado industrialmente quanto à fermentação submersa (FSm), pode ser uma alternativa viável, pois apresentada resultados superiores de produtividade, principalmente no cultivo de fungos filamentosos e na produção de enzimas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a produção das enzimas protease, amilase e invertase por FES, utilizando farelo de soja convencional e o fungo *A. asiellus*. Foram avaliadas a variação do pH e fontes de nutrientes, otimização dos parâmetros da FES por meio de planejamentos experimentais e construção de curvas de crescimento do fungo. Na

Abstract

Soybean meal is one of the major wastes from the Brazilian agribusiness, in view of the large domestic production of grain. This byproduct has characteristics that make it interesting to be used as substrate in the process of solid-state fermentation (SSF). Although it is not much used industrially as the submerged fermentation (SmF), it may be a viable alternative, as it has shown superior results of productivity, specially in the cultivation of filamentous fungi and the production of enzymes. The present study aimed the production of the enzymes protease, amylase and invertase by SSF using conventional soybean meal and the fungus *A. asiellus*. The pH and nutrient sources were evaluated and, finally, an optimization of the parameters of the SSF through experimental design and construction of growth curves of the fungus were carried out. The optimization of the invertase production process reached the best values for specific enzymatic activity (AEsp) at neutral pH (6.7)

otimização do processo de produção para a invertase, os melhores valores de atividade enzimática específica (AE_{esp}) foram obtidos em pH neutro (6,7) e 3% de fonte adicional de nitrogênio ao meio fermentativo, com umidade inicial do meio de 50% e temperatura de 28°C. O melhor resultado de atividade para a protease foi obtido na avaliação das fontes de nutrientes do meio, com a utilização de 2% de fonte de carbono e nitrogênio e 2% de fontes minerais. Já a amilase não apresentou resultados significativos para as variáveis empregadas.

and 3% additional source of nitrogen to the medium, with initial moisture of 50% and temperature of 28°C. The best result for the protease activity was obtained in the evaluation of medium nutrient sources, with the use of 2% of carbon and nitrogen sources and 2% of mineral sources. Already, amylase did not show significant results for the variables used.

Palavras-chave: FES, farelo de soja, *A. casingii*

Key words: SSF, soybean meal, *A. casingii*

1. Introdução

A produção de soja é uma das principais culturas do Brasil, sendo o carro chefe da produção agrícola nacional. A região Oeste do Paraná se destaca como uma das líderes na produção do grão. Consequentemente a esta grande produção, há também uma grande geração de resíduos provenientes do grão industrializado, principalmente o farelo de soja. Este apresenta grande potencial de comercialização, principalmente na composição alimentar para animais (ração), com baixo custo e considerável valor agregado. A indústria da soja pode produzir três tipos de farelo de soja com base no teor de proteína bruta. O farelo de soja com 44% de proteína bruta é obtido pela adição de casca de soja, proveniente da fabricação do farelo de soja com 48% proteína bruta, que é descascada antes da extração do óleo. Também existe o farelo de soja com 46% proteína bruta, no qual a quantidade de casca já se encontra no grão (Ministério da Agricultura, 1988). Tendo em vista que os fungos filamentosos, comumente utilizados em fermentação em estado sólido (FES), são micro-organismos que apresentam um bom crescimento em substratos protéicos e amiláceos, pode-se considerar que o farelo de soja apresenta características favoráveis, relacionadas à composição, que viabilizam a produção de enzimas por este processo, fornecendo quantidades significativas de proteína para o desenvolvimento do fungo e produção de metabólitos.

Entre as vantagens da FES, podem ser citadas algumas: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais, simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma. Por outro lado, o processo também oferece algumas desvantagens, as quais são: uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, escassez de dados e de projeto para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, dentre outras (Pandey, 1991).

De acordo com Pandey (1992), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (*Polysporus*). Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um bom crescimento em concentrações elevadas de açúcar e

sal, portanto em muitos alimentos com baixo teor de atividade de água, indicados para aplicações em processo de FES para obtenção de enzimas.

Estes catalisadores biológicos são muito utilizados industrialmente em diferentes áreas (alimentos, medicamentos, têxteis, combustíveis etc.) e caracterizam-se pela alta especificidade e eficiência e se fazem necessárias em apenas pequenas quantidades. Muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia (Lerayer, 1993).

Portanto, tendo em vista a alta aplicabilidade das enzimas e a quantidade limitada de referências que utilizam o fungo *A. asiellus* para sua produção, este estudo avaliou a variação do pH e fontes de nutrientes e otimização dos parâmetros da FES por meio de planejamentos experimentais para produção de protease, amilase e invertase, utilizando farelo de soja convencional como substrato. Foi realizada também a construção de curvas de crescimento do fungo com os parâmetros ótimos de produção obtidos pelos planejamentos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Micro-organismo e substrato

O microrganismo utilizado foi o fungo *A. asiellus*, cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Foram preparados repiques em meio de cultura PDA (*potato dextrose ágar*) esterilizado e mantidos sob refrigeração. No preparo do inóculo utilizou-se 700 mL do meio PDA esterilizado para o crescimento do micro-organismo, que foi mantido por 7 dias em estufa bacteriológica, a 28°C. Realizou-se a raspagem dos esporos e a solução foi filtrada em funil de vidro com algodão para retirada de micélio vegetativo. Em seguida, determinou-se o número e esporos em suspensão na solução, utilizando microscópio óptico com aumento de 400x e Câmara de Neubauer. O substrato utilizado foi o farelo de soja convencional, doado à UNIOESTE/Toledo pelas empresas COODETEC e SADIA. O farelo foi classificado em diferentes tamanhos de partícula usando peneiras Tyler de 12, 16, 28 e 48 MESH, que correspondem a 1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm de tamanho de partícula, respectivamente. Após, determinou-se o teor umidade.

2.2. Fermentação em estado sólido e extração das enzimas

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados os substratos e, em seguida, esterilizados em autoclave a 1,1 atm. Após, foram adicionadas à solução de esporos, a solução-tampão e os nutrientes, de acordo com as quantidades especificadas em cada ensaio. Os frascos foram acondicionados em estufa bacteriológica, sendo o tempo de fermentação estimado de acordo com cada ensaio, a 28°C. Todas as soluções-tampão utilizadas no estudo foram preparados conforme Deutscher *et al.* (1990). Para a análise do sólido fermentado, foi feita a extração dos seus componentes, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão), à 35°C e 130 rpm, durante 2h em incubadora tipo *shaker*. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado (10.000g), para remoção dos sólidos suspensos e, posteriormente, acondicionado em *freezer*.

2.3. Métodos analíticos

O teor umidade foi determinado por método gravimétrico (A.O.A.C., 1996). Para determinação das proteínas presentes nas amostras sólidas utilizou-se o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984), que se baseia na quantificação do nitrogênio total presente na amostra sólida. O método de determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) usado neste trabalho foi adaptado do método proposto por Miller (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A determinação da atividade enzimática da amilase foi realizada segundo a metodologia descrita por Hasan (2002). A determinação da atividade enzimática da protease foi realizada segundo adaptação do método descrito por Germano *et al.* (2003), que utiliza a BSA (*Bovine Serum Albumine*) como substrato. Para a determinação da atividade da invertase, em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de uma solução de sacarose 0,6M, preparada em solução-tampão MacIlvaine 50 mM pH 4,0, conforme Deutscher *et al.* (1990). Os tubos, contendo o extrato e a solução de sacarose, foram levados a banho aquecido a 40°C por 15 min. Após este período, os açúcares redutores foram medidos pelo método do reagente DNS (Miller, 1959). As atividades enzimáticas da protease e amilase foram determinadas em U, onde ($U = \text{Abs}/\text{tempo} \cdot \text{g massa seca}$). A atividade da invertase foi definida como a quantidade de micromoles de açúcares totais liberados por volume da amostra enzimática, sob as condições de ensaio descritas ($U = \mu\text{mol ART/mL}$).

2.3. Análise estatística

Realizou-se a análise estatística e otimização da FES por meio de planejamentos estatísticos experimentais, onde foi usado o programa computacional STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos a Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 95%. A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições da FES e fornecer um modelo matemático adequado para a atividade enzimática (AE) e atividade enzimática específica (AE_{esp}) do processo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Estudo da variação do pH e fontes de nutrientes da FES com *A. casiiellus*

A fermentação foi conduzida utilizando-se os seguintes parâmetros fixos: farelo de soja convencional como substrato, tempo de fermentação de 144h, temperatura de 28°C, diâmetro de partícula do substrato de 0,6mm, concentração inicial do inóculo de $4 \cdot 10^6$ esporos/gms e umidade inicial do meio de 50%. O planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}_{v} , de resolução v , foi utilizado para avaliar as variáveis do processo, as quais foram: fonte de carbono inorgânica (glicose, C_c (%)), fonte de nitrogênio (NaNO_3 , C_N (%)), fonte de carbono e nitrogênio (peptona de carne, C_{CeN} (%)) e fonte de minerais (fonte orgânica de carbono C_{MIN} (%)), baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para a variação inicial de nutrientes do meio. A variação inicial do pH foi obtida pela utilização de soluções-tampão com o valor de pH adequado. Na Tabela 1 são apresentadas as variáveis utilizadas no planejamento nas suas formas codificadas e os resultados obtidos para AE_{esp} da protease, amilase e invertase. Os ensaios 17, 18 e 19 representam uma triplicata no

ponto central, que permite o cálculo do erro padrão com maior número de graus de liberdade. Observa-se que os valores mais altos de AE_{esp} foram obtidos para a protease.

Tabela 1: Matriz do planejamento 2^{5-1}_{IV} .

Ensaio	Fonte C (%)	Fonte N (%)	Fonte C e N (%)	Fonte Min. (%)	pH	AE_{esp} Protease (U/g prot.)	AE_{esp} Amilase (U/g prot.)	AE_{esp} Invertase (U/mL.g prot.)
1	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (9,0)	25,3896	1,1939	10,2585
2	1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3,0)	87,8891	7,2822	8,6592
3	-1 (0)	1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3,0)	37,4591	10,8325	9,2161
4	1 (2)	1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (9,0)	11,0702	1,1695	13,8666
5	-1 (0)	-1 (0)	1 (2)	-1 (0)	-1 (3,0)	58,6339	3,3343	10,3064
6	1 (2)	-1 (0)	1 (2)	-1 (0)	1 (9,0)	79,1428	1,5784	10,0383
7	-1 (0)	1 (2)	1 (2)	-1 (0)	1 (9,0)	12,4379	0,9889	13,2464
8	1 (2)	1 (2)	1 (2)	-1 (0)	-1 (3,0)	64,8468	10,0404	9,5470
9	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (2)	-1 (3,0)	66,8288	5,7619	9,5777
10	1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (2)	1 (9,0)	80,8907	2,7565	11,4680
11	-1 (0)	1 (2)	-1 (0)	1 (2)	1 (9,0)	5,2980	0,4950	12,6550
12	1 (2)	1 (2)	-1 (0)	1 (2)	-1 (3,0)	76,1219	9,6659	10,6331
13	-1 (0)	-1 (0)	1 (2)	1 (2)	1 (9,0)	35,7985	1,4738	9,1417
14	1 (2)	-1 (0)	1 (2)	1 (2)	-1 (3,0)	104,0577	5,2433	7,5398
15	-1 (0)	1 (2)	1 (2)	1 (2)	-1 (3,0)	40,4251	5,5190	10,6530
16	1 (2)	1 (2)	1 (2)	1 (2)	1 (9,0)	22,9512	0,7308	12,3211
17	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (6,0)	59,7445	13,7353	10,9028
18	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (6,0)	43,1796	11,8650	8,3987
19	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (6,0)	53,8496	12,9556	8,9737

A análise estatística com os resultados dos coeficientes e p-valor para o planejamento, referentes à AE_{esp} da protease, amilase e invertase são apresentadas na Tabela 2, onde os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A Tabela 1 mostra que, para a protease, as variáveis fonte de C, fonte de N e pH foram significativas, indicando que se a fonte de C for aumentada, ocorrerá um aumento da resposta. Em contrapartida, com um aumento da fonte de N ou do pH haverá uma diminuição da atividade específica. Para a amilase, observa-se que nenhum dos efeitos principais e interações entre as variáveis apresentaram significância, sugerindo que as variáveis empregadas neste estudo não apresentaram relevância na produção de amilase por *A. casiiellus* por FES utilizando farelo de soja convencional como substrato. Com relação à invertase, nenhuma das variáveis e interações avaliadas foi significativa. Entretanto, com o intuito de verificar uma possível direção a ser tomada na condução de experimentos futuros, observa-se que o pH e a fonte de nitrogênio, que são as variáveis que mais se aproximaram do intervalo de confiança de 95% ($p\text{-valor} < 0,05$), influenciaram as respostas de forma positiva; têm-se um aumento de AE_{esp} com o aumento do valor destas variáveis.

Tabela 2: Coeficientes e p-valor para a AE_{esp} da protease, amilase e invertase para o planejamento 2^{5-1}_v .

Variável	Protease		Amilase		Invertase	
	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef.
Intercepto	0,000070	50,8429	0,053894	5,6116	0,000080	10,3896
Fonte C	0,003190	15,2937	0,797909	0,5542	0,880482	-0,0614
Fonte N	0,002446	-16,7513	0,755478	0,6761	0,085892	0,9468
Fonte C e N	0,402350	1,7092	0,767754	-0,6405	0,596772	-0,2213
Fonte Min.	0,142799	3,4689	0,889879	-0,2983	0,860405	-0,0718
pH	0,002577	-16,4552	0,232637	-2,9557	0,067325	1,0539
Fonte C x Fonte N	0,055069	-5,3725	0,969287	-0,0828	0,740963	0,1360
Fonte C x Fonte C e N	0,929356	0,1692	0,914800	0,2303	0,338366	-0,4263
Fonte C x Fonte Min.	0,413118	1,6652	0,966958	0,0891	0,896254	0,0532
Fonte C x pH	0,642928	-0,9024	0,891556	-0,2937	0,407574	0,3604
Fonte N x Fonte C	0,846605	-0,3702	0,988852	0,0300	0,723358	0,1459
Fonte N x Fonte Min.	0,576878	-1,0961	0,806746	-0,5291	0,769899	0,1201
Fonte de N x pH	0,085970	-4,4317	0,608933	-1,1284	0,315501	0,4510
Fonte C e N x Fonte Min	0,066941	-4,9475	0,972738	-0,0735	0,404050	-0,3635
Fonte C e N x pH	0,392332	1,7511	0,804641	0,5351	0,604656	-0,2163
Fonte Min. x pH	0,496212	-1,3567	0,865967	0,3640	0,705169	-0,1562
	$R^2 = 0,989$		$R^2 = 0,507$		$R^2 = 0,870$	

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) para a AE_{esp} da protease e da invertase. Para a validação do modelo proposto foi utilizado o teste F, onde tem-se que se F calculado for maior que o valor de F tabelado, o modelo linear é válido e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais. Segundo Barros Neto *et al.* (2007), o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade, para AE_{esp} é: $F_{tab}(15;3;0,05) = 8,7$.

Tabela 3: ANOVA para o planejamento 2^{5-1}_v para AE_{esp} da protease e invertase.

Fonte de variação	SQ		GL		MQ		F_{calc}	
	Prot.	Inv.	Prot.	Inv.	Prot.	Inv.	Prot.	Inv.
Regressão	14129,21	45,45	15	15	941,95	3,03	19,08	1,35
Resíduos	148,13	6,75	3	3	49,38	2,25		
Total	14277,34	52,20	18	18	941,95	3,03		

R^2 para protease (0,989) e R^2 para invertase (0,871). SQ é a soma quadrática, MQ é a média quadrática, GL são os graus de liberdade e F_{calc} é o valor de F calculado.

Para o teste F referente à protease, nota-se que $F_{calc} > F_{tab}$, portanto o modelo linear proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo matemático de AE_{esp} em função das variáveis significativas (Equação 1).

$$AE_{esp} \text{ (U/g proteína)} = 50,8429 + 15,2937 \cdot C_C - 16,7513 \cdot C_N - 16,4552 \cdot pH \quad (1)$$

Já para a análise da invertase, observa-se que $F_{calc} < F_{tab}$, logo, o modelo linear proposto não é válido para prever o comportamento do processo. Porém, tendo em vista que as variáveis pH e fonte de nitrogênio, mesmo não apresentando significância, se aproximaram do intervalo de confiança de 95%, a superfície de resposta para AE_{esp} pode ser avaliada com o intuito de verificar a direção a ser tomada para a realização de estudos subsequentes, com a finalidade de aumentar os valores de AE_{esp} .

As superfícies de resposta para a AE_{esp} da protease são apresentadas na Figura 1 (A e B), e, como visto nos resultados para o planejamento, indicam que valores mais altos podem ser obtidos com o aumento da fonte

de carbono e diminuição da fonte de nitrogênio e pH. O gráfico da Figura 1(C) apresenta a superfície de resposta para a AE_{esp} da invertase, onde observa-se que se novos experimentos forem conduzidos em níveis mais altos de pH e fonte de nitrogênio, haverá um aumento da resposta desejada.

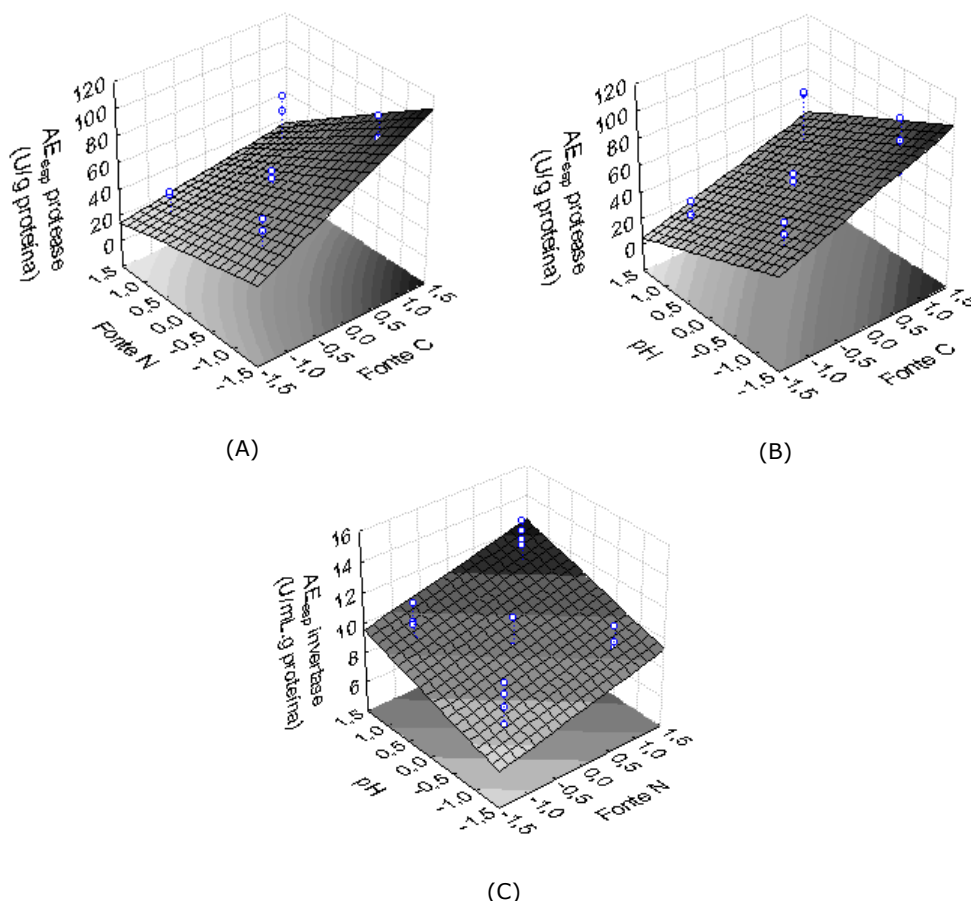


Figura 1: (A) Variação de fonte de N e fonte de C para a AE_{esp} da protease. (B) Variação pH e fonte de C para a AE_{esp} da protease. Com aumento da fonte de C obtém-se maior valor para a atividade, já para um aumento de pH e fonte de N, a atividade diminuirá. (C) Variação pH e fonte de N para a AE_{esp} da invertase, com um aumento de ambas as variáveis, a atividade aumentará.

O melhor valor de AE_{esp} para a protease (104,0577 U/g de proteína) foi obtido para a maior quantidade de fonte inorgânica de carbono presente no meio fermentativo (2%) e para a menor quantidade de fonte de nitrogênio (0%) e menor valor de pH (3,0), evidenciando que a produção da enzima, com característica ácida, requer uma suplementação do meio para sua produção, quando utiliza-se farelo de soja como substrato. Este fato pode ser explicado pela suposta perda de fontes de carbono do grão, após processado para a extração do óleo vegetal.

Na produção de protease por processo submerso utilizando *A. terreus*, Wu *et al.* (2006) observaram máxima atividade da enzima de 129 U/mL após 4 dias de fermentação do meio, que utilizou resíduo de óleo de palma como substrato. Concluíram que a adição de nutrientes e controle do pH não afetaram

significativamente o rendimento do processo, porém, a diluição do meio de 75% para 100% diminuiu a atividade em 40%. Na obtenção de extratos proteolíticos por meio de FES pelo fungo *A. oryzae* utilizando farinha de peixe como substrato, García-Gómez *et al.* (2008) obtiveram uma atividade da protease alcalina (pH 10,0) de 120 U/L. Após estudos, puderam verificar que a enzima produzida no experimento apresentou maior grau de hidrólise, comparando-se com a enzima obtida comercialmente (22,2% contra 9,1%, respectivamente). Apesar de não ser possível a comparação dos resultados apresentados pelos autores mencionados com os resultados deste estudo, pode-se verificar que a produção de protease, detectada pelos métodos analíticos empregados, pode viabilizar a utilização do farelo de soja como substrato, uma matéria prima abundante e de baixo valor comercial.

Já para a invertase, o melhor valor de AE_{esp} (13,8666 U/mL.g de proteína), foi obtido para a maior quantidade de fonte de nitrogênio presente no meio fermentativo (2%) e para o maior valor de pH (9,0), confirmando assim a orientação indicada pelas superfícies de resposta. Investigando a otimização dos meios de cultura para a produção de invertase por *A. niger* utilizando FES e FSm, Balasubramaniam *et al.* (2001) observaram máxima produtividade no processo em estado sólido, utilizando bagaço de cana como substrato, de 149,1 U/L.h. Concluíram que este processo favorece a produção da enzima em maior quantidade, se comparado com o processo submerso (58,3 U/L.h). No estudo da regulação da síntese da invertase por *A. niger*, Rubio e Navarro (2006) obtiveram máxima atividade da enzima de 4,0 U/mL, em meio nutriente com adição de sacarose (10g/L), em fermentação sólida. Ao observar os resultados obtidos para a invertase com farelo de soja convencional e adição de nutrientes, utilizando *A. asiellus*, pode-se constatar que este processo torna-se interessante para a produção da enzima, pois apresentou resultados de AE superior ao mencionado por Rubio e Navarro (2006).

3.2. Otimização dos parâmetros da FES com *A. asiellus*

Foi avaliada a produção da invertase, utilizando os melhores parâmetros obtidos no estudo anterior: farelo de soja convencional como substrato, concentração inicial de inóculo de 4.10^6 esporos/gms, tempo de fermentação de 144h, umidade inicial do meio fermentativo de 50%, diâmetro de partícula de 0,6mm e temperatura de 28°C. Os efeitos negativos obtidos para fonte de C, fonte de C e N e fonte de minerais (Tabela 2), mesmo sendo não significativos, podem indicar que atividades mais elevadas de invertase serão obtidas em concentrações mais baixas dessas fontes, não influenciando de maneira decisiva produção da enzima. Por este motivo, apenas as variáveis pH inicial do meio e fonte de N (C_N) serão avaliadas. Para isso será usado um planejamento do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) com duas variáveis. Neste tipo de planejamento é possível, por meio da análise de regressão dos pontos experimentais, gerar modelos quadráticos, resultando em superfícies de resposta curvas (Rodrigues e Iemma, 2005). As especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento com as variáveis nas suas formas codificadas e os resultados obtidos para atividade enzimática específica (AE_{esp}) são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Matriz do planejamento DCCR.

Ensaio	Fonte de N (%), NaNO ₃	pH	AE _{esp} (U/mL.g proteína)
1	-1 (1,6)	-1 (6,7)	11,0905
2	+1 (4,4)	-1 (6,7)	12,6218
3	-1 (1,6)	+1 (10,3)	10,2121
4	+1 (4,4)	+1 (10,3)	10,0342
5	-1,414 (1,0)	0 (8,5)	11,2345
6	+1,414 (5,0)	0 (8,5)	13,7254
7	0 (3,0)	-1,414 (6,0)	9,4178
8	0 (3,0)	+1,414 (11,0)	10,2225
9	0 (3,0)	0 (8,5)	11,9579
10	0 (3,0)	0 (8,5)	17,4121
11	0 (3,0)	0 (8,5)	12,0953
12	0 (3,0)	0 (8,5)	11,9476

O maior valor para a atividade da enzima é observado no ponto central do experimento (ensaio 10). Na Tabela 5 são apresentadas as estimativas dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE_{esp} da invertase, onde (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 5: Estimativa dos efeitos para AE_{esp} para o planejamento DCCR.

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

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

Nota-se que nenhuma das variáveis e interações avaliadas foi significativa. A análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 6, com um nível de significância de 95%. O valor tabelado de F, com seus respectivos graus de liberdade é: $F_{\text{tab}} (5;6;0,05) = 4,39$.

Tabela 6: Análise de variância obtida para o planejamento DCCR.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}
Regressão	25,36	5	5,07	1,20
Resíduos	25,27	6	4,21	
Total	50,63	11		

$R^2 = 0,501$

Pelo teste F nota-se que $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ para as atividades enzimática e enzimática específica da invertase, logo, o modelo linear proposto não é válido para prever o comportamento do processo em ambos os casos. Isto também fica evidenciado pelo baixo coeficiente de correlação R^2 . Entretanto pode-se utilizar a superfície de resposta com o intuito de verificar a direção a ser tomada para a realização de novos estudos que conduzam a maiores valores de AE_{esp}.

O gráfico da Figura 2 mostra a superfície de resposta, onde pode-se observar que um aumento da AE_{esp} é alcançando se o valor da fonte nitrogênio for aumentado e o valor do pH inicial for diminuído.

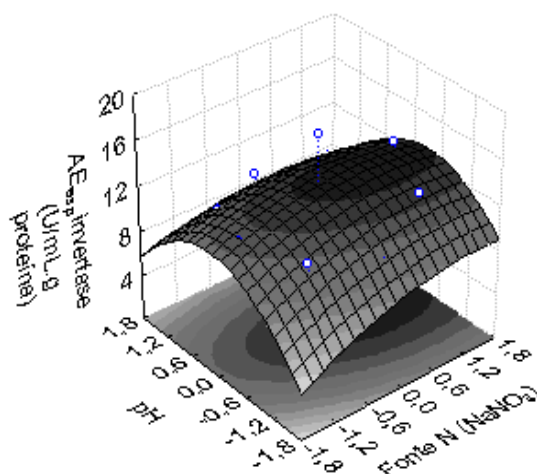


Figura 2: Superfície de resposta para AE_{esp} da invertase.

Observando os resultados da Tabela 4, os melhores valores AE_{esp} encontram-se nos pontos centrais do planejamento; os pontos extremos (-1,414 e +1,414) apresentam os piores resultados. Assim, avaliando estas respostas de acordo com os resultados apresentados na análise estatística do planejamento, que indicam valores maiores para fonte de nitrogênio e valores menores para pH, pode-se concluir que o melhor pH e a melhor quantidade de fonte de nitrogênio para a produção da enzima por *A. casingii* com farelo de soja é 6,7 e 3%, respectivamente.

Mamma *et al.* (2008) observaram uma máxima atividade da invertase de 72,5 U/g de substrato com 90% de umidade e pH 5,0, utilizando *A. niger*, na produção de enzimas para a indústria de processamento de cítricos, obtendo resultados satisfatórios na degradação de polissacarídeos da laranja. Também utilizando *A. niger*, L'Hocine *et al.* (2000) obtiveram máxima atividade da invertase no extrato cru de 72U/g de substrato, utilizando sacarose, na purificação e caracterização da enzima. Os resultados obtidos neste estudo, embora sejam de difícil comparação com os resultados apresentados pelos autores, indicam uma capacidade de produção de invertase pelo fungo, utilizando farelo de soja como substrato. Ainda, que dos fatores avaliados no estudo, os que mais apresentam influência na obtenção da enzima são a fonte de nitrogênio e o pH inicial do meio fermentativo.

3.3. Curvas de crescimento do *A. casingii*

A partir dos resultados da otimização foram construídas curvas de crescimento do *A. casingii* para a protease e invertase. A FES foi conduzida utilizando-se farelo de soja convencional como substrato, 50% de umidade inicial do meio, temperatura de 28°C, tempo de fermentação de 168h, diâmetro de partícula de 0,6mm, concentração inicial do inóculo de 4.10^6 esporos/gms, pH 6,7 e 3% de fonte de nitrogênio ($NaNO_3$).

Com relação ao desenvolvimento do microrganismo, espera-se observar um consumo do substrato pelo microrganismo ao longo do processo, o que proporcionará a produção de metabólitos. Este comportamento é observado na no gráfico da Figura 3 (A), onde o perfil de consumo de ART decresce entre 0 e 48h e após,

apresenta-se constante. A variação temporal de proteína é apresentada na Figura 3 (B), onde seu conteúdo pode evidenciar, de forma indireta, a produção de biomassa fúngica ao longo do processo de fermentação.

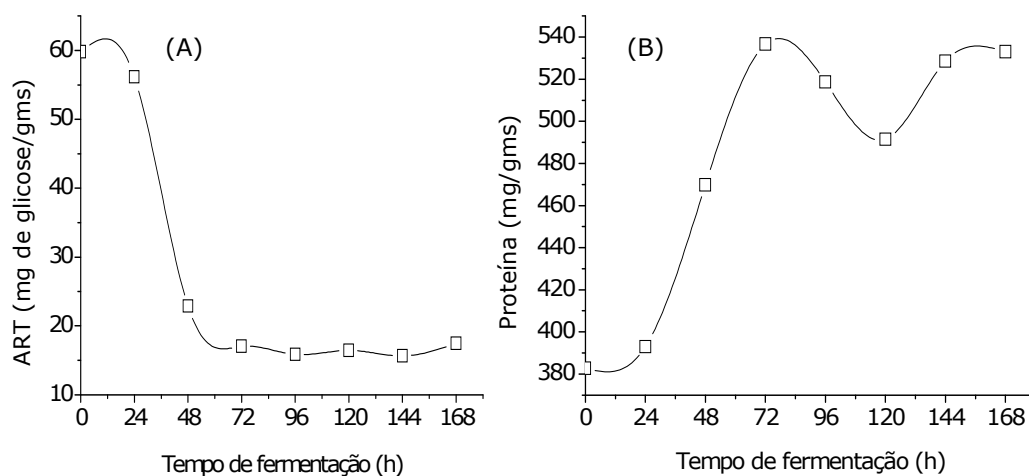


Figura 3: Variação temporal para o farelo de soja convencional, (A) ART; (B) proteína.

Nota-se o perfil crescente da proteína entre 0 e 72h de fermentação. Após, ocorre uma variação em 120h, onde pode-se pressupor uma ocasional discrepância nas rotas metabólicas tomadas pelo fungo, em função de características particulares do substrato. Não se observa um perfil característico de crescimento do fungo, relacionado ao teor de proteína. Isto pode ser explicado pela produção crescente de protease (Figura 4 (A)), a qual pode estar degradando as formas protéicas produzidas

Nos perfis de atividade da protease (Figura 4 (A)), há um crescimento ao longo do processo fermentativo, onde os maiores valores de AE e AE_{esp} são observados após 144h de fermentação, sendo que a atividade específica apresentou o maior valor (25,92 U/g de proteína). Já no gráfico da Figura 4 (B) são apresentados os perfis de atividades para a invertase. Os valores mais altos foram obtidos para 48h de fermentação (AE 6,48 U/mL e AE_{esp} 14,6 U/mL.g de proteína). Após, mantiveram um comportamento constante, com uma pequena oscilação em 120h.

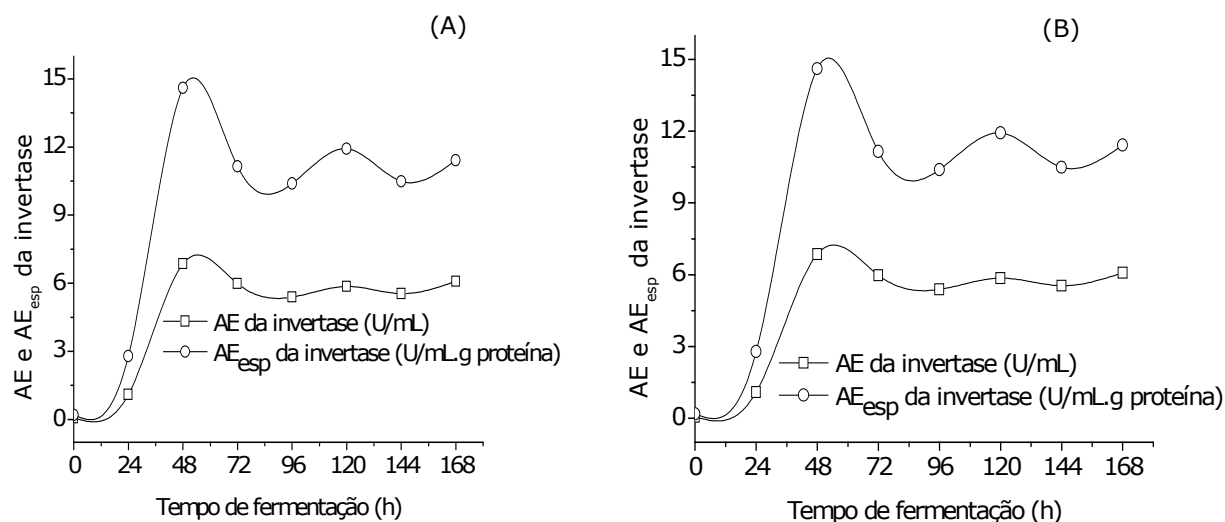


Figura 4: Perfis de AE e AE_{esp}, (A) protease; (B) invertase.

Na produção de amilase e protease por uma linhagem de *A. oryzae* mutante, Biesebeke *et al.* (2005) obtiveram máxima atividade proteásica de 61 U/g de substrato, utilizando trigo, em pH 5,5 após 6 dias de fermentação. Já Su *et al.* (2005) observaram máxima atividade de protease de 1150,0 U/g de substrato em milho de soja fermentado por *A. oryzae* e *A. sojae*, a 55°C, por um período de incubação de 48h. Apesar de apresentar resultados inferiores de AE (13,70 U) em relação aos resultados mencionados pelos autores, a produção de protease por *A. casingii* com farelo de soja convencional, 50% de umidade inicial e pH 6,7 apresentou-se satisfatória, bem como em todos os estudos realizados neste trabalho. Referente a invertase, na produção da enzima por *A. niger* em processo em estado sólido, Romero-Gómez *et al.* (2000) obtiveram máxima produtividade de 125 U/L.h, a 30°C em meio contendo sacarose e nitrato de sódio, observando uma maior produtividade em comparação ao processo submerso (21 U/L.h). Vargas (2004), avaliando efeitos de ultrassom na invertase de *A. niger* obtiveram uma atividade específica da enzima de, aproximadamente, 10 U/g de proteína, em meio contendo sacarose, peptona e melão de cana, concluindo que o fungo utilizado apresenta grande potencial para produção desta enzima, em nível industrial. Desta maneira, os resultados que foram apresentados neste estudo para a obtenção de invertase indicam que a fermentação conduzida por *A. casingii* com farelo de soja convencional e fonte de N apresentam bons resultados, quando comparado ao resultado obtido por Vargas (2004). Sendo assim, pode-se explorar o potencial dos resíduos de soja na produção de invertase fúngica, onde espera-se obter quantidades significativas da enzima.

4. Conclusão

Nos estudos conduzidos com o fungo *A. casingii*, onde foi utilizado farelo de soja convencional como substrato e fonte de nutrientes para a otimização do meio fermentativo, as enzimas invertase e amilase apresentaram produção. Porém, no estudo de otimização do meio, as variáveis avaliadas não apresentaram significância na produção de amilase, indicando que para a produção desta enzima com farelo de soja deve-

se tomar um caminho que avalie condições de fermentação diferentes das adotadas neste trabalho. Por outro lado, com a utilização de 2% de fonte de carbono e nitrogênio e 2% de fonte minerais, a atividade enzimática específica da protease foi a mais elevada observada em todo o trabalho (104,06 U/g de proteína). Já a invertase apresentou resultados de atividade superiores nos ensaios conduzidos com meio otimizado, indicando que o caminho traçado pelas variáveis é adequado à sua produção.

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (A.O.A.C.). 1984. *Official methods of analysis*. 12^a ed., Washington D.C., Oma, 1141 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (A.O.A.C.). 1996. *Official methods of analysis*. 16^a ed., Washington D.C., Oma, 1105 p.
- BALASUBRAMANIAM, A.K.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. 2001. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **37**(4):331-338. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00204-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00204-7)
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 2007. *Como fazer experimentos*. Campinas, Editora UNICAMP, 473 p.
- BIESEBEKE, R.; RECORD, E.; BIEZEN, N.; HEERIKHUISEN, M.; FRANKEN, A.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J. 2005. Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**(1):44-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1968-4>
- DEUTSCHER, M.P.; SIMON, M.I.; ABELSON, J.N. 1990. *Guide to protein purification*. New York, Academic Press, 894 p.
- GÁRCIA-GÓMEZ, M.J.; HUERTA-OCHOA, S.; LOERA-CORRAL, O.; PRADO-BARRAGÁN, L.A. 2008. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, **112**(3):604-608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.016>
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N.; SOCCOL, C.R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(2):246-251. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00283-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00283-1)
- HASAN, S.D.M. 2002. *Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de Drechslera (Helminthosporium) monoceras obtida por fermentação em estado sólido*. Campinas, SP. Tese de Doutorado. UNICAMP, 133 p.
- LERAYER, A.L.S. 1993. Biotecnologia na indústria de alimentos. Conselho de informações sobre biotecnologia. Acessado em 15/12/2009, disponível em: http://www.cib.org.br/apresentacao/texto_alda_lerayer.pdf
- L'HOCINE, L.; WANG, W.; JIANG, B.; XU, S. 2000. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*, **81**(1):73-84. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00277-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00277-7)
- MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, **99**(7):2373-2383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.018>
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, **31**(3):426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. 1988. Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988. Estabelece os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. *Diário Oficial da União*. Brasília, 29 p.
- PANDEY, A. 1991. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. *Process Biochemistry*, **26**(6):335-361. [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(91\)85026-K](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(91)85026-K)
- PANDEY, A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**(2):109-117. [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W)
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. 2005. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 1^a ed., Campinas, Casa do Pão Editora, 326 p.

- ROMERO-GÓMEZ, S.J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, **22**(15):1255-1258. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005659217932>
- RUBIO, M.C.; NAVARRO, A.R. 2006. Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**(4):601-606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.011>
- SU, N.W.; WANG, M.L.; KWOK, K.F.; LEE, M.H. 2005. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(5):1521-1525. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0486390>
- VARGAS, G.D.L.P. 2004. *Estudo da produção de lipase por Penicillium simplicissimum utilizando torta de soja como substrato*. Erechim, RS. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 87 p.
- WU, T.Y.; MOHAMMAD, A.W.; JAHIM, J.Md.; ANUAR, N. 2006. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**(6):1223-1229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.007>

Submissão: 03/03/2010

Aceite: 08/03/2010