

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

Parecer
Este exemplar corresponde a pedacinho final da tese defendida por Vanildo Luiz Del Bianchi e aprovada pela Comissão Julgadora em 17.08.90.
Campinas, 17 de agosto de 1990.

Moraes

BIB H

PRODUÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS ÁCIDAS
POR FERMENTAÇÃO FÚNGICA EM MEIO SEMI-SOLIDO.

Autor: Vanildo Luiz Del Bianchi 217

Orientadora: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes 217

15/90

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas - SP

- 1990 -

UNICAMP

BANCA EXAMINADORA



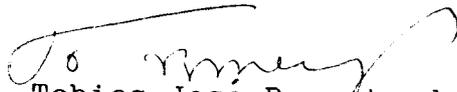
Dra. Iracema de Oliveira Moraes
Orientadora



Dra. Maria Helena Andrade Santana
Membro



Dr. Ranulfo Monte Alegre
Membro



Dr. Tobias José Barrêto de Menezes
Membro

Aos meus pais, Seo Sebastião e Dona Maria,
por tudo que sonharam e fizeram por mim.

A Cris,
companheira de todos os momentos,
e de todos pensamentos.

A orientadora e amiga

Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes,

pela ajuda e incentivo ao meu
desenvolvimento científico e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pelas sugestões e estímulos dados durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Ossamu Hokka, pelo estímulo e orientação no período inicial de meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Gentil Luiz de Faria, pelo auxílio dado na elaboração final deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, particularmente ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem a realização deste trabalho.

A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA), pelo custeio da confecção desta tese.

A FAPESP e à CAPES, pela concessão de Bolsas durante a execução deste trabalho

As Eng. Maria Isabel Rodrigues e Maria de Fátima Costa, pela dedicação e valiosa ajuda durante a fase de experimentos de laboratório.

A João Carlos Camargo de Oliveira, pela ajuda dada na fase final dos experimentos.

Aos colegas do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE - São José do Rio Preto, pelos estímulos e amizade sempre presentes.

A todos aqueles, amigos de canto e de papos que, embora não mencionados, sempre estiveram presentes ao meu lado ou em meu pensamento.

RESUMO

Foram examinadas vinte linhagens de fungos (dez já cadastradas e dez isoladas da natureza) com o intuito de se obter a que produzisse um extrato enzimático proteolítico de melhor atuação em meio ácido através de uma fermentação semi-sólida, verificando-se que *Aspergillus awamori* NRRL 3112 produz alta atividade enzimática em pH ácido ao ser comparado às demais linhagens.

A produção do extrato bruto extracelular foi obtida em erlenmeyers de 250 mL, a 37°C, utilizando-se 2,0g de farinha de soja enriquecida com 10% de sacarose ou 5% de extrato de levedura, umedecida em solução-tampão acetato pH 7,9, à proporção de 1:1 (sólido/líquido). Nestas condições, o extrato enzimático é obtido em 32 horas.

Este extrato enzimático apresenta uma atividade máxima a pH 3 e a 50°C, uma estabilidade térmica entre 20 a 60°C quando incubado por 10 horas a essas temperaturas, e uma estabilidade entre os pH 2 e 8.

Apresentaram pequena redução na atividade enzimática os íons cálcio, zinco, ferro e lítio, enquanto que os íons magnésio, bário, cobre, manganês e potássio, além de EDTA, mostraram ter uma influência positiva na atividade da enzima.

ABSTRACT

Twenty strains of molds were examined in order to obtain the one that produces proteolytic enzymatic extract of better performance in acid medium from a semi-solid fermentation. *Aspergillus awamori* NRRL 3112 produced high enzymatic activity compared with other strains.

The extracellular raw extract production was obtained in 250 mL erlenmeyers, at 37°C, with 2,0g of soybean flour enriched with 10% of sucrose or 5% of yeast extract, moistened with buffer acetate solution pH 7.9 at rate of 1:1 (w/v). Under these conditions, the enzymatic extract is obtained in 32 hours.

The enzymatic extract presents the highest activity at pH 3 and at 50°C, a thermic stability between 20 and 60°C, when incubated during 10 hours, and a pH stability between 2 and 8.

Ions calcium, zinc, lithium and iron presented a little reduction in the enzymatic activity whereas ions magnesium, barium, copper, potassium, manganese, besides EDTA, proved to have a positive influence.

3.9. Equipamentos	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Pré-seleção de linhagens produtoras do extrato enzimático	39
4.2. Obtenção da linhagem melhor produtora	41
4.3. Efeito da temperatura na produção	47
4.4. Efeito do pH na produção	53
4.5. Efeito do teor de umidade na produção	55
4.6. Efeito da concentração de inóculo na produção ...	57
4.7. Efeito do meio de cultura na produção	59
4.8. Efeito da espessura da camada de substrato na produção	68
4.9. Efeito do pH na atividade enzimática	75
4.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática ...	75
4.11. Efeito da temperatura na estabilidade	78
4.12. Efeito do pH na estabilidade	78
4.13. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade enzimática	78
5. CONCLUSÕES	82
6. SUGESTÕES	84
7. BIBLIOGRAFIA	85

1. INTRODUÇÃO

As enzimas desempenham, nos dias de hoje, um importante papel nas atividades industriais. Sua utilização implica em uma redução nos custos de produção, quer na otimização dos processos (aumento de rendimento e melhoria do produto), quer na criação de novos produtos. Porém, embora haja diversas aplicações industriais já desenvolvidas, ainda há um imenso potencial a ser pesquisado.

O amplo grupo denominado de enzimas proteolíticas (também conhecido por proteases ou peptide hidrolases), o qual pertence à classe das enzimas hidrolíticas, se caracteriza pela capacidade de hidrolisar ligações peptídicas existentes em uma molécula de proteína, dando origem a peptídeos menores e amino-ácidos.

Este grupo de enzimas é um dos mais importantes dentre as enzimas comercializadas e utilizadas pela indústria atualmente. Sua produção abrange 59% do total mundial e, de um mercado total de 400 milhões de dólares comercializados em 1982, as enzimas proteolíticas (proteases e reninas) totalizaram, somente elas, 215 milhões de dólares (66).

Ocorrendo em abundância na natureza, as enzimas proteolíticas podem ser obtidas a partir de origem animal, vegetal ou microbiana. A produção de enzimas microbianas é atualmente, salvo poucas exceções, a mais utilizada industrialmente, pois tem apresentado algumas excelentes vantagens em relação às demais.

Para a obtenção de uma enzima microbiana, deve-se levar em conta que a mesma tenha aplicabilidade industrial, seja obtida com baixo custo, altos rendimentos e em curto espaço de tempo, preferencialmente extracelular e facilmente isolada do caldo fermentado.

Proteases ácidas microbianas são fundamentalmente de origem fúngica, possuindo propriedades similares à pepsina ou à renina, e que constituem um grupo que apresenta uma melhor atividade a pH baixos.

Para a produção dessas enzimas, podem ser utilizados basicamente, dois tipos de processos: a fermentação semi-sólida, onde o microrganismo é inoculado em um meio sólido umedecido, em ausência de água livre e a fermentação submersa, onde o meio está suspenso ou dissolvido em uma solução aquosa.

A fermentação em meio semi-sólido, utilizada há muito tempo na obtenção de produtos de importância comercial, a partir de substratos de baixo custo e disponíveis, vem sendo empregada predominantemente em países orientais. Este processo apresenta, em relação ao processo submerso, tanto vantagens operacionais como limitações, sendo necessários estudos relativos à utilização de um ou outro método.

Uma seleção adequada de substratos sólidos é de fundamental importância para o sucesso de uma fermentação. Estes substratos são constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares.

Devido a pequena quantidade de água no meio e a incapacidade de outros microrganismos penetrarem profundamente no tecido dos substratos sólidos, a classe microbiana mais comumente utilizada no processo semi-sólido é a dos fungos filamentosos, pois estes, por sua vez, por intermédio do crescimento de suas hifas, tem certa facilidade em se fazer penetrar pelos espaços inter e intracelular por meio mecânico e/ou enzimático.

Por isso, a fermentação semi-sólida pode ser uma técnica preferida para a produção de algumas enzimas de utilização industrial, principalmente de origem fúngica, como é o caso das proteases ácidas.

Este estudo tem por objetivos:

- verificar a viabilidade de obtenção de uma protease ácida, em meio semi-sólido, a partir de fungos que apresentem uma produção em curto espaço de tempo, de caráter extracelular e de fácil extração do caldo fermentado;

- otimizar o processo em cultura semi-sólida a partir da variação de parâmetros essenciais à fermentação, tais como temperatura, pH inicial, concentração de inóculo, teor de umidade, tipo de substrato e influência da espessura da camada de substrato;

- Caracterizar a solução proteolítica fúngica ácida que apresente a melhor atividade enzimática ao final de todas as etapas acima descritas, quanto a estabilidade térmica e de pH, temperatura e pH ótimos da atuação e influência de íons metálicos e agente quelante.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. ENZIMAS PROTEOLITICAS

2.1.1. CLASSIFICAÇÃO

2.1.1.1. Quanto a sua origem:

Ocorrendo em abundância na natureza, as enzimas proteolíticas de uso comercial podem ser obtidas a partir de origem animal (pepsina, renina, tripsina, quimotripsina), vegetal (42) (papaina, bromelina, ficina) ou microbiana (fúngicas, bacterianas) (89,91).

A produção das enzimas microbianas apresentam como vantagens, em relação à de origem animal e vegetal, a obtenção do produto desejado em espaços relativamente reduzidos, um elevado nível de produtividade e especificidade, menor tempo de produção, possibilidade de controle dos parâmetros ótimos de produção, não dependência de condições climáticas e utilização de resíduos industriais e agrícolas como substratos (89).

2.1.1.2. Quanto ao pH ótimo de atuação

As proteases microbianas, de acordo com a faixa de pH ótimo de atuação, podem ser divididas em alcalinas, neutras e ácidas (7,20,38).

Amplamente obtidas a partir de fungos e bactérias (principalmente do gênero Bacillus), as proteases alcalinas possuem peso molecular na faixa de 18000 a 34000, são estáveis na faixa de pH entre 5 e 10, e apresentam a atuação ótima entre os pHs 9,5 e 10,5. Mostram poderosa ação de esterase, tal qual a tripsina e a quimotripsina, são rapidamente inativadas a 65°C. São inibidas por DFP (Diisopropilfluorfosfato) e não são inibidas pelo inibidor de tripsina da soja, agentes quelantes e agentes sulfidrilas (20,38,40). Com aplicações na indústria de detergente e de alimentos, tem nas subtilisins extracelulares as enzimas mais largamente estudadas (20,40).

As proteases neutras tem o pH ótimo de atuação entre 7,0 e 8,0 e são sensíveis a agentes quelantes tais como o EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético) e a o-fenantro-lina, mas não são inibidas por DFP ou agentes sulfidrilas. São enzimas que contêm zinco em sua estrutura molecular (um átomo-grama de zinco para cada grama-mol de enzima (38)), o qual, se for removido por diálise contra soluções de agentes quelantes, ocasionará a inativação da enzima, havendo uma reativação caso haja a readição de zinco ou de outros íons metálicos bivalentes (20,38). O peso molecular situa-se na faixa entre 36000 a 45000. São as menos estáveis das proteases microbianas, estabilidade esta que se situa na faixa de pH entre 6,0 e 9,0, decrescendo rapidamente fora dela. Apresentam, de modo geral, atividade máxima na faixa entre 45-50°C, sendo estáveis até 65°C. Hidrolisam ligações que contenham principalmente aminoácidos

cidos hidrofóbicos, como a leucina e a fenilalanina (20). Os principais microrganismos produtores são bactérias do gênero Bacillus (20,38,40) embora o fungo Aspergillus oryzae seja também um excelente produtor (38).

As proteases ácidas são fundamentalmente de origem fúngica, possuindo propriedades similares à pepsina ou à renina, e constituem um grupo que apresenta uma melhor atividade a valores baixos de pH (entre 2 e 5). Hidrolisam uma ampla faixa de ligações peptídicas, exibindo geralmente atividades endo e exo proteolíticas. São insensíveis a reagentes sulfidrilas, agentes quelantes, metais pesados e ao DFP. A estabilidade de atuação está situada, na maior parte dos casos pesquisados, na faixa de pH entre 2 e 6, sendo rapidamente inativadas a pH de valores maiores, assim como a temperaturas superiores a 50°C. Várias proteases ácidas apresentam, como característica comum, a pequena quantidade de aminoácidos básicos e baixos pontos iso-elétricos, sendo que o peso molecular médio situa-se em torno de 35000 (20,38). Possuem uma interessante capacidade de ativar o tripsinogênio a um pH entre 3 e 4 (16, 80). Os principais microrganismos utilizados são do gênero Aspergillus (principalmente o grupo dos Aspergilli negros tais como A.niger, A.awamori, A.saitoi e A.usamii) e Rhizopus (7).

2.1.1.3. Quanto ao mecanismo de atuação

Baseado neste mecanismo, há quatro principais grupos: as proteases serinas, proteases thiol ou sulfidrilas, proteases metálicas e proteases ácidas. As proteases serinas são mais ativas a valores de pH neutro e alcalino e são inibidas por DFP; as proteases sulfidrilas tem um pH ótimo perto de 7,0 e são ativadas por agentes redutores, mas inibidas por reagentes sulfidrilas; as proteases metálicas tem um pH ótimo de atividade na faixa neutra e alcalina e são inibidas por reagentes quelantes de metais tal como o EDTA; as proteases ácidas são mais ativas a baixos valores de pH e são geralmente sensíveis ao Diazoacetil Norleucina Metilester (40, 92).

2.1.1.4. Quanto a formação de produtos

Outra classificação é feita a partir da ação da hidrólise enzimática na molécula.

As proteinases são enzimas que hidrolisam moléculas de proteínas formando peptídeos de diferentes pesos moleculares, enquanto que as peptidases hidrolisam fragmentos polipeptídicos em pequenos peptídeos e aminoácidos (4,55,78). Os preparados enzimáticos microbianos são geralmente constituídos destes dois tipos de enzimas (55).

PROPRIEDADES DAS PROTEASES MICROBIANAS EXTRACELULARES (20)

PROTEASES	FONTE	FAIXA DE PH MAX. AT. MAX. EST.	PESO MOLECULAR	METALO ENZIMA	INIBIÇÃO DFP EDTA	ATIV. ESTERASE	PRINCIPAIS USOS
Acida	Fungos	2-5 2-6	35000	Não	Não	Limitada	Alimentos
Neutra	Bacter. Fungos	7-8 7-9	45000	Sim	Não	Sim Ausente	Alimentos
Alcalina	Bacter.	9-11 5-10	28000	Não	Sim	Não Muito Alta	Detergente Curtume

Segundo Nakadai et al (55), aminoácidos livres são liberados por proteases ácidas na preparação de mi-so. Em seus estudos, na solução enzimática, a proteinase ácida de Aspergillus oryzae não mostrou nenhuma atividade de carboxipeptidase nem de aminopeptidase, liberando uma ínfima quantidade de aminoácidos. Porém, foi verificada a presença de uma carboxipeptidase ácida que era a responsável pela liberação de grandes quantidades de aminoácidos livres (55,58).

2.1.1.5. Quanto a atuação na cadeia protéica

Cada enzima proteolítica apresenta uma especificidade de atuação sobre determinado substrato, dependendo da composição e conformação deste, podendo ser divididas em endo e exopeptidases.

As exoproteases produzem unidades de aminoácidos através da hidrólise de ligações peptídicas da proteína a partir do final da cadeia molecular. As que atacam o final carboxílico da molécula são denominadas carboxipeptidases e as que atacam o final amino, aminopeptidases.

As endoproteases rompem ligações peptídicas, geralmente resíduos específicos, no interior da cadeia protéica formando peptídeos e polipeptídeos menores sem, porém, formar um grande número de unidades de aminoácidos no final da reação. A atuação destas enzimas é mais complexa, estando sua especificidade relacionada à natureza das ligações peptídicas que irão atacar. A tripsina, por exemplo, atua somente nas li-

gações que contiverem resíduos de lisina ou arginina. A protease bacteriana alcalina subtilisin rompe um maior número de ligações, tendo por preferência resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos (61).

2.2. UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

O desenvolvimento de pesquisas fundamentais e aplicações industriais das enzimas proteolíticas, deveu-se principalmente aos estudos relacionados com sua aplicação na produção de detergentes. Outras importantes aplicações destas enzimas encontram-se nas indústrias de couros, textil, química (na recuperação da prata em filmes fotográficos usados e na desproteinição da borracha), farmacêutica e alimentícia (20, 38).

As principais aplicações das enzimas proteolíticas, na indústria de alimentos, estão relacionadas com sua utilização: na elaboração de molho de soja e outros alimentos fermentados orientais; na produção de biscoitos; na melhoria da consistência da massa do pão e redução do tempo de mistura; no desenvolvimento de corpo e sabor, no auxílio da filtração e na eliminação da turbidez na produção de cerveja (20); como amaciante de carnes, na recuperação das proteínas junto aos ossos e na hidrólise de coágulos de sangue (20,53,67); para diminuir a viscosidade da clara do ovo facilitando a filtração antes da desidratação; em ajudar na preparação de alimentos e bebidas à base de soja (leite de soja e hidrolisados protéicos), melhorando a solubilidade de sua proteína (2,64); na hidrólise do material ge-

latinoso protéico dos resíduos de pescado na preparação de farinha de peixe e hidrolisado protéico, reduzindo a viscosidade e facilitando sua concentração e desidratação, além de recuperar óleos e proteínas de partes não comestíveis (49,50,53); como auxiliar digestivo; como coalho na fabricação de queijos; em melhorar as características de manuseio de cereais; na conversão de subprodutos e resíduos industriais em ração animal; e para ajudar na preparação de sopas desidratadas, carnes processadas e alimentos para dietas especiais (20, 64).

As proteases microbianas com aplicações na indústria de alimentos são todas extracelulares, necessitando para a extração do extrato enzimático bruto em culturas semi-sólidas apenas um processo de adição de solvente e filtração. Para meios de cultura líquidos, são necessárias as etapas de filtração e concentração do extrato obtido.

Além das enzimas proteolíticas (e geralmente são encontradas mais de uma no caldo fermentado), outras enzimas diversas nem sempre desejáveis podem ser produzidas e, dependendo da aplicação do produto fermentado, torna-se necessária uma purificação adicional (7).

Em sua aplicação, a hidrólise enzimática possibilita obter melhores propriedades funcionais das proteínas dos alimentos sem que haja uma perda em seu valor nutricional. É importante, porém, o controle da reação para se obter uma uniformidade na qualidade dos produtos e para prevenir a formação de peptídeos que transmitam um sabor amargo aos alimentos (2).

2.3. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A aplicação de uma enzima proteolítica, assim como o desenvolvimento de novas aplicações, estão relacionados com estudos de uma matéria prima a ser modificada, ou seja, o quanto pode ser modificada, como medir esta modificação e qual a utilização do produto obtido.

Portanto, a escolha de uma protease para uma determinada aplicação deve levar em consideração a especificidade dessa enzima, o grau de hidrólise que se obtém com seu uso e os produtos finais que são obtidos (2,61).

A intensidade de hidrólise de uma proteína depende da especificidade de atuação da enzima proteolítica empregada e da conformação protéica do substrato, pois nem toda a ligação passível de ser rompida pela enzima pode estar acessível a ela. Neste caso, será necessário um pré-tratamento sobre a cadeia protéica para a otimização do processo (1,61).

Essa intensidade de hidrólise vai depender da finalidade do uso do produto final (2). Em detergentes, deseja-se o maior número de rompimentos possíveis para eliminar manchas de origem protéica (35). Para a produção de queijos, deseja-se romper apenas determinadas ligações, pois uma hidrólise maior resulta na produção de um sabor amargo além de uma perda de rendimento (2,61).

A atividade enzimática descreve a habilidade de uma enzima em catalisar uma reação sob determinadas condições, quantificando os produtos formados ou substratos transformados por unidade de tempo (61).

A atividade específica, que fornece indicação da capacidade de atuação ou a concentração da atividade enzimática, é determinada pela intensidade da reação observada pela quantidade de proteína enzimática utilizada. Este é um importante valor para se determinar o preço de venda, a dosagem de utilização, assim como seu preço de uso (61).

Para o acompanhamento do curso de uma reação, utiliza-se o fato de que, para qualquer ligação peptídica rompida, são gerados um grupo amino livre e um ácido carboxílico, assim como há o aumento do número total de moléculas (61).

Em vista disso, diferentes modelos de monitoramento da atividade enzimática são apresentados:

- Análise da Reação dos Grupos Amino com Agentes Químicos

O grupo amino gerado pela hidrólise enzimática é capaz de reagir com agentes químicos resultando em um complexo colorido, cuja intensidade pode ser medida em um espectrofotômetro.

Como agentes cromogênicos, podem ser utilizados o ácido trinitrobenzenosulfônico (3), ninidrina (54,68,80,90), reagente Folin-Ciocalteu (1,42,48,52,62,67,70,78,80) e o-ftalaldeido. Estes métodos fornecem os valores totais da hidrólise sendo, porém, lentos e/ou relativamente complexos (61).

- Método de Absorção em Luz Ultravioleta

A maior parte dos aminoácidos são praticamente transparentes na região entre 250-320nm, exceto tirosina, triptofano e fenilalanina (esta última com contribuições insignificantes) que são as responsáveis pela absorção da luz observada nesta faixa em uma solução protéica (23).

Diversos autores utilizaram este método, na faixa entre 275-280nm, para medir a quantidade de tirosina obtida no sobrenadante da precipitação da solução contendo produtos formados pela digestão da caseína (1,7,16,18,21,23,35,43,58), da hemoglobina (1,6,7,80) ou da albumina bovina (80), por enzimas proteolíticas a diferentes temperaturas, pH e tempos de reação.

- Análise da Distribuição do Peso Molecular por Cromatografia em Gel

Este método é utilizado quando se desejar relacionar o grau de hidrólise obtido com a distribuição do peso molecular dos diversos produtos formados, utilizando-se colunas contendo géis de diferentes porosidades (75).

- Análise da Viscosidade do Meio

A hidrólise de ligações peptídicas de uma solução reduz a viscosidade do meio, podendo ser relacionada com a atividade enzimática. A estimativa desta atividade é obtida pela redução da viscosidade de uma solução de gelatina a 37°C após 5 min (7, 61).

- Neutralização dos radicais ácidos livres

Com a hidrólise das ligações peptídicas, o pH da solução tende a cair devido a formação de radicais livres. A adição de uma base e a manutenção do pH pode ser relacionado com o número de ligações rompidas e, conseqüentemente, com o grau de hidrólise obtido (%DH) (definido pelo número de ligações peptídicas hidrolisadas dividido pelo número total de ligações peptídicas existentes na molécula protéica ($\times 100$)) (2,10,61).

2.4. FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATOS SÓLIDOS

Para a produção de enzimas, são utilizados basicamente dois tipos de processos: a fermentação semi-sólida e a fermentação líquida submersa.

Define-se por fermentação semi-sólida (ou fermentação em estado sólido) o processo em que há o crescimento microbiano, e conseqüente transformação do substrato, contituído de materiais sólidos umedecidos, sem a presença de água livre (11,15,30,31), embora a linha divisória desta característica não seja facilmente detectável e dependa mais da capacidade de absorção do material utilizado do que da quantidade de umidade introduzida (11,81).

A utilização do material sólido, por parte dos microrganismos, pode acontecer de duas formas: quando este serve como principal fonte de nutrientes ao organismo que está intimamente ligado à superfície e aos interstícios; e quando este, inerte nutricionalmente, serve apenas como suporte sólido entre o microrganismo e o nutriente adicionado (10,72).

Em relação ao primeiro caso, pode-se citar os seguintes exemplos: produção de toxinas (afla e ocratoxinas) (30,31,33, 34,46,79), etanol (37,41,76), ácidos orgânicos (10,11,44), enzimas hidrolíticas (celulases, amilases, proteases) (15,27,80, 81), proteínas microbianas e enriquecimento protéico de rações (9,26,32,45), alimentos orientais fermentados (hamanatto, tempeh, sufu) (11), produção de enzimas pelo método "Koji" como parte do processo para a obtenção de alimentos e bebidas fermentadas (shoyu, miso, sakê) (11,65,72,76,82,84), queijos (camembert e roquefort) (11), compostagem (11,12), obtenção de esporos para transformações de compostos orgânicos (87). Em relação ao segundo caso, existem estudos sobre a produção de ácidos orgânicos (10,44) e a obtenção de esporos para a produção de inseticidas bacterianos (13). O processo de produção de cogumelos utiliza-se dos dois casos acima citados (93).

Conhecido há tempos como um meio de se obter alimentos, e tendo a compreensão e o aperfeiçoamento desta técnica, assim como sua exploração comercial, sido realizada predominantemente em países orientais, o processo em meio semi-sólido apresenta, em relação ao processo submerso, as seguintes vantagens operacionais (11,30,32): o substrato utilizado é, em geral, relativamente simples, necessitando, em muitos casos, somente da adição de água (embora alguns estudos considerem a introdução de fontes de nitrogênio e de nutrientes minerais); o espaço ocupado necessário ao processo é bem menor devido a menor quantidade de água empregada, o que reduz custos de operação (energia, mão de obra) e de capital investido; o nível de umidade baixo em-

pregado reduz ou elimina o problema de contaminação bacteriana (11,30,32,37); condições de crescimento empregadas são similares às condições naturais de crescimento de fungos, o que possibilita, em muitos casos, maiores rendimentos na obtenção de produtos de utilização industrial; a utilização de agitação do substrato inibe o processo de esporulação fúngica, diminuindo o perigo de contaminação de áreas circunvizinhas; a aeração, natural ou forçada, é facilmente acessível aos microrganismos devido aos interstícios existentes entre as partículas do substrato; o produto final encontra-se mais concentrado, o que facilita sua recuperação, permitindo a utilização de menores quantidades de solventes necessárias para extrair o produto (30,32); menor produção de resíduos indesejáveis (11,15,37).

O processo apresenta, também, as seguintes limitações: necessidade de dissipar o calor produzido para evitar a elevação localizada de temperatura (11); dificuldades intrínsecas para a ampliação de escala (32,45); difícil acompanhamento e controle de parâmetros operacionais, tais como pH, aeração, temperatura, umidade, crescimento dos microrganismos (15,32); quando necessária a agitação, a energia empregada será bem maior que em processo líquido (30,32); necessidade de grande quantidade de inóculos e perfeita homogeneização do meio; pré-tratamento de muitos substratos, adequando-os a fermentação desejada; perigo de contaminação devido a adição de água necessária para manter a umidade relativa especialmente no primeiro e segundo dia de fermentação; reduzida oferta de publicações técnicas (11,30, 80).

Devido a pequena quantidade de água livre disponível no meio de cultura e a incapacidade de outros microrganismos penetrarem profundamente no tecido dos substratos sólidos, a classe microbiana mais comumente utilizada no processo semi-sólido é a dos fungos filamentosos pois estes, por sua vez, por intermédio do crescimento de suas hifas, tem certa facilidade em se fazer penetrar pelos espaços inter e intracelular por meio mecânico e/ou enzimático, respectivamente (11,80).

A fermentação semi-sólida pode ser uma técnica exclusiva para a produção de algumas enzimas de utilização industrial, principalmente de origem fúngica (60,80).

2.4.1. CONTROLES DA FERMENTAÇÃO

Como em todo tipo de fermentação, o controle de determinados parâmetros se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

O controle da umidade, da temperatura e do pH do meio, a velocidade de agitação, as condições de transferência de oxigênio e nutrientes, as características do substrato, além das características e a estimativa de crescimento, do desenho dos fermentadores e da automação do processo são os parâmetros mais analisados em vários estudos realizados (80).

2.4.1.1. UMIDADE

O teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influenciam o sucesso de uma fermentação semi-sólida.

A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início da fermentação (este valor situa-se na faixa de 30 a 75%) (80).

Na fermentação semi-sólida do sorgo, elevadas concentrações de umidade favorecem a produção de etanol, enquanto que com baixa umidade, é favorecida a produção de proteínas microbianas (80).

Se o nível de umidade for elevado, isto acarretará no decréscimo da porosidade do substrato, e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e conseqüente decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar os riscos de contaminação, principalmente bacteriana (45).

Para níveis de umidade menores que o necessitado, haverá maior dificuldade de difusão dos nutrientes, resultando em um crescimento do microrganismo menor do que o possível e esperado e, conseqüentemente, com menor produção do composto desejado (a um teor de umidade abaixo de 12%, não há crescimento microbiano (80,20)) (45).

Nishio et alii (60) mostram que, para Aspergillus niger, a acumulação da enzima no substrato, assim como a taxa de crescimento e a taxa de consumo de oxigênio são máximos quando a umidade é mantida a 56%, observando um crescimento destes valores quando da variação dos teores de umidade de 32 a 56% e um decréscimo na variação de 56 a 74%.

Durante a fermentação, haverá uma perda da umidade devido a evaporação e as atividades metabólicas do microrganismo. Esta perda poderá ser repostada, ou evitada, pela adição de água estéril em intervalos constantes de tempo, pela manutenção da umidade atmosférica entre 90-97% de umidade relativa através de injeção contínua de ar úmido no fermentador (80), ou com a instalação de umidificadores (60).

2.4.1.2. CALOR

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada do substrato, uma grande quantidade de calor é produzida durante a fermentação em semi-sólido. Rathbun et alii (74), em cultura estática, observaram a existência de um gradiente de $3.2^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ utilizando um meio de fermentação de 6.5 cm de profundidade.

Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação do microrganismo e a formação do produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento de temperatura não prejudique a fermentação desejada. Isto pode ser conseguido com a introdução de ar comprimido através do fermentador, com o controle de temperatura das salas ou locais onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água de refrigeração (80).

Na processo de compostagem, onde se utilizam grandes leiras de difícil oxigenação interna, a temperatura interior chega a atingir níveis de 60 a 77°C (32).

2.4.1.3. pH

O controle do pH durante a fermentação em processo semi-sólido, embora seja este um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido a heterogeneidade e a consistência do material.

Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a umidificação dos substratos (80).

2.4.1.4. AERAÇÃO

Cahn (10) afirma que o bom rendimento e a rápida fermentação é devido ao uso de grande área superficial do meio de cultura, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar.

Na maior parte dos processos, tanto a nível laboratorial quanto a nível industrial, a oxigenação do meio é realizada pela introdução do ar estéril sob pressão no equipamento de fermentação (47).

A quantidade de ar estéril a ser introduzida no processo fermentativo vai depender da natureza dos microrganismos, da quantidade de calor metabólico a ser dissipada do processo, da espessura da camada de substrato, da quantidade de CO_2 e outros metabólitos voláteis a serem eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos (47).

Hesseltine indica que é necessária uma taxa de oxigenação superior para a obtenção de aflatoxinas e enzimas hidrolíticas em relação a produção de ocratoxinas (30).

Pode ocorrer uma substituição total da atmosfera do fermentador caso não haja uma dispersão dos gases produzidos, os quais podem exercer influências muito negativas durante a fermentação (47).

Rathbun et alii (74) afirmaram que em um fermentador com uma camada de 6,35cm de meio, a concentração de CO₂ pode alcançar a 21% em volume no fundo da camada.

Dependendo do valor da taxa de aeração introduzida, pode ser ocasionada uma perda de umidade devido a exaustão do ar, provocando uma secagem não desejada do substrato (47).

Pode-se utilizar um analisador de oxigênio para medir a quantidade de oxigênio consumido e um cromatógrafo a gás para analisar os gases da atmosfera do reator (83).

Há diferentes maneiras para se obter uma melhor movimentação do ar pelo substrato permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio: utilização de substrato poroso, medianamente granulado ou fibroso; pequena espessura da camada de substrato; utilização de bandejas perfuradas ou reatores com um fundo composto por uma tela de arame; agitação do substrato; introdução de ar forçado estéril dentro do reator (80).

A fermentação submersa necessita de quatro a cinco vezes mais oxigênio que a fermentação semi-sólida (80).

2.4.1.5. AGITAÇÃO

O emprego da agitação em uma fermentação semi-sólida pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição do inóculo e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer tanto a transferência gasosa pela exposição das partículas de substrato à atmosfera do fermentador como a troca de calor dentro do meio (80).

A agitação pode inibir a formação de esporos (30) e o desenvolvimento natural do microrganismo. Pode causar também a compactação do meio e a danificação das hifas (45).

2.4.1.6. SUBSTRATOS

A utilização do tipo de substrato vai depender, principalmente, do produto que se deseja obter. Assim, utiliza-se extrato, farelo ou farinha de cereais, de sementes ou de grãos para a produção de enzimas, esporos e proteínas microbianas; cana de açúcar, para a produção de álcool; matéria orgânica em geral, para compostagem, etc. (9,11,15,37,87).

O trabalho com linhagens puras exige um pré-tratamento do substrato para a eliminação de microrganismos indesejáveis. Este pré-tratamento pode influir diretamente na possibilidade de utilização de um determinado substrato.

A utilização de um processo de esterilização pode acarretar em alterações de textura do substrato, assim como o uso de agentes químicos pode influenciar na qualidade do produto final obtido.

O pré-tratamento pode ser necessário também para facilitar a ação do microrganismo, com a formação de pequenas moléculas permeáveis e de locais de fácil penetração, ou pela gelatinização ou inchamento do substrato. Tal tipo de pré-tratamento pode incluir vaporização, esmagamento, quebra, moagem, peneiramento, embebição, suplementação de nutrientes, correção de pH, entre outros (47).

Os principais problemas nos substratos, detectados em culturas semi-sólidas, foram: a formação de uma massa compactada ou granular; um ressecamento da massa; adesão da massa à parede do fermentador (45,67).

2.4.1.7. ESTIMATIVA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO

A sequência de crescimento microbiano em farelo de trigo em condições ótimas envolve a germinação nas primeiras horas, seguido de um aumento gradual de temperatura devido ao início das atividades metabólicas, uma taxa crescente das atividades metabólicas, a fase estacionária e de declínio. A duração de cada etapa vai depender das condições de fermentação, do microrganismo empregado e do produto que se deseja obter.

O fungo filamentoso tem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intracelulares por meios mecânicos ou enzimáticos, com firme fixação das hifas no substrato e intensa ramificação e penetração na parede celular do substrato pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelo microrganismo (40).

Não é possível estimar diretamente o crescimento microbiano no processo semi-sólido, assim como separar o micélio do substrato. Porém, são utilizados métodos indiretos tais como: extração alcalina da proteína micelial do complexo celulose-fungo (61); estimativa da quantidade de ATP ou glucosamina do microrganismo (60); determinação da atividade da lacase extracelular (61); determinação contínua do CO_2 (14) e do O_2 (71) presentes nos gases efluentes do fermentador.

2.4.1.8. TIPOS DE FERMENTADORES

Há diversos tipos de reatores que podem ser utilizados em fermentação semi-sólida. A escolha deve ser feita tendo em conta a capacidade de cada reator alcançar os objetivos propostos, as considerações econômicas quanto a custos de capital e operação e a necessidade de controlar as condições do processo.

a) Recipientes de vidro: úteis principalmente em laboratórios, são utilizados em agitadores ou estáticos. São erlenmeyers de diversos tamanhos ou frascos Fernbach (9,10,26).

b) Tambores rotativos: tambor instalado sobre um sistema de rolamentos ou acoplado a um eixo, que atuam como suporte e como dispositivos de rotação controlada (60). Equipado com entrada e saída de ar, as etapas de esterilização do meio, de inoculação e do processo em si são realizadas "in situ" (46,92). Neste processo, o crescimento microbiano apresenta-se rápido e uniforme. Há problemas quanto a ampliação de escala, destruição de micélio, controle de temperatura durante o período de crescimento exponencial, contaminação microbiana devido a dificuldade de esterilização do meio, a formação de "pellets" no substrato e retardamento no crescimento devido ao atrito entre as partículas (92);

c) Tanques: com ou sem equipamentos de agitação, circulares, retangulares ou quadrados, de madeira, de plástico ou de aço. Possuem fundos perfurados para facilitar a circulação de ar. São equipamentos de difícil obtenção da ampliação de escala.

d) Bandejas: São as mais utilizadas, com sucesso, tanto a nível laboratorial como a nível industrial. Consistem em bandejas, com fundo perfurado, com o meio de cultura com 2.5 a 5.0 cm de profundidade (10,44), mantidas em câmaras com controle de temperatura e ar umidificado. Apresentam como desvantagens, a necessidade de grandes áreas para fermentação e da manipulação das várias bandejas quando da produção em larga escala (36);

e) Esteiras: O processo consiste de recipientes, nos quais está contido o meio, que passam por seções específicas durante as etapas de esterilização do meio, resfriamento, inoculação por aspersão de esporos ou por mistura com inóculo seco e homogeneização, crescimento microbiano com controle de temperatura e ar estéril e umidificado, descarte do produto obtido e lavagem e esterilização dos recipientes. Os principais problemas que ocorrem neste processo estão relacionados com a esterilização do meio e com o controle da temperatura (80);

f) Coluna: utilizada somente em pequena escala, este fermentador consiste de um tubo de vidro acoplado ao fornecimento de ar umidecido pelo fundo ou pelo topo do reator, com o controle da temperatura sendo realizado por camisas ou câmaras com temperatura controlada. Tem como principal problema a dificuldade de se obter uma ampliação de escala (14).

2.5. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

As enzimas microbianas estão presentes no micélio dos fungos em grande quantidade durante o período de esporulação, desaparecendo rapidamente após este período. Torna-se, assim, necessário delinear o tempo de produção das mesmas para o sucesso de sua extração (65).

As enzimas proteolíticas são substâncias relativamente frágeis com tendência à desnaturação e inativação sob condições desfavoráveis. Assim, torna-se conveniente delinear seus limites de estabilidade para uma melhor operação (6).

- Temperatura

A redução da temperatura tende a diminuir a atividade enzimática. Porém, a enzima se mostra mais estável a temperaturas mais baixas do que a ótima. A cada 10°C , a taxa da reação duplica até o ponto em que a enzima começa a ser desnaturada (89).

- Inibição por metais

Ions metálicos tais como o ferro, o cobre, o cálcio, o cádmio podem atuar como inibidores, assim como agentes quelantes, EDTA, o-fenantrolina, podem inibir a atuação das enzimas (5,8).

Akatsuka et al (5) informam que a dipeptidase de *Aspergillus oryzae* é inibida por EDTA, cádmio, mercúrio, cobre, chumbo e ferro. Magnésio e níquel não afetaram a atividade. As concentrações utilizadas foram equivalentes a $0,001\text{M}$.

- pH

Proteínas apresentam alterações de solubilidade, pressão osmótica, viscosidade, etc., a diferentes valores de pH. A alteração na atividade enzimática com a variação dos valores de pH deve-se a modificação do substrato, do complexo enzima-substrato ou na ionização da enzima (89).

3. MATERIAIS E METODOS

Todos os experimentos e análises foram realizados em duplicata, sendo os resultados obtidos a partir da média aritmética dos valores encontrados.

3.1. LINHAGEM

Foram examinadas 20 linhagens de fungos para a verificação de atividade proteolítica, sendo que dez eram culturas existentes no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e as outras dez, isoladas na natureza.

Os fungos examinados foram:

- *Aspergillus awamori* IZ 1066
- *Aspergillus awamori* NRRL 3112
- *Aspergillus niger* NRRL 337
- *Aspergillus niger* NRRL 372
- *Aspergillus niger* NRRL 567
- *Aspergillus niger* var. *beiju*
- *Aspergillus oryzae* NRRL 694
- *Neurospora beiju*
- *Paecilomyces* sp.
- *Rhizopus delemar*
- Linhagens isoladas de farinha (soja, trigo), farelo de trigo, cascas (arroz, alho), frutas (pera, mamão, laranja) e tubérculos (batata, mandioca).

3.2. MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

As linhagens foram mantidas em tubos inclinados contendo meio solidificado composto de ágar, batata e dextrose (PDA) e estocados em geladeira por até um mes.

Após este período, as culturas eram repicadas em um novo meio e mantidas a temperatura ambiente por sete a quinze dias.

3.3. OBTENÇÃO DE ESPOROS

A suspensão de esporos, utilizada como inóculo, foi obtida a partir da introdução de 10mL de água destilada esterilizada e posterior raspagem suave das culturas crescidas na superfície de um meio de manutenção. A suspensão foi filtrada através da sucção em uma pipeta contendo gaze de algodão, em condições de esterilidade, para a remoção de partes de micélio e meio gelatinizado.

3.4. PRE-SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos isolados foram inoculados com alças puntiformes em placas de Petri contendo meio ágar-leite e incubados a uma temperatura de 30°C, em estufa, sendo verificada, durante três dias, a produção de enzimas proteolíticas através de uma zona de hidrólise transparente ao redor da colônia formada, devido a ação da enzima sobre a caseína (38).

COMPOSIÇÃO DO MEIO AGAR-LEITE

Leite em pó desnatado	5,0 g
Agar nutriente	1,0 g
Água destilada	100,0 mL

3.5. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

As linhagens que apresentaram uma zona de hidrólise no meio ágar-leite (nove, no total) foram inoculadas, de acordo com o item 3.3, em erlenmeyers de 250mL contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em água destilada estéril, e incubadas a uma temperatura de 30°C, em estufa, durante 60 horas, sendo retiradas amostras de seis em seis horas.

Extraíu-se a enzima, adicionando-se à massa fermentada (a uma proporção substrato/solvente de 1:10) soluções-tampão a pH 3, 7 e 9, mantendo-se em agitação por 30 minutos, filtrando em seguida com papel de filtro quantitativo ou por centrifugação (5000 rpm por 10 min), diluindo-se convenientemente e analisando então a atividade proteolítica, nestes respectivos pH.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Foi determinada a atividade enzimática por uma adaptação do método de Kunitz (43) modificado por Hagihara et alii (25) e pelo método de Lowry et alii (48), utilizando-se uma solução de caseína 1,0% em pH 3 (com Ácido Láctico), pH 7 (tampão fosfato) e pH 10 (tampão tris).

O método consistiu em adicionar 5,0mL de solução de caseína 1% em 1,0mL de solução enzimática obtida após a filtração e conveniente diluição da amostra recolhida, incubando-se a 30°C durante 10min. Cessou-se a reação com a adição de 5,0mL de solução de TCA (0,33M CH₃COOH, 0,22M CH₃COONa, 0,11M CCl₃COOH), deixando-se em repouso por 30 min à mesma temperatura. A suspensão foi filtrada e a absorbância da solução lida a 280nm em espectrofotômetro (43), comparando o valor obtido com a respectiva curva padrão de tirosina.

Para verificação pelo método de Lowry, em 1,0mL desta solução foram adicionados os reagentes necessários (48), tendo, após a realização das reações indicadas por este método, sido medida a absorbância a 660nm e comparado o valor obtido com a respectiva curva padrão de tirosina.

Uma unidade proteolítica é definida como a atividade da enzima que libera, como produto de digestão não precipitado, o equivalente a 1,0ug de tirosina por minuto a 30°C.

3.7. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

3.7.1. Efeito da Temperatura sobre a Produção Enzimática

Estudou-se, inicialmente, o efeito da temperatura sobre as duas linhagens que apresentaram a produção dos extratos com as maiores atividades enzimáticas, *Aspergillus awamori* NRRL 3112 e *Aspergillus oryzae* NRRL 694, a pH 3 e a pH 9 respectivamente.

As linhagens citadas acima foram incubadas em estufa à temperaturas de 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40 e 43°C, mantidas as demais condições estabelecidas no item 3.5.

3.7.2. Efeito do pH Inicial sobre a Produção Enzimática

A temperatura ótima obtida no item 3.7.1., a linhagem que apresentou maior atividade enzimática (Aspergillus awamori NRRL 3112) foi incubada em meio umedecido com soluções-tampão de diferentes pH (1,6, 2,5, 3,4, 4,3, 5,2, 6,1, 7,0, 7,9, 8,4, 8,9, água destilada de pH 7,3 e água corrente de pH 8,4) mantidas as demais condições estabelecidas no item 3.5.

3.7.3. Efeito do Teor de Umidade sobre a Produção do Extrato Enzimático

A temperatura e pH ótimos obtidos nos itens 3.7.1. e 3.7.2., modificou-se o teor de umidade, adicionando-se ao substrato diferentes volumes de solução-tampão umidificadora, de modo a se obter as proporções de substrato/suspensão de inóculo de 2:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:2 e 1:3 (p/v), mantidas as demais condições estabelecidas no item 3.5.

3.7.4. Efeito da Concentração de Inóculo sobre a Produção do Extrato Enzimático.

A temperatura, pH e teor de umidade ótimos obtidos (itens 3.7.1. a 3.7.3.), o microrganismo foi incubado a diferentes concentrações, de acordo com o valor da transmitância obtida a 660nm, segundo indicado por Tsujita (92).

3.7.5. Influência de Diferentes Meios de Cultura sobre a Produção Enzimática.

Com as condições ótimas obtidas nos itens anteriores, estudou-se a influência de diferentes meios de cultura (farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca, mandioca puba, extrato de soja, farinha de soja, farelo de algodão, resíduo sólido industrial da "Champion" (Indústria de Papel e Celulose)) na atividade enzimática.

Com o meio que proporcionou a maior atividade, farinha de soja, verificou-se a influência da suplementação de fontes de nitrogênio (amônia, caseína, peptona, extrato de levedura, uréia), de micronutrientes (sódio, enxofre, potássio, fósforo), de tween e de carbono (glicose, sacarose, amido) na produção do extrato enzimático.

3.7.6. Influência da Espessura da Camada de Substrato

Finalmente, após a obtenção do extrato enzimático mediante os parâmetros ótimos acima descritos, verificou-se a produção enzimática em erlenmeyers de 250mL variando-se a quantidade de substrato inoculada (2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0g). A altura da massa respectiva de substrato corresponde a cerca de 0,2, 0,5, 0,9, 1,6 e 3,3cm. Salienta-se que, quando o meio foi farinha de soja, tornou-se necessário, com o auxílio de uma baqueta, ou com a alça de platina, esfarelar bem os grumos formados para uma melhor homogeneização e posterior fermentação do meio.

3.8. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

3.8.1. Efeito do pH do Substrato na Atividade Enzimática.

Foram estudadas as atividades proteolíticas do extrato enzimático obtidas da digestão da caseína, ajustados na faixa de pH entre 2 e 11, com soluções-tampão apropriadas (soluções de Britton-Robinson), a 30°C por 10 minutos de incubação.

3.8.2. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.

Verificou-se o efeito da temperatura, realizando-se a reação por 10 minutos (digestão da caseína a pH 3 pelo extrato enzimático) em banhos termoestabilizados a diferentes temperaturas entre 30 e 70°C, com uma variação de 10 em 10°C.

3.8.3. Efeito do pH na estabilidade da enzima.

Adicionou-se 1mL do extrato enzimático a 1mL de soluções-tampão (soluções de Britton-Robinson) em diferentes valores de pH (de 2 a 11, variando-se de 1 a 1).

Estas soluções foram incubadas a temperatura ambiente durante 10 e 36 horas, sendo então diluídas para 1:10 com ácido láctico pH 3, e verificando-se, após estes períodos, a atividade enzimática de cada pH estudado, pela digestão da caseína a 30°C por 10 minutos.

3.8.4. Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima.

A solução enzimática foi incubada em banhos termo-estabilizados a diferentes temperaturas entre 20 e 80°C (variação de 10 em 10°C) por uma hora, verificando-se em seguida a atividade enzimática pela digestão da caseína durante 10 minutos à temperatura sugerida de 30°C..

3.8.5. Efeito de Ions Metálicos e Agente Quelante na Atividade Enzimática.

Foram adicionadas à solução enzimática diferentes soluções de ions metálicos e EDTA (0,001M) na proporção 1:1 e incubadas a temperatura ambiente por uma hora. Determinou-se depois deste período a atividade enzimática, pela digestão da caseína por 10 minutos a 30°C.

Foram utilizados os seguintes sais: cloreto de manganês, cloreto de bário, cloreto de cobre, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de lítio, cloreto férrico, sulfato de zinco, além de EDTA.

3.9. EQUIPAMENTOS

- 3.9.1. Câmaras com temperatura controlada Fanem.
- 3.9.2. Espectrofotômetro Spectronic 20, Bausch & Lomb.
- 3.9.3. Espectrofotômetro UV Micronal.
- 3.9.4. Balança de Precisão Mettler P1210n.
- 3.9.5. Balança de precisão Bosch S200.

- 3.9.6. Potenciômetro pHmetro H-5 Horiba.
- 3.9.7. Centrífuga Excelse 2 Fanem.
- 3.9.8. Banho-maria termoestabilizado modelo 100 Fanem.
- 3.9.9. Autoclave.
- 3.9.10. Agitadores rotativos Fermentation Design Inc.
- 3.9.11. Refrigerador Brastemp.
- 3.9.12. Câmara com temperatura controlada e agitadores rotativos New Brunswick Scientific Co.
- 3.9.13. Estufa de secagem e esterilização com circulação mecânica Modelo 320-SE Fanem.
- 3.9.14. Termômetros de precisão.
- 3.9.15. Reagentes e vidrarias utilizados em laboratório.

4. RESULTADOS

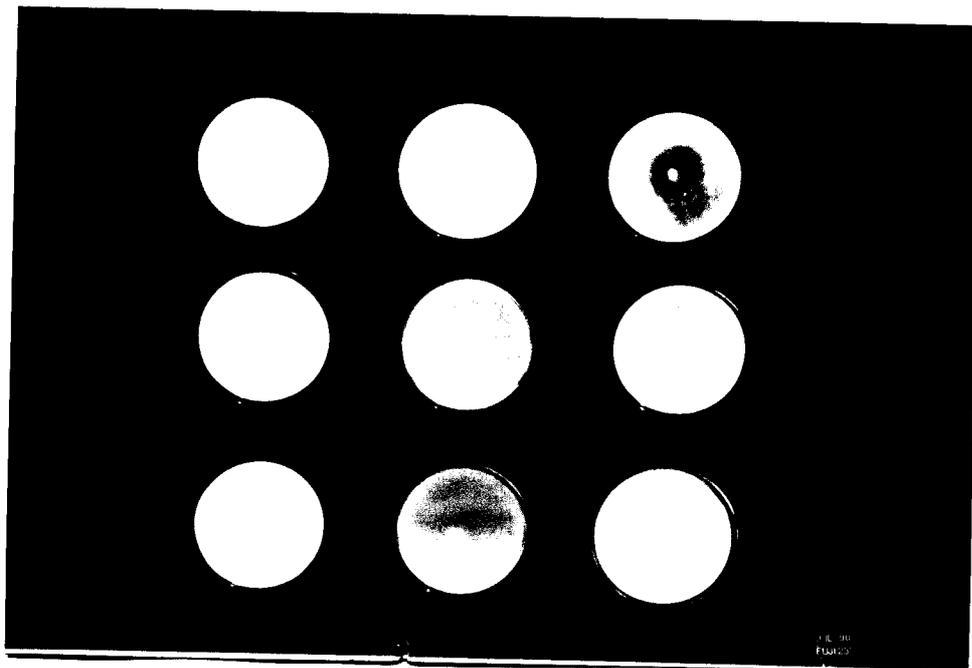
4.1. PRÉ-SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DO EXTRATO ENZIMÁTICO

São apresentados os resultados obtidos após a análise das vinte linhagens de fungos, que foram repicadas, por esgotamento, em meio ágar-leite em placas de petri.

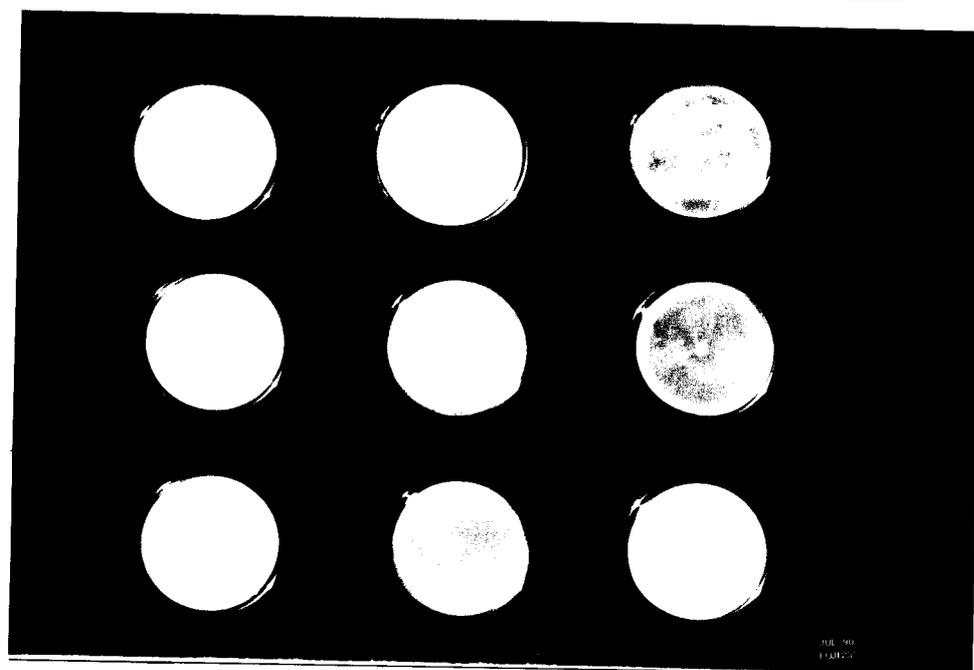
Pela Figura 1, pode-se observar que oito das linhagens repicadas apresentaram, ao redor da colônia formada, após dois dias de incubação, uma zona clara de hidrólise que caracteriza a produção de enzimas proteolíticas.

Desde o primeiro dia, *Neurospora beijerinckii* mostrou um rápido desenvolvimento com intensa produção de esporos, hidrolisando mais da metade do meio; um fungo coletado de uma batata contaminada e *Aspergillus niger* NRRL 337 provocaram um clareamento total do meio, sem que fosse observada zonas de hidrólise; um fungo coletado de uma pera contaminada e *Aspergillus awamori* NRRL 3112 apresentaram uma pequena zona de hidrólise circular em torno do ponto inoculado.

No segundo dia, além dos microrganismos citados aumentarem a zona de hidrólise, juntamente com o crescimento dos respectivos halos, *Aspergillus oryzae* NRRL 694, *Aspergillus niger* NRRL 372 e o fungo obtido de cascas contaminadas de arroz apresentaram uma pequena hidrólise bem definida em volta de seus halos.



Primeiro
Dia



Segundo
Dia

FIGURA 1 - VERIFICAÇÃO DA HIDRÓLISE DO MEIO AGAR-LEITE NO PRIMEIRO E SEGUNDO DIA APÓS A INOCULAÇÃO, A 30°C.

- | | | |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1. <i>A. OBYZAE</i> | 2. <i>A. NIGER</i> NRRL 337 | 3. <i>NEUROSPORA BEIJU</i> |
| 4. <i>A. AWAMORI</i> | 5. <i>A. NIGER</i> NRRL 372 | 6. BOLOR ARROZ |
| 7. BOLOR PERA | 8. BOLOR BATATA | 9. <i>RHYZOPUS DELEMAR</i> |

Rhizopus delemar apresentou uma zona de hidrólise somente no terceiro dia após a inoculação. As demais linhagens não apresentaram esta característica durante os 3 dias de incubação.

Dados da literatura indicam que os fungos do grupo *Aspergillus* são os melhores produtores de enzimas proteolíticas (20, 21,40), e que *Rhizopus* (21) e *Neurospora* (16) também apresentam tal produção.

4.2. OBTENÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DO MELHOR EXTRATO ENZIMÁTICO

Baseado na verificação acima descrita, foram avaliadas as atividades proteolíticas destas nove linhagens, segundo a metodologia indicada no item 3.5. Optou-se, inicialmente, por cessar as fermentações, na maior parte das vezes, após 60 horas quando o meio parecia já ter sido totalmente envolvido pelo micélio em quase todos os experimentos. Os resultados obtidos são mostrados pelas Tabelas 1,2 e 3 e pela Figura 2.

Nota-se que, com a extração feita somente com a adição de soluções-tampão no meio e posterior filtração, a obtenção de atividade proteolítica demonstra o caráter extracelular do extrato bruto enzimático obtido.

Por estas tabelas, pode-se observar que as linhagens de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em condições ácidas e *Aspergillus oryzae* NRRL 694 em condições neutras e alcalinas foram as que apresentaram uma maior atividade enzimática quando comparadas com as demais linhagens estudadas.

	TEMPO (hs)								
LINHAGEM:	12	18	24	30	36	42	48	54	60
1	10.00	10.01	10.02	10.04	10.05	10.02	10.03	10.00	10.00
2	10.00	10.01	10.03	10.10	10.18	10.08	10.13	10.01	10.01
3	10.01	10.06	10.11	10.18	10.60	10.40	10.37	10.22	10.07
4	10.01	10.01	10.02	10.03	10.02	10.01	10.00	10.00	10.00
5	10.00	10.00	10.00	10.01	10.03	10.04	10.00	10.00	10.00
6	10.00	10.00	10.00	10.01	10.02	10.03	10.03	10.01	10.00
7	10.00	10.00	10.01	10.04	10.05	10.04	10.01	10.00	10.00
8	10.00	10.01	10.02	10.04	10.04	10.02	10.04	10.03	10.01
9	10.00	10.00	10.01	10.04	10.07	10.04	10.02	10.01	10.01

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE DIVERSOS FUNGOS A pH 3

As linhagens foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 2,0 g de farelo de trigo e 2,0 mL de suspensão de esporos em água destilada estéril, e incubadas a 30°C por 60hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta (280nm).

- 1 - *Aspergillus niger* NRRL 337
- 2 - *Aspergillus niger* NRRL 372
- 3 - *Aspergillus awamori* NRRL 3112
- 4 - *Neurospora beijii*
- 5 - *Rhizopus delemar*
- 6 - Bolor Pera
- 7 - Bolor Batata
- 8 - Bolor Arroz
- 9 - *Aspergillus oryzae* NRRL 694

	TEMPO (hs)								
LINHAGEM:	12	18	24	30	36	42	48	54	60
1	10.00	10.00	10.04	10.05	10.05	10.01	10.03	10.00	10.00
2	10.00	10.01	10.04	10.05	10.05	10.02	10.04	10.01	10.01
3	10.00	10.01	10.02	10.03	10.05	10.06	10.07	10.02	10.02
4	10.07	10.13	10.05	10.03	10.02	10.02	10.02	10.05	10.00
5	10.00	10.00	10.00	10.00	10.02	10.07	10.05	10.03	10.00
6	10.00	10.00	10.00	10.01	10.01	10.01	10.01	10.00	10.00
7	10.00	10.01	10.02	10.02	10.03	10.03	10.03	10.02	10.01
8	10.00	10.00	10.01	10.02	10.03	10.04	10.04	10.03	10.02
9	10.01	10.03	10.09	10.16	10.21	10.29	10.16	10.15	10.04

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLITICAS DOS EXTRATOS ENZIMATICOS DE DIVERSOS FUNGOS A pH 7

As linhagens, foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 2,0 g de farelo de trigo e 2,0 mL de suspensão de esporos em água destilada estéril, e incubadas a 30°C por 60hs. A enzima foi extraída com solução-tampão fosfato pH 7 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta (280nm).

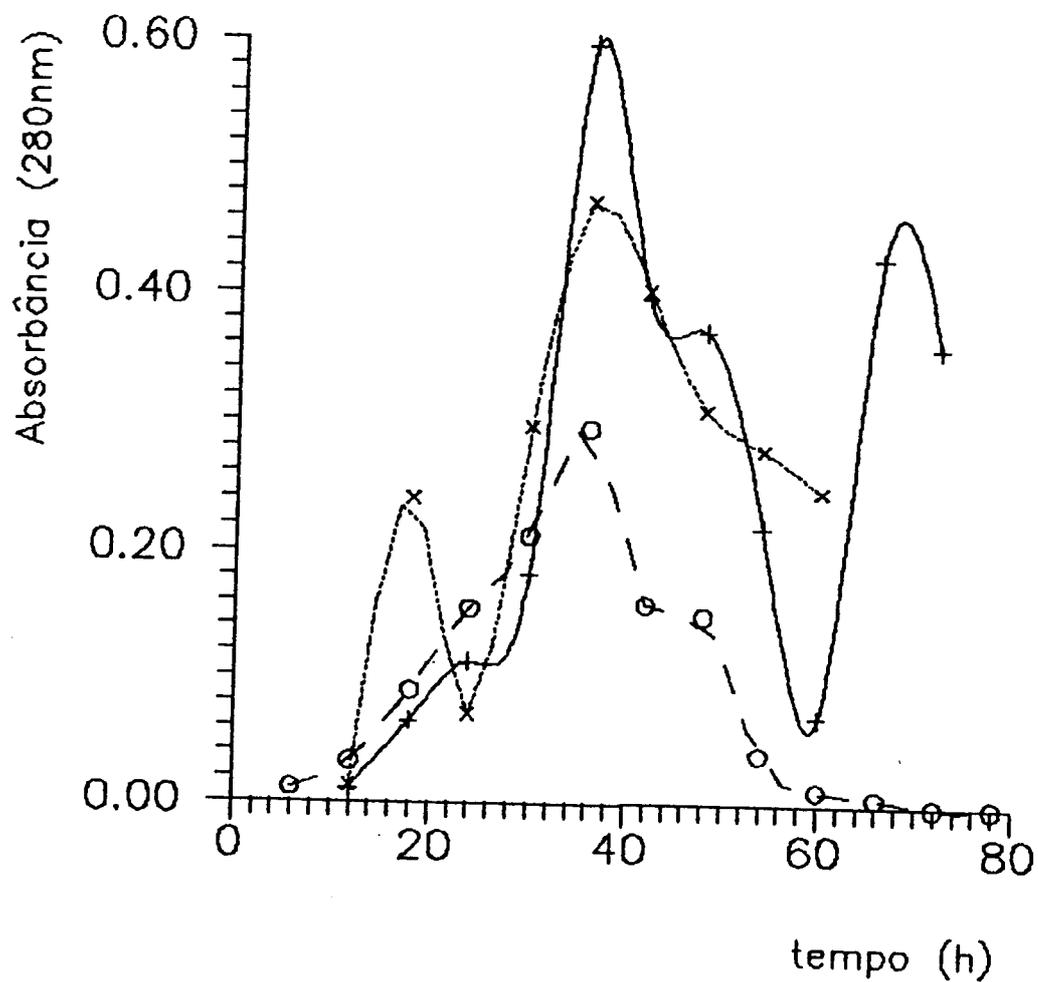
- 1 - *Aspergillus niger* NRRL 337
- 2 - *Aspergillus niger* NRRL 372
- 3 - *Aspergillus awamori* NRRL 3112
- 4 - *Neurospora beijii*
- 5 - *Rhizopus delemar*
- 6 - Bolor Pera
- 7 - Bolor Batata
- 8 - Bolor Arroz
- 9 - *Aspergillus oryzae* NRRL 694

LINHAGEM	TEMPO (hs)								
	12	18	24	30	36	42	48	54	60
1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.04	0.03	0.01	0.00
2	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	0.03	0.04	0.02	0.02
4	0.02	0.02	0.04	0.05	0.03	0.04	0.01	0.02	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.01	0.03	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02
7	0.00	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.02	0.01	0.00
8	0.01	0.01	0.04	0.05	0.06	0.04	0.03	0.02	0.04
9	0.01	0.24	0.07	0.30	0.47	0.40	0.31	0.28	0.25

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE DIVERSOS FUNGOS A pH 9

As linhagens, foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 2,0 g de farelo de trigo e 2,0 mL de suspensão de esporos em água destilada estéril, e incubadas a 30°C por 60hs. A enzima foi extraída com solução-tampão tris pH 9 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta (280nm).

- 1 - *Aspergillus niger* NRRL 337
- 2 - *Aspergillus niger* NRRL 372
- 3 - *Aspergillus awamori* NRRL 3112
- 4 - *Neurospora beijii*
- 5 - *Rhizopus delemar*
- 6 - Bolor Pera
- 7 - Bolor Batata
- 8 - Bolor Arroz
- 9 - *Aspergillus oryzae* NRRL 694



+ — + = *Aspergillus awamori* NRRL 3112, a pH 3
o - - - o = *Aspergillus oryzae* NRRL 694, a pH 7
x ···· x = *Aspergillus oryzae* NRRL 694, a pH 9

FIGURA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS QUE APRESENTARAM AS MAIORES ATIVIDADES ENZIMÁTICAS A pH 3, 7 E 9.

Observa-se, também, pela Figura 2, que houve um acréscimo da atividade enzimática, a pH 3, após as 60 horas. Porém, como essa atividade foi inferior à obtida entre 30 e 40 horas, em um tempo bem maior, optou-se por não analisar esses pontos durante a sequência do trabalho.

Estes resultados vem confirmar dados colhidos na literatura, que informam o melhor rendimento na produção de enzimas proteolíticas ácidas por parte de *Aspergilli* negros e enzimas proteolíticas neutras e alcalinas por parte de *Aspergillus oryzae* (20,38,60,71).

Aspergillus awamori NRRL 3112 já havia demonstrado, segundo estudo feito por Park et alii (69), um potencial de produção enzimática, ao produzir, por fermentação submersa, a maior atividade de amiloglucosidase dentre diversas linhagens de fungos selecionadas.

Também Hayashida (29), em cultura submersa, encontrou atividades proteolíticas e de amiloglucosidase ao estudar uma linhagem de *Aspergillus awamori*.

Estes resultados podem indicar a confirmação que, de uma fermentação fúngica, se obtém um extrato enzimático contendo mais de uma enzima específica (7).

Como os resultados obtidos em pH 3 e 9 foram praticamente o dobro do obtido em pH 7, resolveu-se continuar apenas a estudar os microrganismos relativos às produções enzimáticas respectivas aos dois primeiros pHs citados.

4.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

De acordo com o item 3.7.1., variou-se em primeiro lugar a temperatura do processo e, pelas Tabelas 4, 5, 6 e 7, verifica-se que a temperatura em que ocorre a maior atividade enzimática para *Aspergillus awamori* situa-se em 37°C, e para *Aspergillus oryzae* a 28°C. Visualiza-se, também, o crescimento da atividade enzimática, para *Aspergillus awamori*, conforme há o aumento de temperatura (Figura 3), resultando inclusive na diminuição do tempo de obtenção do pico de atividade, para 34 horas, havendo um rápido decréscimo a partir de 37°C. Verificou-se que acima de 40°C não houve produção de enzimas proteolíticas. Já para *Aspergillus oryzae*, nota-se um rápido crescimento da atividade enzimática até 28°C, quando inicia-se um decréscimo não tão pronunciado, tanto que a 37°C, a enzima apresenta ainda 70% de seu poder hidrolítico máximo.

Como, dentre os dois microrganismos, *Aspergillus awamori* apresentou a maior atividade enzimática, decidiu-se, então, orientar o estudo na direção de produzir enzimas proteolíticas ácidas, a partir deste microrganismo.

Iniciou-se, então, a otimização do processo fermentativo através do estudo da influência de diversos parâmetros na produção do extrato enzimático.

Como os resultados obtidos pelo método de absorção em luz ultravioleta e o método de Lowry, segundo as curvas da Figura 3, apresentaram um comportamento semelhante, optou-se em continuar o trabalho utilizando-se apenas o primeiro método citado.

TEMP. °C	TEMPO (hs)								
	18	24	30	34	38	42	48	54	60
25	10.03	10.06	10.08	10.18	10.21	10.24	10.33	10.21	10.02
28	10.07	10.10	10.22	10.37	10.40	10.41	10.36	10.24	10.07
30	10.11	10.34	10.40	10.54	10.64	10.50	10.44	10.36	10.22
33	10.10	10.20	10.47	10.55	10.60	10.42	10.23	10.18	10.04
35	10.11	10.23	10.50	10.57	10.62	10.49	10.29	10.18	10.05
37	10.23	10.42	10.72	10.74	10.51	10.58	10.44	10.37	10.22
40	10.12	10.26	10.32	10.22	10.21	10.13	10.05	10.02	10.01

TABELA 4 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 A pH 3 (280 nm).

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em estufa à temperatura de 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40 e 43°C, em erlenmeyers de 250mL contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em água destilada estéril por 60hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta (280nm).

	TEMPO (hs)								
TEMP. °C	18	24	30	34	38	42	48	54	60
25	10.01	10.01	10.03	10.06	10.10	10.12	10.15	10.10	10.01
28	10.03	10.07	10.09	10.10	10.14	10.29	10.24	10.22	10.03
30	10.02	10.05	10.13	10.20	10.26	10.34	10.25	10.17	10.09
33	10.05	10.10	10.28	10.30	10.37	10.30	10.16	10.10	10.02
35	10.06	10.11	10.25	10.30	10.34	10.32	10.14	10.09	10.02
37	10.23	10.42	10.72	10.74	10.51	10.58	10.44	10.37	10.22
40	10.04	10.06	10.10	10.21	10.13	10.12	10.02	10.01	10.00

TABELA 5 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 A pH 3 (660 nm).

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em estufa à temperatura de 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40 e 43°C, em erlenmeyers de 250mL contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em água destilada estéril por 60hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática pelo método de Lowry (660nm).

	TEMPO (hs)								
TEMP. °C	18	24	30	34	38	42	48	54	60
25	10.01	10.02	10.03	10.25	10.37	10.44	10.53	10.25	10.11
28	10.01	10.03	10.35	10.52	10.65	10.67	10.64	10.42	10.21
30	10.01	10.02	10.35	10.55	10.55	10.46	10.33	10.23	10.08
33	10.05	10.07	10.30	10.40	10.44	10.39	10.19	10.15	10.08
35	10.06	10.09	10.28	10.34	10.38	10.25	10.20	10.13	10.07
37	10.08	10.15	10.47	10.40	10.27	10.22	10.11	10.09	10.02
40	10.06	10.10	10.42	10.23	10.13	10.10	10.07	10.05	10.01

TABELA 6 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* NRRL 694 A pH 9 (280 nm).

Aspergillus oryzae NRRL 694 foi incubado em estufa à temperatura de 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40 e 43°C, em erlenmeyers de 250mL contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em água destilada estéril por 60hs. A enzima foi extraída com solução-tampão tris pH 9 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta (280nm).

TEMP. °C	TEMPO (hs)								
	18	24	30	34	38	42	48	54	60
25	10.00	10.00	10.01	10.02	10.14	10.22	10.24	10.11	10.04
28	10.00	10.01	10.12	10.24	10.31	10.32	10.28	10.22	10.08
30	10.00	10.00	10.11	10.23	10.22	10.21	10.19	10.14	10.05
33	10.01	10.03	10.03	10.06	10.19	10.19	10.09	10.07	10.04
35	10.01	10.02	10.21	10.23	10.24	10.15	10.09	10.08	10.02
37	10.04	10.08	10.20	10.26	10.20	10.13	10.08	10.02	10.00
40	10.01	10.04	10.05	10.20	10.08	10.07	10.02	10.01	10.00

TABELA 7 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* NRRL 694 A pH 9 (660 nm).

Aspergillus oryzae NRRL 694 foi incubado em estufa à temperatura de 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40 e 43°C, em erlenmeyers de 250mL contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em água destilada estéril por 60hs. A enzima foi extraída com solução-tampão tris pH 9 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática pelo método de Lowry (660nm).

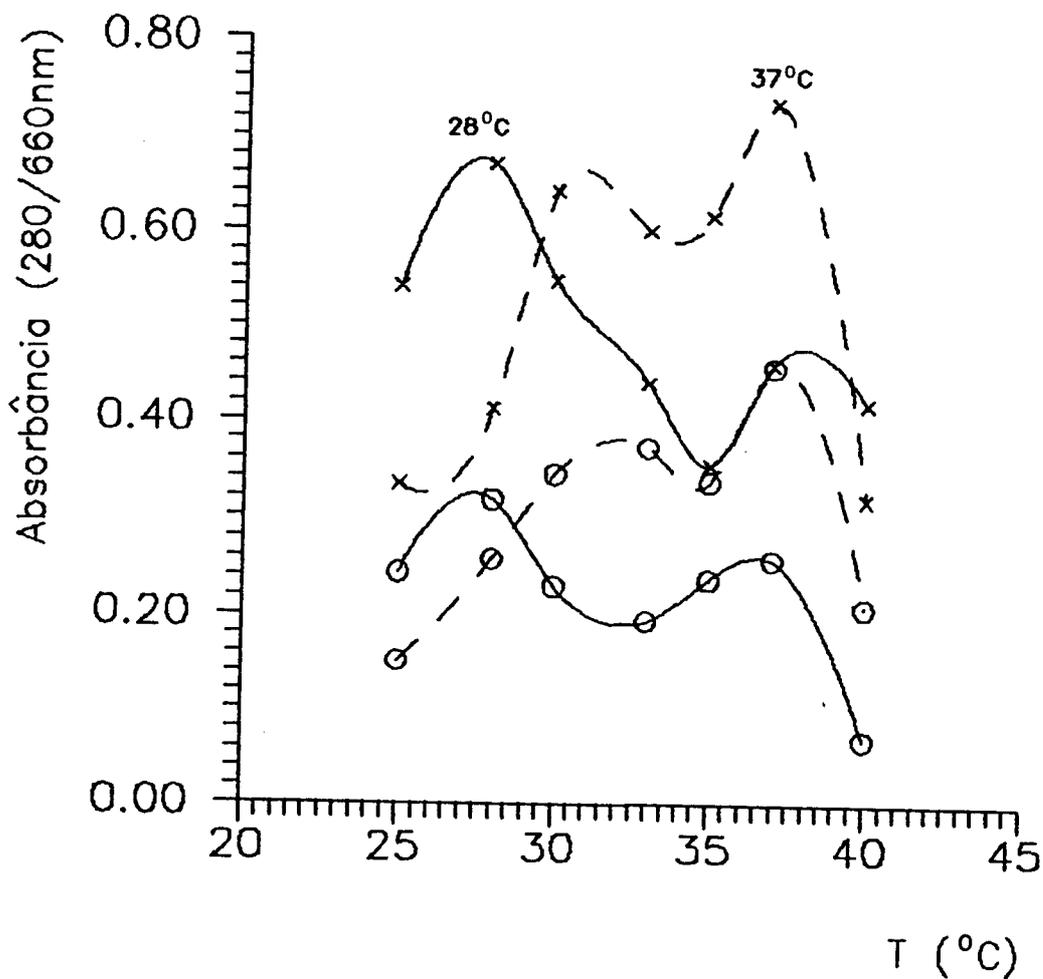


FIGURA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES MÁXIMAS DE *ASPERGILLUS ORYZAE* NRRL 694 E *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 AS DIFERENTES TEMPERATURAS DE FERMENTAÇÃO.
 (--- *Aspergillus awamori* NRRL 3112;
 — *Aspergillus oryzae* NRRL 694;
 x---x = Absorbância a 280 nm;
 o---o = Absorbância a 660 nm)

Como, também, estava bem delineada a faixa que apresentava uma maior atividade, resolveu-se seguir o estudo somente nos intervalos de tempo entre 24 a 48 horas.

Definindo-se a atividade proteolítica (AP) como:

- $\frac{\text{OD obtido} \times \text{Volume da reação} \times \text{Fator de diluição}}{\text{OD ug tir./mL} \times \text{Tempo da reação}}$

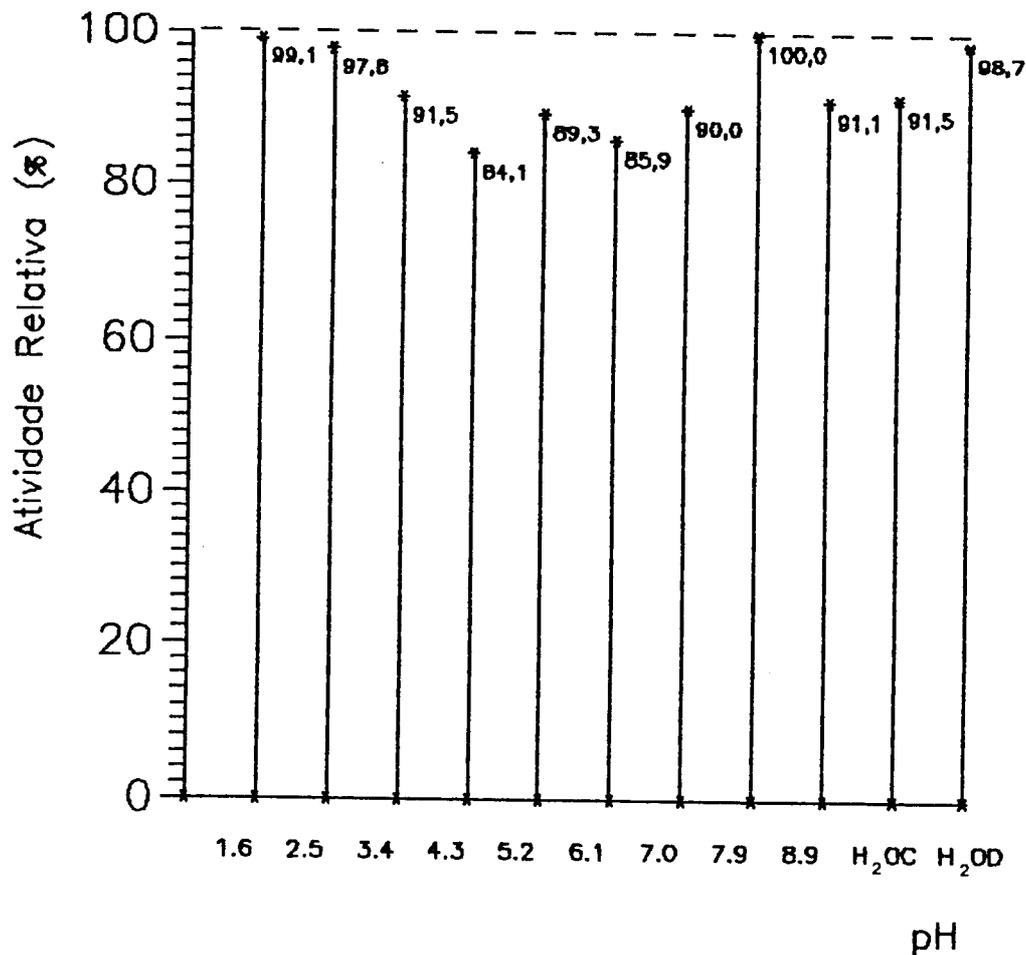
obtem-se, pelo Gráfico 3, a 37°C, para *Aspergillus awamori* NRRL 3112, a (AP) = 1334 ug tir./mL ou 672 ug tir./mL.g substrato.

Além disso, como o objetivo deste estudo foi o de otimizar os parâmetros que influenciam no processo, optou-se por apresentar os resultados em termos de atividade relativa, que relaciona ao maior valor, em porcentagem, os diversos valores obtidos em cada experimento específico.

4.4. EFEITO DO PH NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Variou-se, a seguir, de acordo com 3.7.2., o pH da solução tampão adicionada ao meio antes do início da fermentação, e, conforme mostra a Figura 4, o pH da solução-tampão que apresentou a melhor atividade enzimática foi 7,9, em 34 horas. Observou-se também que as soluções-tampão situadas na faixa ácida extrema (1,6 e 2.5) apresentaram praticamente a mesma atividade que 7,9 (diferença de 1 a 2%).

Por outro lado, a pequena diferença de atividade entre o substrato umedecido com soluções-tampão e com água destilada pH 7,3 (menos que 2%) abre uma perspectiva de análise econômica para a verificação de qual solução possa ser mais vantajosa.



H₂OC = Água corrente, pH 8,2
H₂OD = Água destilada, pH 7,3

FIGURA 4 - EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, contendo 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos em soluções-tampão de diferentes pH por 60hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

Na Figura 4, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a pH inicial de 7,9.

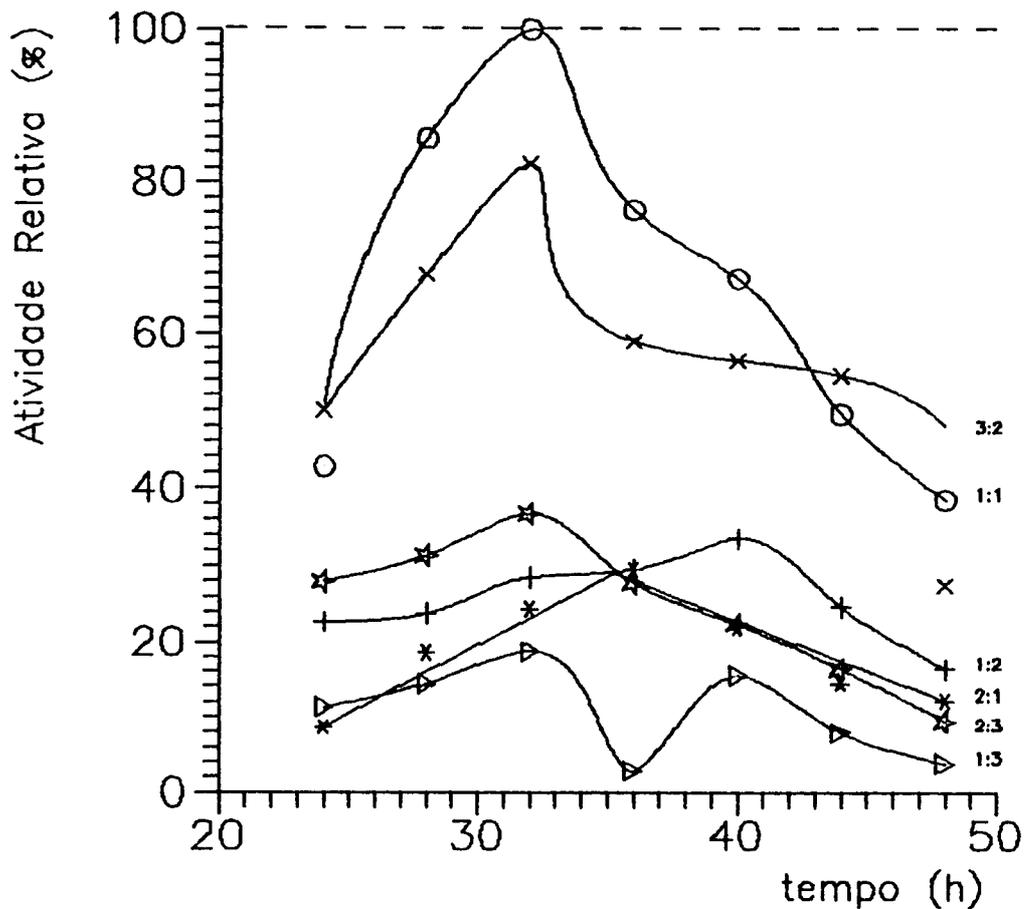
4.5. EFEITO DO TEOR DE UMIDADE NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Variou-se também a proporção "quantidade de sólidos/volume de líquido", conforme o item 3.7.3. e, pela Figura 5, verifica-se que a proporção de melhor atividade enzimática foi 1:1.

Este parâmetro mostrou ser de primordial importância na fermentação pois observa-se que passando da proporção 1:1 para 1:3 (p/v) há um decréscimo de atividade enzimática (no ponto de pico), de, aproximadamente, cinco vezes (verificando-se, inclusive, um deslocamento do pico para 36 horas). Para a proporção de 2:1, a redução da atividade enzimática foi de quatro vezes. Para 1:2, um decréscimo de tres vezes. Para 2:3, duas vezes e meia e para 3:2, uma redução equivalente a 20%.

Na Figura 5, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a um teor de umidade de 50% (1:1, p/v).

Estes resultados conferem com o apresentado por Nishio et alii (60), que demonstraram em seus estudos um crescimento de atividade enzimática, variando-se a porcentagem da proporção sólido/líquido de 32 a 56%, com o decréscimo de atividade após este ponto.



ATIVIDADE RELATIVA (%)						
AR %	100.0	29.5	82.5	33.5	18.7	36.7
Umidade	1:1	2:1	3:2	1:2	1:3	2:3

FIGURA 5 - EFEITO DA VARIAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com as proporções 1:1, 2:1, 3:2, 1:2, 1:3 e 2:3 entre farelo de trigo/suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 60hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O excesso de água, por esses dados, demonstra ser mais decisivo na queda da atividade enzimática, por interferir no fornecimento de O_2 , no decréscimo de porosidade do substrato e das trocas gasosas no interior do mesmo (45).

4.6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A seguir, o parâmetro analisado foi a quantidade de inóculo adicionado, obtido, segundo Tsujita et al (82), pela transmitância da suspensão de esporos do inóculo e de suas sucessivas diluições a 660nm (obtendo-se valores de 10 a 70%). Segundo a literatura, 10 mL de suspensão de esporos (após raspagem suave da cultura crescida na superfície do meio de manutenção) correspondem à concentração de 10^8 esporos por mL.

Verificou-se, conforme mostrado na Figura 6, que a melhor atividade enzimática obtida foi a referente a 50% de transmitância. Observou-se, também, que acima de uma determinada concentração, uma maior quantidade de inóculo parece diminuir, em pequena escala, a produção enzimática. Após 50% de transmitância, notou-se uma redução entre 1 a 2% da atividade.

Na Figura 6, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente à 50% de transmitância.

Thiemann (81), em seu estudo de produção de celulases, mostrou que uma concentração de esporos entre 10^4 e 10^6 não interferiu na produção enzimática, tendo, porém, uma queda brusca de rendimento com uma concentração de inóculo de 10^7 .

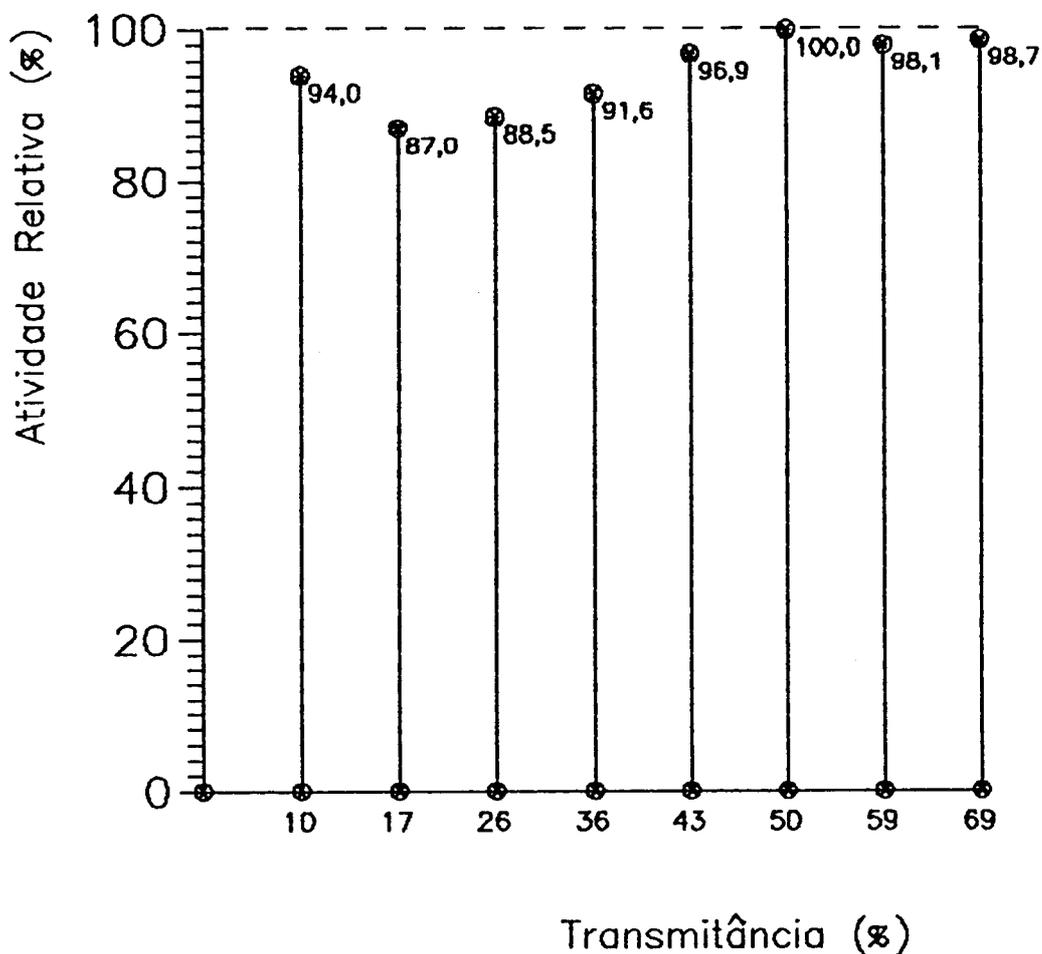


FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farelo de trigo e 2,0mL de suspensão de esporos de diferentes concentrações, medidas pela transmitância a 660nm, em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

4.7. EFEITO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Procurou-se então variar o substrato a ser utilizado como meio de cultura, de acordo com o tipo da matéria-prima, e verificar a influência da adição de fontes de nitrogênio e de nutrientes.

Em relação às matérias-primas utilizadas, apresentaram melhores atividades enzimáticas os extratos produzidos em farinha de soja, extrato de soja, e farelo de trigo, enquanto que farinha de mandioca, mandioca puba, farinha de milho, farelo de algodão e o resíduo obtido na "Champion" apresentaram um extrato enzimático com atividades insignificantes (Tabela 8).

Na Tabela 8, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente ao uso de farinha de soja após 34 horas de fermentação.

Verifica-se que os extratos obtidos em farinha de soja e extrato de soja apresentaram, aproximadamente a mesma atividade, enquanto que o do farelo de trigo apresentou uma atividade equivalente a 75% dos outros dois.

Este é um resultado que pode ser considerado como bem interessante, uma vez que o farelo de trigo é o substrato mais empregado na maior parte dos trabalhos relacionados com fermentação semi-sólida.

	ATIVIDADE RELATIVA (%)				
Farinha de trigo	69,0	53,7	75,5	50,6	72,1
Extrato de soja	73,8	79,1	98,9	74,0	70,1
Mandioca Puba	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Farelo de amendoim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Farinha de milho	3,2	0,0	7,7	2,2	7,6
Farelo de algodão	10,2	3,9	12,6	11,6	8,1
Resíduo "Champion"	0,0	4,4	11,6	10,0	0,0
Tempo (hs)	30	32	34	36	38

TABELA 7 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de diferentes meios de cultura e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato a pH 7,9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

Optando-se pela utilização de farinha de soja como meio de cultura, comparou-se, então, a atividade enzimática de seu extrato bruto, com a atividade do extrato obtido com esta farinha suplementada com 10, 25 e 50% de extrato de soja. O extrato obtido com somente farinha de soja como meio de cultura demonstrou possuir maior atividade enzimática em relação aos com suplementação (Figura 7).

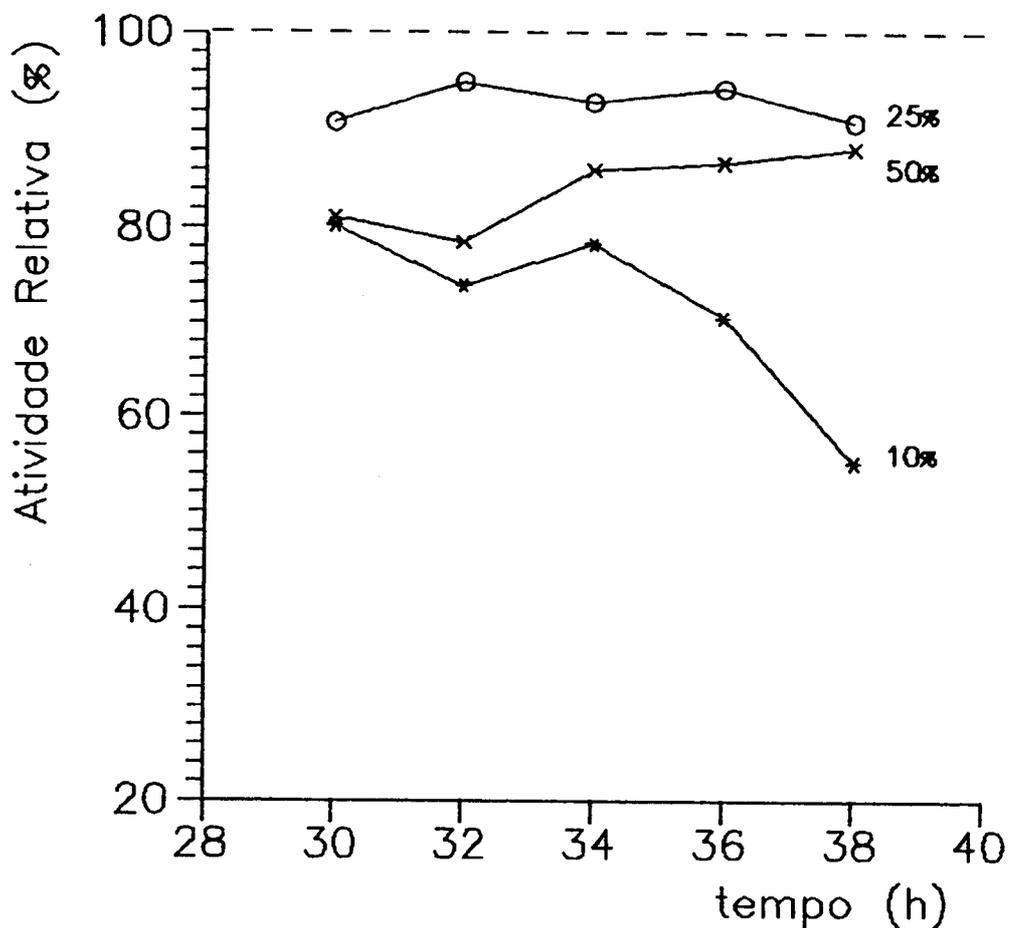
Na Figura 7, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente ao uso de farinha de soja após 34 horas de fermentação.

A seguir, analisou-se o efeito da suplementação de sais minerais (fosfato de amônia, fosfato de sódio e potássio, fosfato de potássio e sulfato de sódio) em farinha de soja, e os resultados obtidos, Figura 8, mostraram que houve um decréscimo na atividade enzimática.

Na Figura 8, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente ao uso de farinha de soja após 34 horas de fermentação.

Windish (92) havia informado do efeito estimulante exercido por fosfatos na produção de amilases fúngicas, fato este não comprovado por este estudo para a produção de proteases.

Ao se adicionar fontes de nitrogênio (caseína, peptona e uréia), notou-se, como mostra a Figura 9, uma pequena diminuição da atividade em cerca de 5% no instante 34 horas.



		ATIVIDADE RELATIVA (%)				
Tempo (hs)		30	32	34	36	38
Extrato de soja 10%		80.3	73.9	78.4	70.5	55.1
Extrato de soja 25%		90.9	95.0	93.0	94.4	91.0
Extrato de soja 50%		81.2	78.6	86.1	86.8	88.3

FIGURA 7 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATO DE SOJA EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com 10, 25 e 50% de extrato de soja e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.

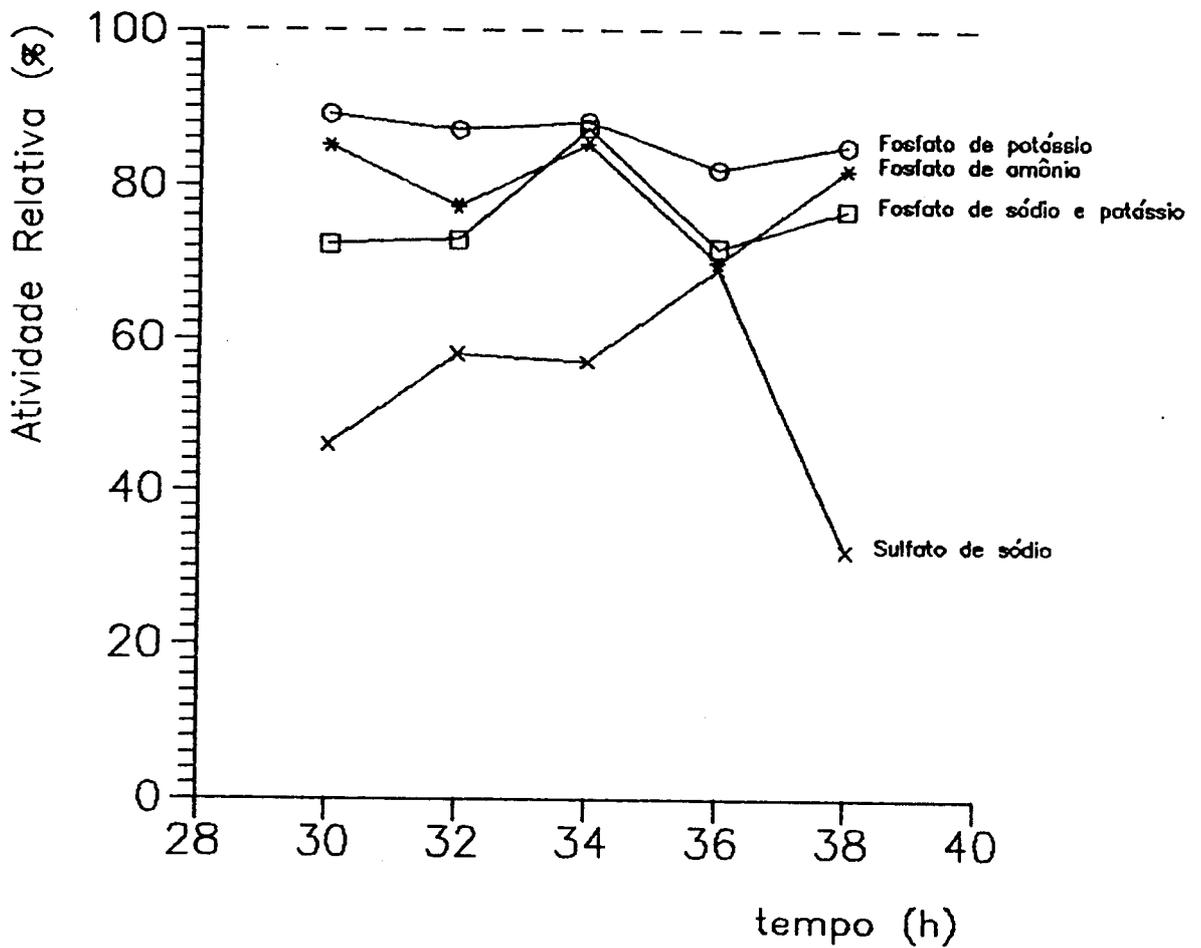


FIGURA 8 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com diferentes sais minerais e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.

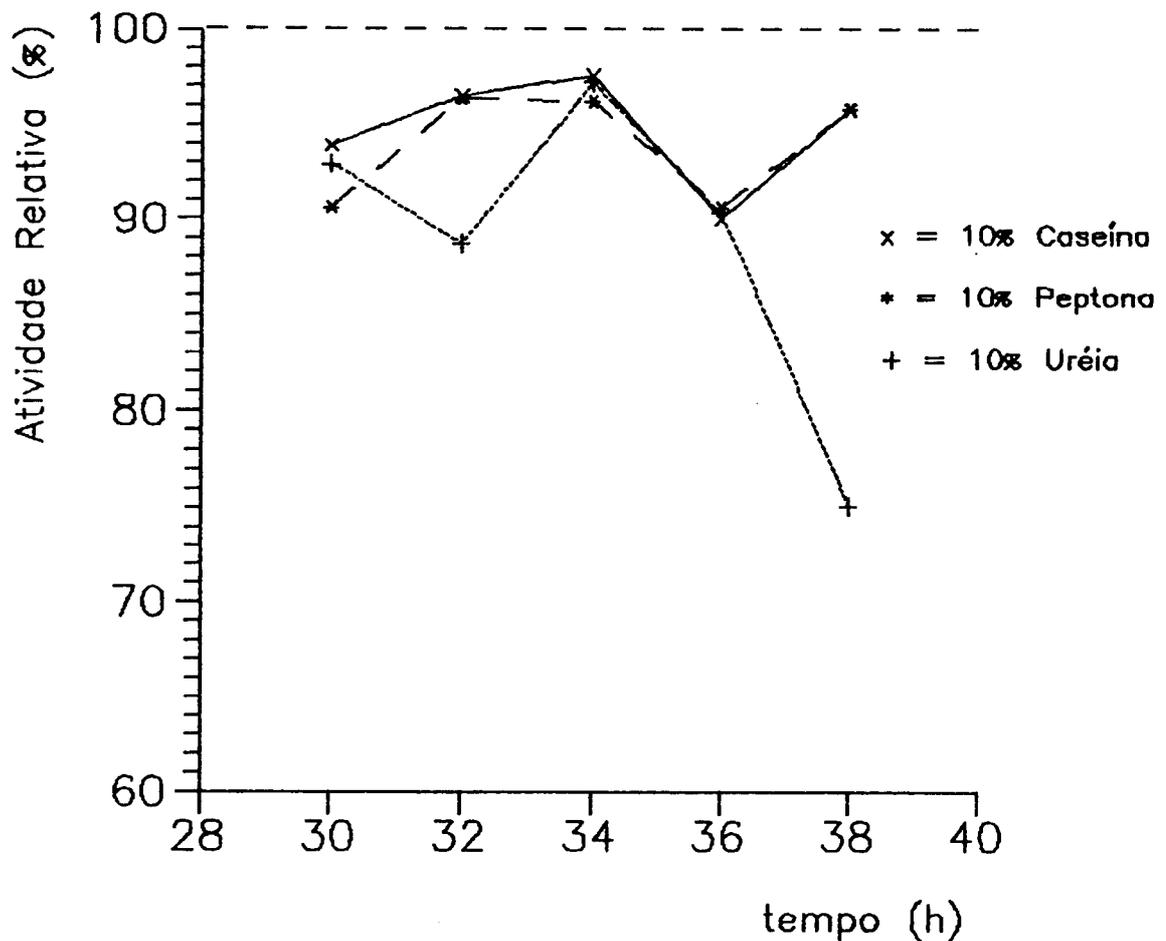


FIGURA 9 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES DE NITROGENIO EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.

A adição de "tween" a 0,1% e a 0,5% causa uma diminuição de atividade de cerca de 5% no instante 34 horas (Figura 10).

Nas Figuras 9 e 10, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente ao uso de farinha de soja após 34 horas de fermentação.

Windish (92), havia constatado ser a caseína uma excelente fonte de nitrogênio para a produção enzimática, fato este não verificado neste estudo.

Verificou-se então o efeito da suplementação de glicose, sacarose, amido e extrato de levedura, separadamente, à farinha de soja.

Como pode ser visto na Figura 11, a glicose, em concentração de 10%, consegue melhorar a atividade enzimática em cerca de 4%, deslocando porém este ponto de máximo para o tempo de 36 horas de fermentação.

Nas Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a atividade obtida neste teste com o substrato composto somente por farinha de soja após 34 horas de fermentação.

Windish (92), havia informado sobre o fato da glicose e frutose serem mais efetivas na promoção da respiração, mostrando, porém, um efeito inibidor na formação de enzimas fúngicas quando adicionadas em altas concentrações.

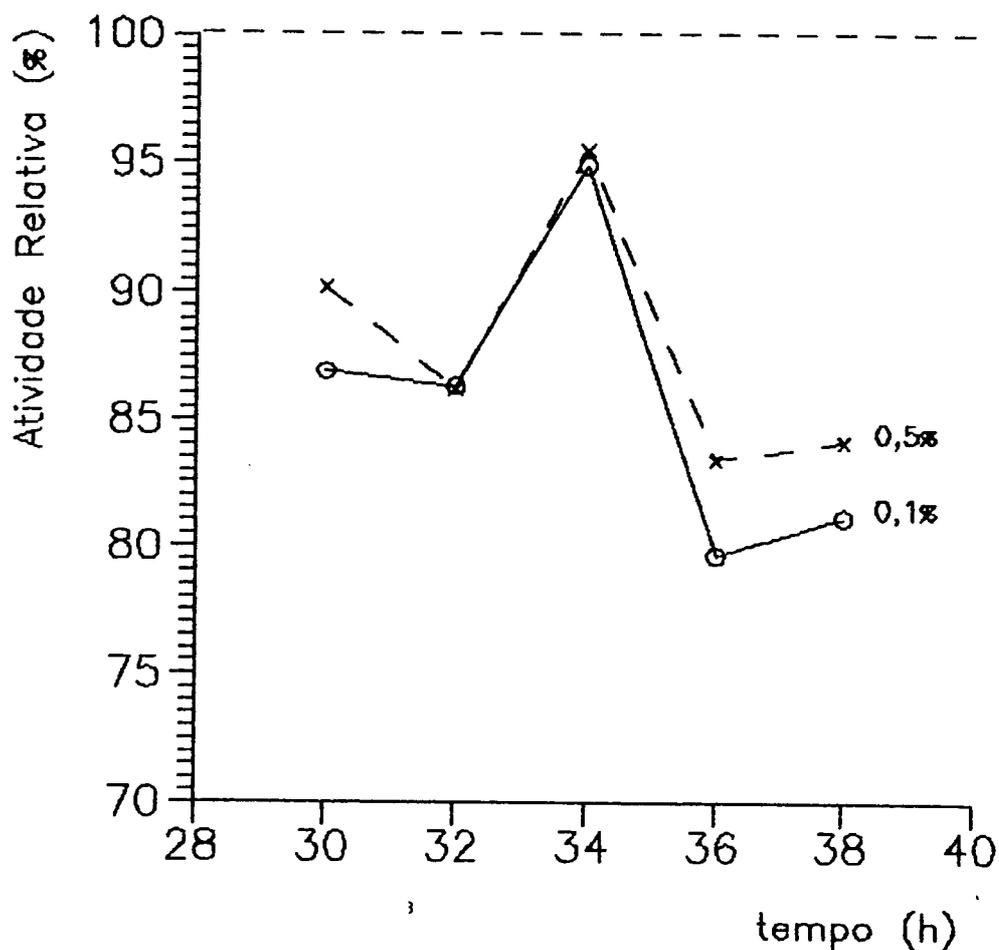


FIGURA 10 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE "TWEEN" EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com "tween" e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/ líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.

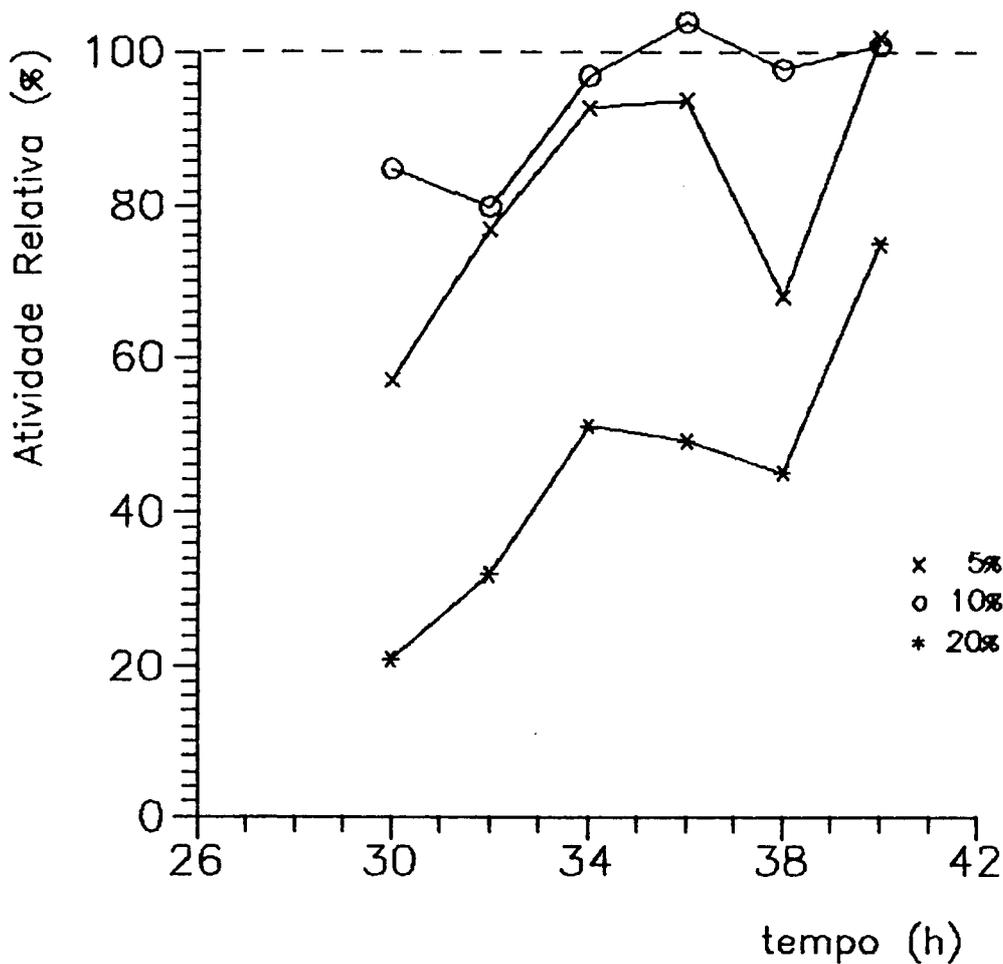


FIGURA 11 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com glicose e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas

Pelas Figuras 12 e 14, pode-se notar que com a suplementação de sacarose (10%) e extrato de levedura (5%), há, não só um aumento entre 5% e 10% na atividade enzimática, como também uma redução no tempo de produção desses extratos para 32 horas.

Dados obtidos na literatura indicam, para diferentes processos e diferentes linhagens, a variação de temperaturas de fermentação de 21 a 35°C, dependendo do produto desejado. Os tempos de fermentação relativos a esses processos variaram de 48 horas a dez dias (15,17,21,29,37,44,60,68,69,71,76,79,81,82,83,87,92). O tempo de 32 horas obtido neste estudo, a 37°C, situa-se, portanto, em um valor bem abaixo de todos estes trabalhos revistos.

A suplementação do meio com amido não demonstrou apresentar qualquer melhora na produção enzimática (Figura 13), assim como a adição de 5% de glicose com 5% de extrato de levedura, 5% de sacarose com 5% de extrato de levedura e 5% de amido com 5% de extrato de levedura (Figura 15).

4.8. EFEITO DA ESPESSURA DA CAMADA DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Realizou-se a análise do volume ideal do meio de cultura a ser fermentado em erlenmeyer de 250mL, tendo em vista ser o substrato basicamente composto por farinha de soja, o qual demonstrou ser um material que, quando umedecido, não possui a porosidade necessária para a penetração de oxigênio e dissipação de calor.

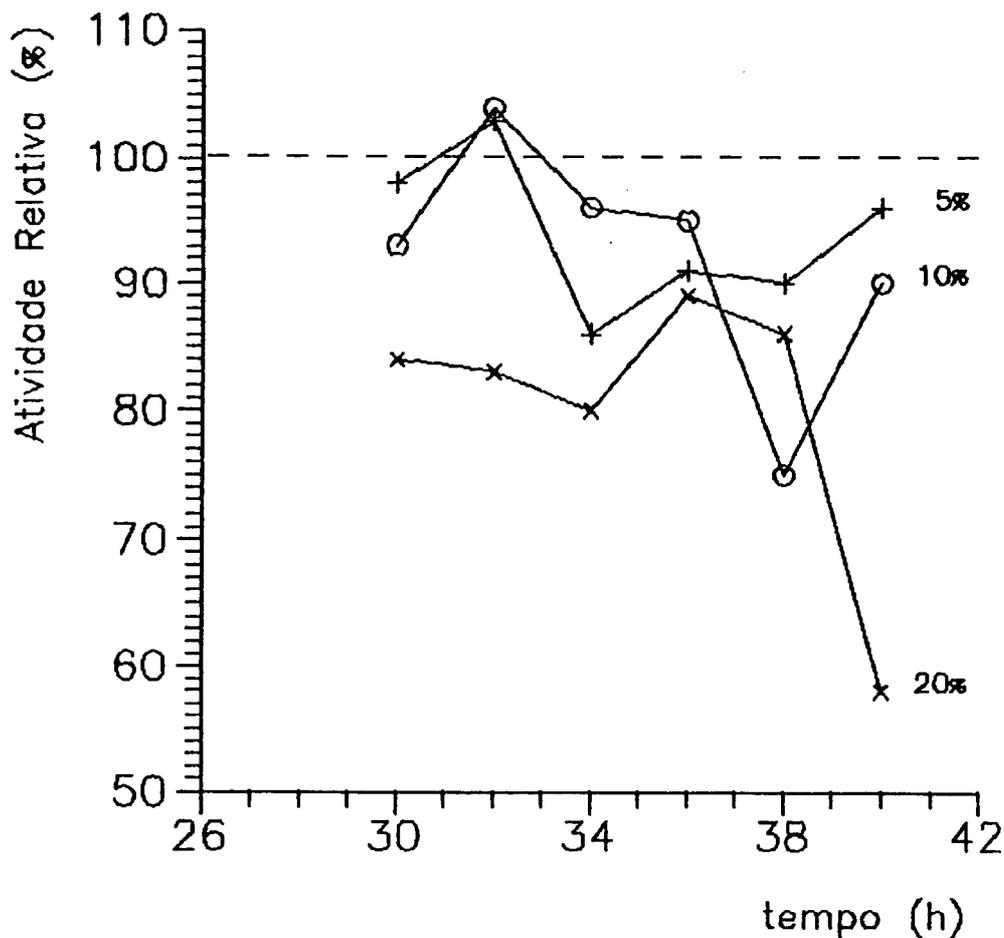


FIGURA 12 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE SACAROSE EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com sacarose e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/ líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas

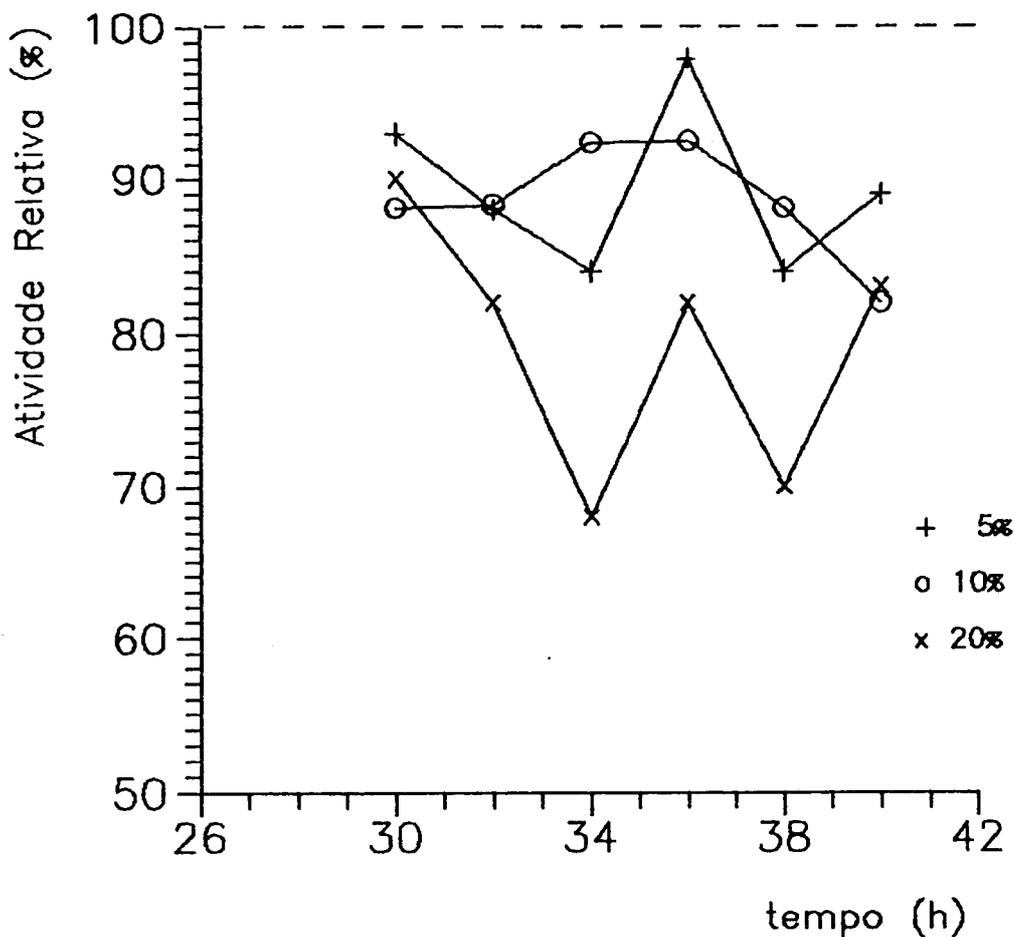


FIGURA 13 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AMIDO EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com amido e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas

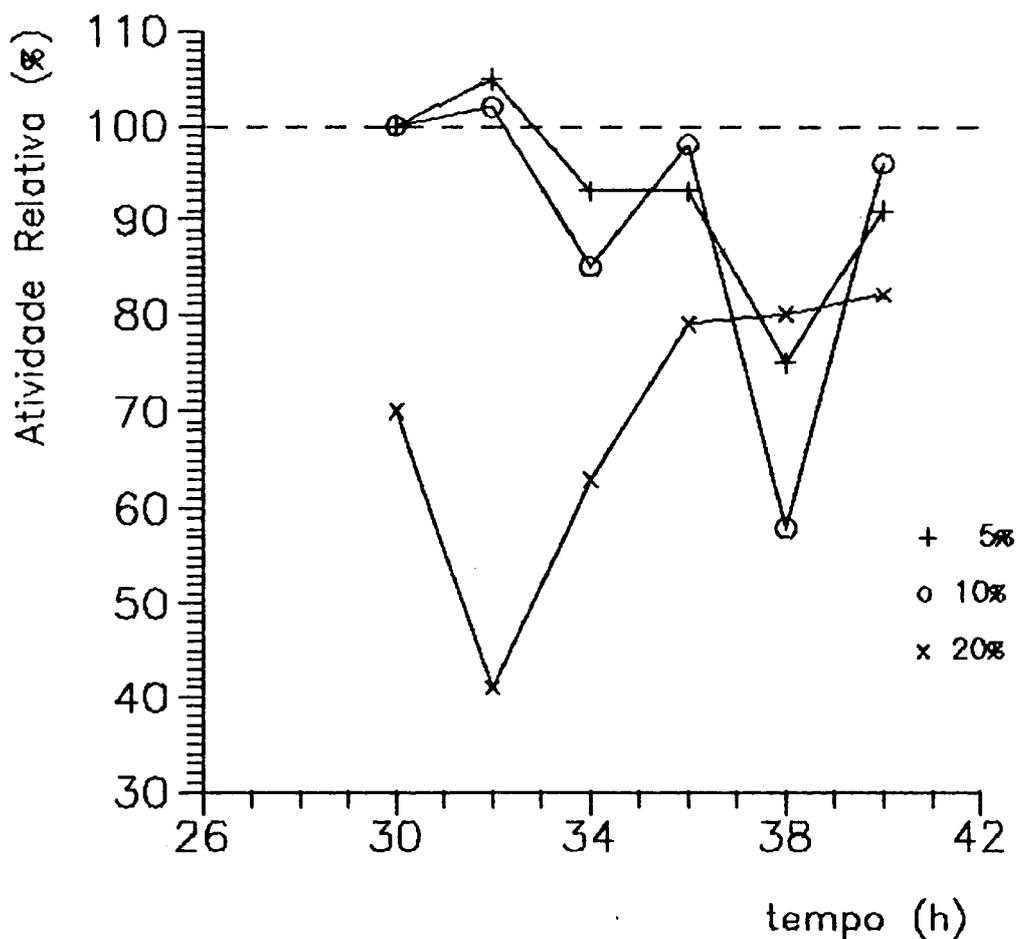
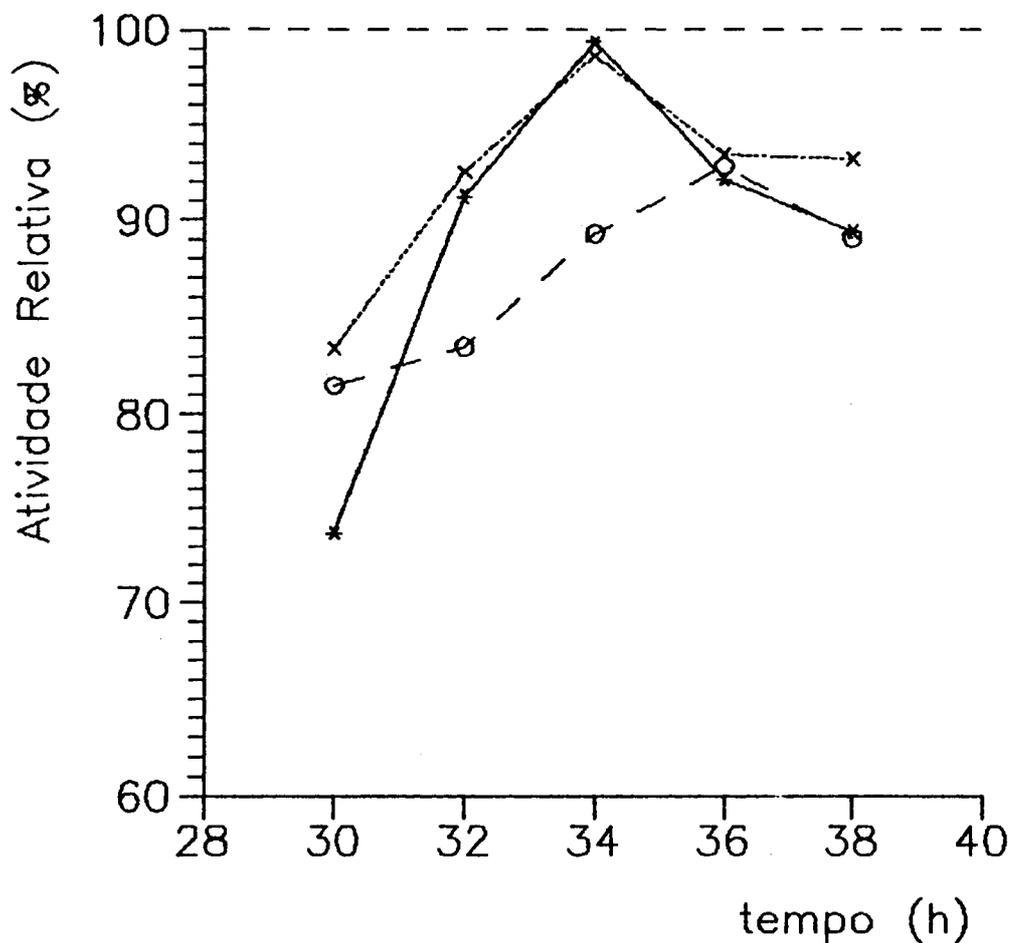


FIGURA 14 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com extrato de levedura e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.



- * = 5% Sacarose e 5% Extrato de Levedura
- o = 5% Amido e 5% Extrato de Levedura
- x = 5% Glicose e 5% Extrato de Levedura

FIGURA 15 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE, SACAROSE OU AMIDO, JUNTO COM EXTRATO DE LEVEDURA EM FARINHA DE SOJA NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g de farinha de soja, suplementada com 5% de glicose, sacarose ou amido junto com 5% de extrato de levedura e 2,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas

Na Tabela 9, utilizou-se como valor 100% de atividade relativa, a melhor atividade obtida neste teste, ou seja, a referente ao uso de 2,0 g de substrato após 32 hs de fermentação.

A opção inicial pelo estudo com apenas 2,0g de meio de cultura pareceu ser acertada pois esta quantidade foi a que apresentou o extrato bruto com maior atividade enzimática e rendimento (atividade/grama de substrato). Quando aumentou-se a quantidade para 5,0g, foi obtido um extrato com a segunda maior atividade, apresentando, porém, somente 55% da atividade enzimática total e cerca de 20% do rendimento ao se analisar a atividade enzimática por grama de substrato utilizado. Quantidades superiores de meio de cultura apresentaram extratos com atividades enzimáticas e rendimentos insignificantes (Tabela 9).

Visualmente, o crescimento do micélio e a esporulação nos erlenmeyers com 2,0g de substrato se deu mais rapidamente em relação aos outros (cerca de 24 horas), apresentando total recobrimento do meio pelo micélio após 60 horas. Com 5,0g, o meio apresentou uma esporulação um pouco mais lenta que no caso anterior (após cerca de 28 horas), sendo ainda possível visualizar o meio de cultura intacto no fundo do erlenmeyer ao fim do mesmo período total (60 horas). Com 10,0g de substrato, a esporulação intensa iniciou-se apenas após 48 horas, apresentando somente recobrimento superficial do micélio no meio. Os erlenmeyers com 20,0g e 50,0g não apresentaram esporulação antes de 60 horas.

		ATIVIDADE RELATIVA (%)				

5,0 g	23,3	40,5	54,8	11,4	8,8	
10,0 g	3,1	5,2	24,9	6,2	8,3	
20,0 g	2,1	3,1	23,5	8,5	0,0	
50,0 g	0,6	9,3	17,0	3,9	0,0	
Tempo (hs)	30	32	34	36	38	

TABELA 8 - INFLUENCIA DA ESPESSURA DA CAMADA DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado em erlenmeyers de 250mL, a 37°C, com 2,0g, 5,0g, 10,0g e 20,0g de farinha de soja, e, respectivamente, 2,0mL, 5,0mL, 10,0mL e 20,0mL de suspensão de esporos em solução-tampão fosfato pH 7.9 por 48hs. A enzima foi extraída com solução de ácido láctico pH 3 a uma proporção de 1:10 (sólido/líquido), após agitação por 30 min e filtração em papel de filtro quantitativo. Diluiu-se o extrato enzimático obtido (1/10) e mediu-se a atividade enzimática por absorção em luz ultravioleta a 280 nm.

O valor de 100% corresponde a cultura de 2,0g de farinha de soja sem suplementação alguma em 34 horas.

Obteve-se então um preparado enzimático produzido com 2,0g de meio de cultura em cada erlenmeyer, a 37°C, com uma adição de solução-tampão de pH inicial 7,9 a uma proporção sólido/líquido de 1:1 utilizando farinha de soja suplementada com 5% de extrato de levedura ou 10% de sacarose como substrato.

Com estes valores, obteve-se a melhor atividade proteolítica após 32 horas de fermentação.

4.9. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO

Foram então realizados testes para a caracterização deste preparado enzimático, segundo o item 3.8.1. Como pode-se observar pela Figura 16, este preparado tem sua atividade máxima a pH 3, mostrando uma queda de 20% a pH 2 e a pH 5 e 80% a pH 7. A partir de pH 8, o extrato não demonstrou qualquer atividade enzimática.

4.10. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Da mesma forma, pela Figura 17, pode-se observar a influência da temperatura na atividade enzimática. A temperatura ótima situa-se a 50°C, com a atividade enzimática decrescendo rapidamente após este ponto, estando o extrato totalmente inativo a 70°C. Nota-se que a temperatura de 30°C utilizada para os testes da atividade enzimática corresponde apenas a 60% da atividade a 50°C.

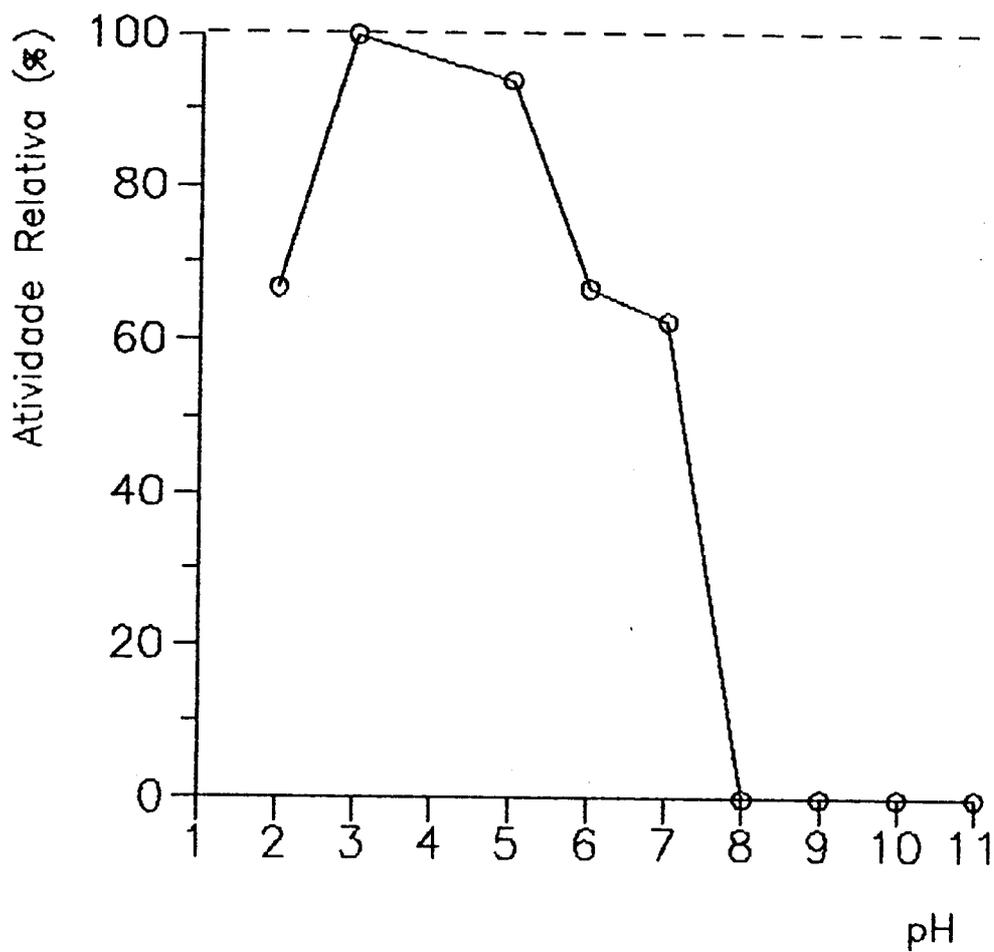


FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATUAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Foram estudadas as atividades proteolíticas do extrato enzimático obtidas da digestão da caseína, ajustados na faixa de pH entre 2 e 11, com soluções-tampão apropriadas (soluções de Britton-Robinson), a 30°C por 10 minutos de incubação.

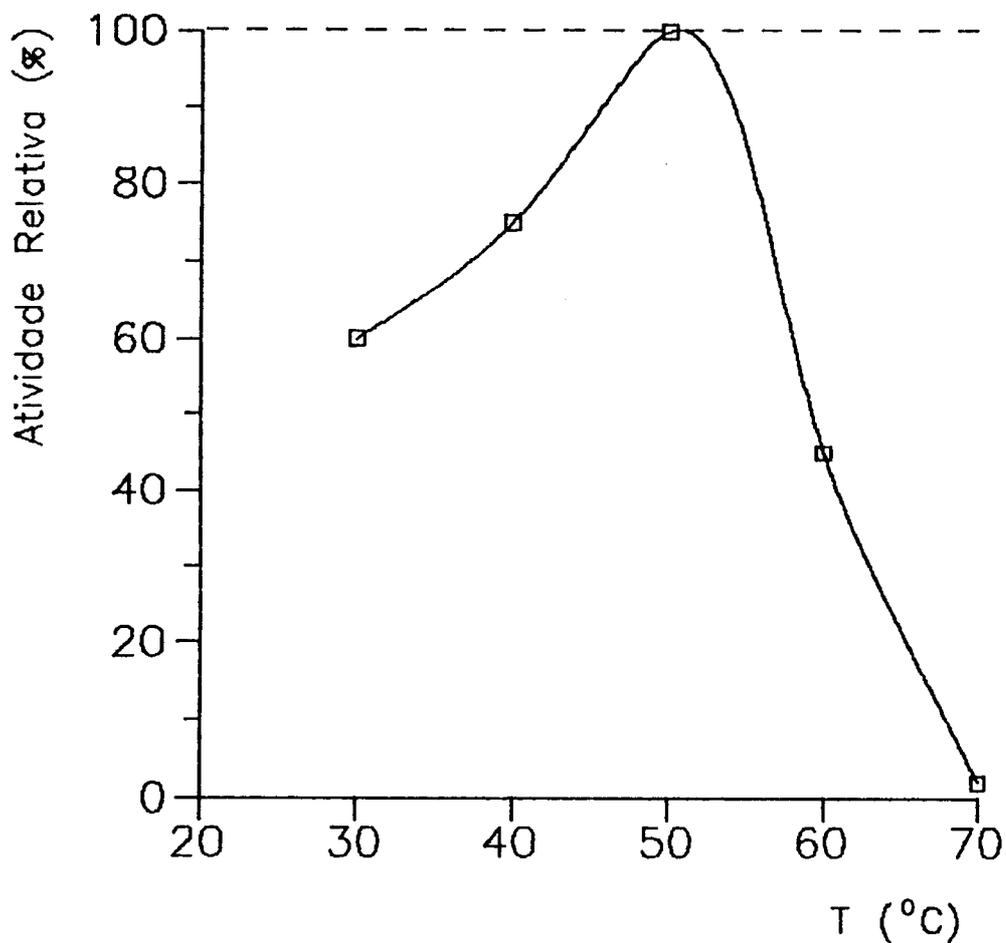


FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATUAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Verificou-se o efeito da temperatura, realizando-se a reação por 10 minutos (digestão da caseína a pH 3 pelo extrato enzimático) em banhos termoestabilizados a diferentes temperaturas entre 30 e 70°C, com uma variação de 10 a 10°C.

4.11. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

O extrato enzimático demonstrou ser estável de 20 a 60°C, quando então perde rapidamente a atividade. Apresenta uma atividade de 30% a 65°C, estando totalmente inativada a 70°C, conforme pode ser observado na Figura 18.

4.12. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

O extrato enzimático, quando incubado durante 10 horas, a diferentes pH, apresentou uma estabilidade de sua atividade máxima entre as faixas de 2 a 8, caindo rapidamente após este ponto, apresentando cerca de 70% de sua atividade a pH 9, 40% a pH 10 e menos que 20% a pH 11. Quando incubado, porém, durante 36 horas, o extrato apresentou a pH 2, cerca de 80% de sua atividade total, obtida a pH 3, decrescendo depois lentamente até pH 8, onde apresenta uma atividade um pouco maior que 85%, diminuindo, novamente, após este ponto, aos mesmos resultados obtidos em 10 horas (Figura 19).

4.13. EFEITO DE IONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Pelas análises realizadas, verificou-se, conforme mostra a Figura 20, que o preparado enzimático apenas teve um ligeiro decréscimo de atividade quando incubado junto com sais de cálcio (0,4% de redução), zinco e ferro (1,5%) e lítio (3,2%), apresentando, contudo, um acréscimo de atividade no extrato bruto ao se adicionar sais de magnésio (8,8% de acréscimo), cobre e bário (4,5%), potássio e manganês (3%) e EDTA (1,5%).

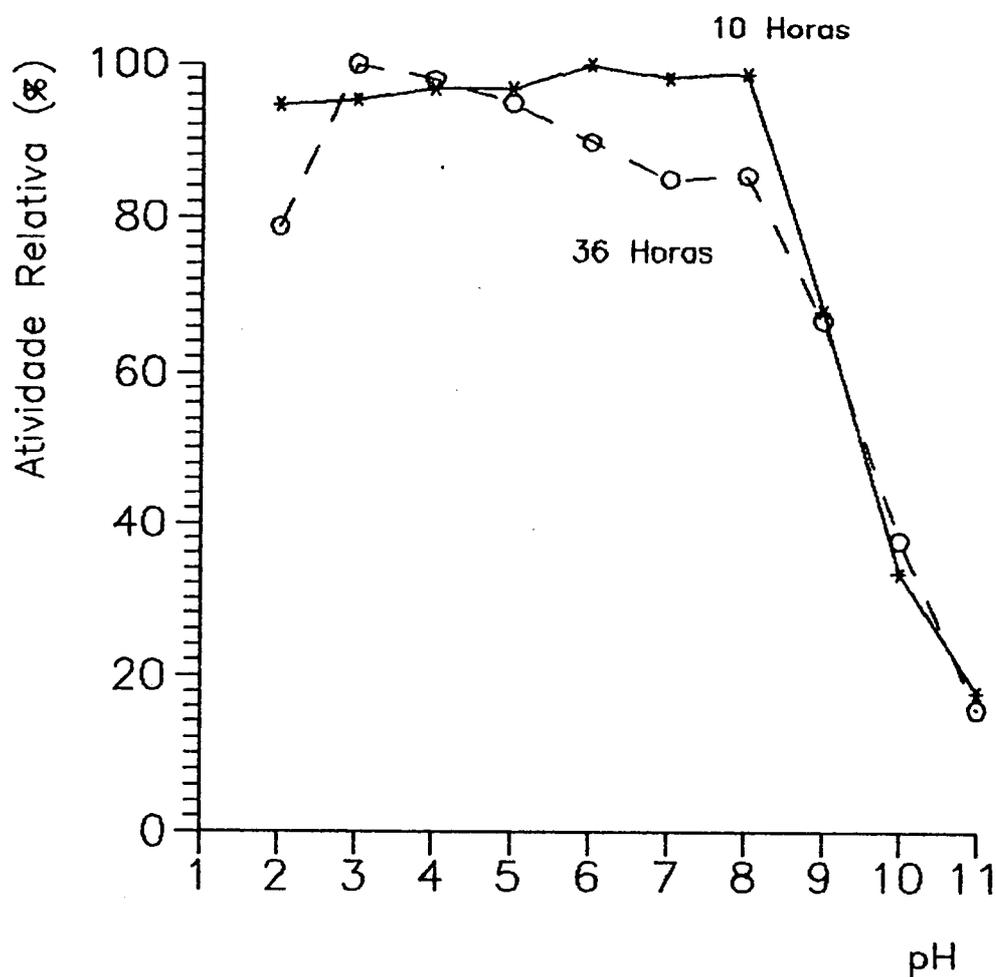


FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO A DIFERENTES pH

Adicionou-se 1mL do extrato enzimático a 1mL de soluções-tampão (soluções de Britton-Robinson) em diferentes valores de pH (de 2 a 11, variando-se de 1 a 1).

Estas soluções foram incubadas a temperatura ambiente durante 10 e 36 horas, sendo então diluídas para 1:10 com ácido láctico pH 3, verificando-se, após estes períodos, a atividade enzimática de cada pH estudado, pela digestão da caseína a 30°C por 10 minutos.

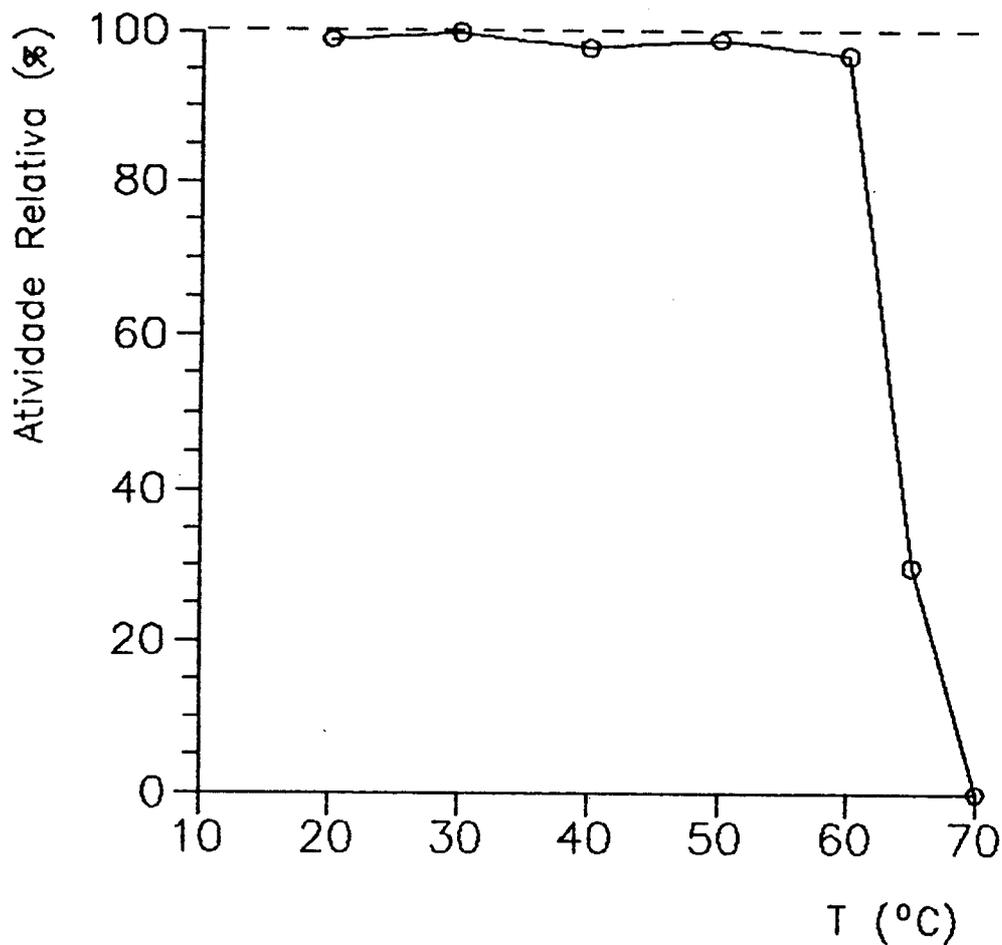
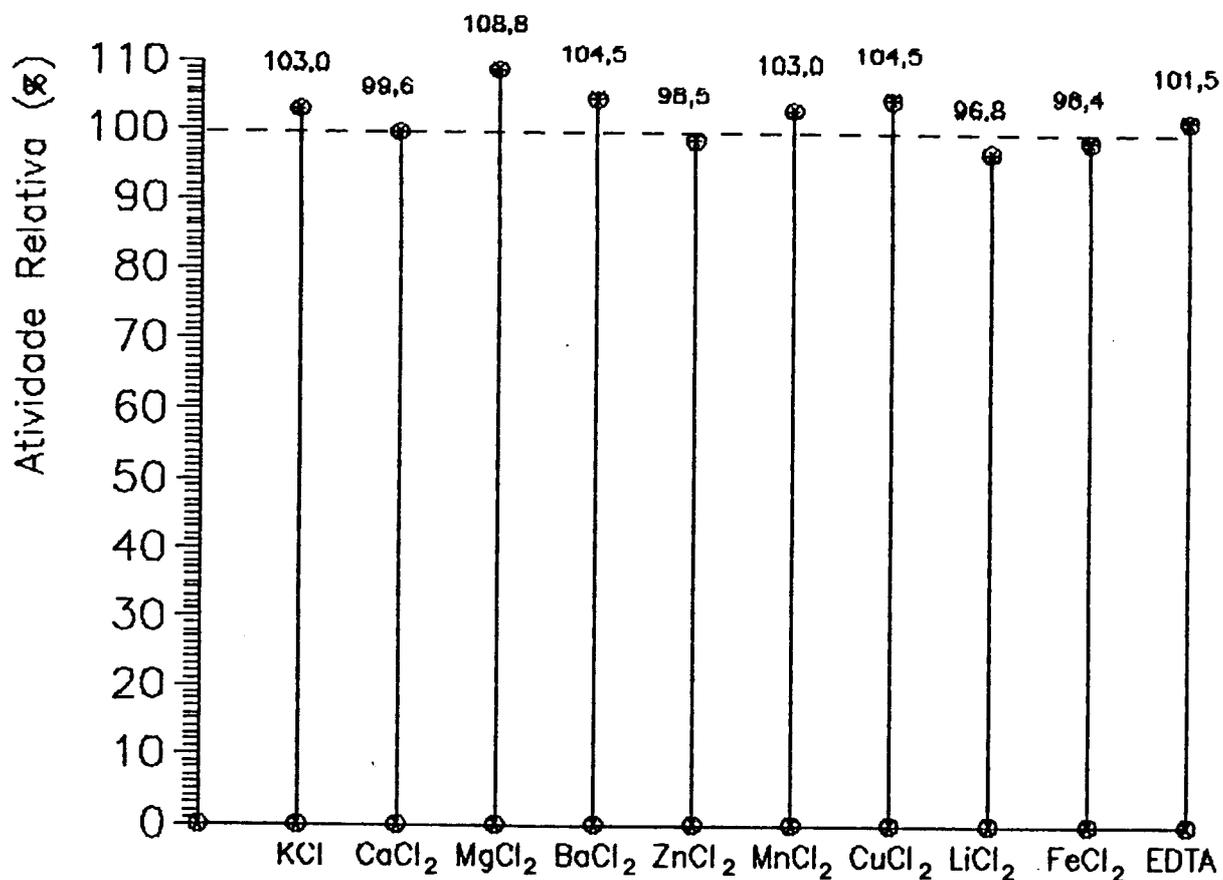


FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMICA DO EXTRATO ENZIMATICO

A solução enzimática foi incubada em banhos termoestabilizados a diferentes temperaturas entre 20 e 80°C (variação de 10 em 10°C) por uma hora, verificando-se em seguida a atividade enzimática pela digestão da caseína durante 10 minutos à temperatura sugerida de 30°C.



Influência de Metais e EDTA

FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE IONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

Foram adicionados à solução enzimática diferentes soluções de íons metálicos e EDTA (0,001M) na proporção 1:1 e incubados a temperatura ambiente por uma hora. Determinou-se depois deste período a atividade enzimática, pela digestão da caseína por 10 minutos a 30°C.

5. CONCLUSOES

1. Das vinte linhagens de fungos pesquisadas para a produção de enzimas proteolíticas, verificou-se que Aspergillus awamori NRRL 3112 foi a que apresentou melhores resultados.
2. As condições ótimas para a obtenção do extrato enzimático desta linhagem foram definidas como: temperatura de 37 C; adição de solução-tampão inicial de pH 7,9; proporção sólido/líquido de 1:1; utilização de farinha de soja suplementada com 5% de extrato de levedura ou 10% de sacarose como substrato.
3. Ao se utilizar erlenmeyers de 250 mL, a quantidade de farinha de soja que produziu maior atividade enzimática relativa à massa de substrato empregada, foi de 2,0g ou, em outras palavras, a que apresentou a maior relação área/volume.
4. O extrato enzimático foi obtido facilmente através da adição de solução de ácido láctico pH 3, na proporção 1:10 (peso de substrato inicial/volume de ácido láctico adicionado) e de uma simples filtração, indicando, assim, seu caráter extracelular.
5. O extrato enzimático com maior atividade proteolítica foi obtido após 32 horas de incubação, tempo bem menor àqueles citados em literatura para outras fermentações.

6. O extrato enzimático obtido apresenta, como características específicas, sua atividade proteolítica máxima a pH 3 e a 50°C, mantendo a estabilidade entre as faixas de pH de 2 a 8 durante 10 horas de incubação e estabilidade térmica entre 20 e 60°C por uma hora. Sofreu pequeno decréscimo em sua atividade (em até 4%) junto com os sais de cálcio, lítio, zinco e ferro, sendo que para os outros sais e EDTA, houve inclusive um pequeno acréscimo (em até 10%) em relação à atividade do extrato enzimático bruto.

6. SUGESTÕES

Para posteriores trabalhos de laboratório relativos à produção deste extrato enzimático por cultura em meio semi-sólido, sugere-se que sejam realizadas pesquisas relativas a:

1. Diferentes tipos de reatores que possam contornar o problema de aeração e dissipação de temperatura do meio, bem como controlar melhor a umidade do meio durante a fermentação, para trabalhos relativos a ampliação de escala.
2. Viabilidade de purificação desta(s) enzima(s) e respectiva caracterização.
3. Melhoramento genético do microrganismo estudado, para tentar aumentar a sua produtividade ou diminuir o tempo de produção.
4. Verificação de possíveis aplicações deste extrato bruto ou de suas enzimas purificadas na indústria de processamento de alimentos.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AACC - Association of Official Agricultural Chemists (1962).
Proteolytic Activity - Spectrophotometric Method. 22-62,
page 1 of 3; 22-63, page 1 of 2.
2. ADLER-NISSEN, J.L. (1977) - Enzymatic Hydrolysis of Food
Proteins. *Process Biochemistry*, 12(6): 18-23.
3. ADLER-NISSEN, J.L. (1979) - Determination of the Degree of
Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenze-
nesulfonic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27(6): 1256-62.
4. AKATSUKA, T. and SATO, M. (1963) - Studies on Peptidases of
Aspergillus oryzae. Part 2: A Survey of Dipeptidase and
Aminopolypeptidase Activities of Various Molds, and a
Study of Mold Culture Method and Enzyme Extration. *Agr.
Biol. Chem.*, 27(2): 71-5.
5. AKATSUKA, T. and SATO, M. (1963) - Studies on Peptidases of
Aspergillus oryzae. Part 3: Further Studies on the
Specificities of the Purified Dipeptidase. *Agr. Biol.
Chem.*, 27(12): 828-35.
6. ANSON, M.L. (1938) - Estimation of Proteinase with Hemoglo-
globin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79-86.

7. BERGKVIST, R. (1963) - The Proteolytic Enzymes of *Aspergillus oryzae*. 1. Methods for the Estimation and Isolation of the Proteolytic Enzymes. *Acta Chemica Scandinavica*, 17: 1521-40.
8. BERGKVIST, R. (1963) - The Proteolytic Enzymes of *Aspergillus oryzae*. 2. Properties of the Proteolytic Enzymes. *Acta Chemica Scandinavica*, 17: 1541-51.
9. BROOK, E.J., STANTON, W.R. and WALLBRIDGE, A. (1969) - Fermentation Methods for Protein Enrichment of Cassava. *Biotechnology and Bioengineering*, 11: 1271-84.
10. CAHN, F.J. (1935) - Citric Acid Fermentation on Solid Materials. *Industrial and Engineering Chemistry*, 27(2): 201-04.
11. CANNEL, E. and MOO-YOUNG, M. (1980) - Solid-State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, 15(6): 2-7.
12. CANNEL, E. and MOO-YOUNG, M. (1980) - Solid-State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, 15(6): 24-8.
13. CAPALBO, D.M.F. e MORAES, I.O. (1987) - Outlook on the Use of Semisolid Culture Media for the Production of *Bacillus thuringiensis*. *Anais do III Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá.
14. CARRIZALES, V., RODRIGUEZ, H. and SARDIÑA, I. (1981) - Determination of the Specific Growth of Molds on Semi-Solid Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 321-33.

15. CHAHAL, D.S. (1985) - Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(1): 205-10.
16. COHEN, B.L. and DRUCKER, H. (1977) - Regulation of Extracellular Protease in *Neurospora crassa*: Induction and Repression under Conditions of Nitrogen Starvation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 182: 601-13.
17. CREWETHER, W.G. and LENNOX, F. (1950) - Preparation of Crystals Containing Protease from *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 165: 680.
18. DAVIDSON, R., GERTLER, A. and HOFMANN, T. (1975) - *Aspergillus oryzae* Acid Proteinase. *Biochem. J.*, 147: 45-53.
19. FEDER, J. et alii (1978) - Stabilization of Proteolytic Enzymes in Solution. *Biotechnology and Bioengineering*, 20: 1865-72.
20. FOGARTY, W.M., GRIFFIN P.J. and JOYCE, A.M. (1974) - Enzymes of *Bacillus* Species - Part 2. *Process Biochemistry*, 9(2): 27-35.
21. FUKUMOTO, J., TSURU, D. and YAMAMOTO, T. (1967) - Studies on Mold Protease. Part 1: Purification, Crystallization and Some Enzymatic Properties of Acid Protease of *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem.*, 31(6): 710-17.

22. GODFREY, T. & REICHEL, J. (1983) - Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry. The Nature Press, New York.
23. GOODWIN, T.W. and MORTON, R.A. (1946) - The Spectrophometric Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins. The Biochemical Journal, 40: 628-32.
24. GRAMPP, E.G. (1982) - Modification of Certain Foodstuffs by Enzymes. Process Biochemistry, 17(1): 2-6.
25. HAGIHARA, B. et alii (1958) - Crystalline Bacterial Proteinases. 1. Preparation of Crystalline Proteinase of *Bacillus subtilis*. The Journal of Biochemistry, 45(3): 185-94.
26. HAN, Y.W. and ANDERSON, A.W. (1975) - Semisolid Fermentation of Ryegrass Straw. Applied Microbiology, 30(6): 930-34.
27. HAO, L.C. et alii (1943) - Fungal Amylases as Saccharifying Agents in the Alcoholic Fermentation of Corn. Industrial and Engineering Chemistry, 35(2): 814-18.
28. HAINES, R.B. (1931) - The Formation of Bacterial Proteases, Especially in Synthetic Media. Biochemical Journal. 25: 1851-59.
29. HAYASHIDA, S. (1975) - Selective Submerged Productions of Types of Glucoamylases by a Black-koji Mold. Agr. Biol. Chem. 39(11): 2093-99.

30. HESSELTINE, C.W. (1972) - Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 14: 517-32.
31. HESSELTINE, C.W. (1977) - Solid-State Fermentation - Part 1. *Process Biochemistry*. 12(6): 24-7.
32. HESSELTINE, C.W. (1977) - Solid-State Fermentation - Part 2. *Process Biochemistry*, 12(2): 29-32.
33. HESSELTINE, C.W. et alii (1968) - Laboratory Studies on the Formation of Aflatoxin in Forages. *Mycologia*, 60: 304-12.
34. HESSELTINE, C.W. et alii (1966) - Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriol. Rev.*, 30: 795-805.
35. JENSEN, G. (1972) - Bacillus derived Detergent Enzymes. *Process Biochemistry*, 7(8): 23-5.
36. JEFFREYS, G.J. (1948) - Mold Enzymes Produced by Continuous Tray Method. *Food Industries*, 20(1): 82-84.
37. KARGI, F., CURME, J.A. and SHEEHAN, J. (1985) - Solid-State Fermentation of Sweet Sorghum to Ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 27(1): 34-40.
38. KEAY, L. (1971) - Microbial Proteases. *Process Biochemistry*, 12: 17-21.
39. KEAY, L. et alii (1972) - Production and Isolation of Microbial Proteases. *Biotechnology & Bioengineering Symposium*, 3: 63-92.

40. KELLY, C.T. and FOGARTY, W.M. (1976) - Microbial Alkaline Enzymes. *Process Biochemistry*, 11(6): 3-9.
41. KIRBY, K.D. and MARDON, C.J. (1980) - Production of Fuel Ethanol by Solid-Phase Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 2425-27.
42. KLING, S.H., ARAUJO NETO, J.S. and PERRONE, J.C. (1982) - Proteases from By-Products of Agave Fibre Production: Its Quantitative Evaluation, Concentration and Purification. *Process Biochemistry*, 17(1): 29-31.
43. KUNITZ, M. (1947) - Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
44. LAKSHIMINARAYAMA, K. et alii (1975) - A Solid-State Fermentation Method for Citric Acid Production Using Sugar Cane Bagasse. *Biotechnology and Bioengineering*, 17: 291-93.
45. LAUKEVICS, J.J. et alii (1984) - Solid Substrate Fermentation of Wheat Straw to Fungal Protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 1465-74.
46. LINDENFELSER, L.A. and CIEGLER, A. (1975) - Solid-State Fermentor for Ochratoxin A Production. *Applied Microbiology*, 29(3): 323-27.
47. LONSANE, B.K. et alii. (1985) - Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 258-65.

48. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) - Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.
49. MACKIE, I.M. (1974) - Proteolytic Enzymes in Recovery of Proteins from Fish Waste. *Process Biochemistry*. December: 26-8.
50. MACKIE, I.M. (1982) - Fish Protein Hydrolysates. *Process Biochemistry*. 17(1): 26-8.
51. MADGLESSI, J.F. & BARLEY, J.E. (1979) - Analysis of Fermentation Processes using Flow Microfluorometry : Single Parameter Observation of Batch Bacterial Growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(11): 1995-2008.
52. McDONALD, C.E. and CHEN, L.L. (1965) - The Lowry Modification of the Folin Reagent for Determination of Proteinase Activity. *Anal. Biochem.*, 10: 175-7.
53. MOHR, V. (1980) - Enzymes Technology in the Meat and Fish Industries. *Process Biochemistry*. 15(6): 18-21.
54. MOORE, S. and STEIN, W.H. (1948) - Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, 176: 367-88.
55. NAKADAI, T., NASUNO, S. and IGUCHI, N. (1972) - The Action of Peptidases from *Aspergillus oryzae* in Digestion of Soybean Proteins. *Agr. Biol. Chem.*, 36(2): 261-68.

56. NAKADAI, T., NASUNO, S. and IGUCHI, N. (1972) - Purification and Properties of Acid Carboxipeptidase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 36(9): 1473-80.
57. NAKADAI, T., NASUNO, S. and IGUCHI, N. (1973) - Purification and Properties of Acid Carboxipeptidase IV from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, 37(6): 1237-51.
58. NAKADAI, T. and NASUNO, S. (1977) - The Action of Acid Proteinase from *Aspergillus oryzae* on Soybean Proteins. *Agr. Biol. Chem.*, 41(2): 409-10.
59. NASUNO, S. and NAKADAI, T. (1971) - Formation of Glutamic Acid from Defatted Soybeans by *Aspergillus oryzae* 460. *J. Ferment. Technol.*, 49(6): 544-51.
60. NISHIO, N., TAI, K. and NAGAI, S. (1979) - Hydrolase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Cultivation. *European J. Appl. Microbiol.*, 8: 263-70.
61. NOVO'S HANDBOOK OF PRACTICAL BIOTECHNOLOGY (1986) - Ed. by Boyce, C.O.L., Novo Industri A/S.
62. NUNOKAWA, Y. (1965) - Purification of Two Acid-Proteases of *Aspergillus oryzae* from Takadiastase. *Agr. Biol. Chem.*, 29(7): 687-92.
63. OKA, T. and MORIHARA, K. (1973) - Acid Carboxipeptidase-like Activity Contaminating Proctase B. *Agr. Biol. Chem.*, 37(5): 1203-4.

64. OLSEN, H.S. and ADLER-NISSEN, J. (1979) - Industrial Production and Applications of a Soluble Enzymatic Hydrolyzate of Soya Protein. *Process Biochemistry*, 14(2): 6-11.
65. OSHIMA, K. and CHURCH, M. (1923) - Industrial Mold Enzymes. *Industrial and Engineering Chemistry*, 15(1): 67-70.
66. OTA - OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT (1984) - Commercial Biotechnology: an International Analysis. OTA - C.J.S., 611p.
67. PARK, Y.K. e Draetta, I.S. (1971) - Aplicação de Enzimas Proteolíticas no Amaciamento de Carne de Boi. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2(3): 125-29.
68. PARK, Y.K. et alii (1972) - Produção de Amilase Fúngica por Fermentação Submersa, por Cultura em Meio Semi-Sólido e seu Uso em Panificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2(4): 181-85.
69. PARK, Y.K. e Lima, D.C. (1971) - Produção de Amiloglucosidase Fúngica por Fermentação Submersa e sua Purificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 3(2): 67-74.
70. PETERSON, G.L. (1979) - Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochemistry*, 100: 201-20.
71. RAIMBAULT, M. and ALAZARD, D. (1980) - Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. *European J. Appl. Microbiol.*, 2: 199-209.

72. RALPH, B.J. (1976) - Solid State Fermentations. Food Technology in Australia, July: 247-51.
73. RAMSTACK, J.M., LANCASTER, E.B. and BOTHAST, R.J. (1979) - Gas Chromatographic Headspace Analysis of Solid Substrate Fermentations. Process Biochemistry, 14(2): 2-4.
74. RATHBUN, B.L. and SHULER, M.L. (1983) - Heat and Mass Transfer Effects in Static Solid-Substrate Fermentations: Design of Fermentations Chambers. Biotechnology and Bioengineering, 25: 929-938.
75. REGNIER, F.E. (1983) - High Performance Liquid Chromatography of Biopolymers. Science, 222: 245-52.
76. ROBERTS, M. et alii (1944) - Saccharification of Wheat by Fungal Amylases for Alcohol Production. Industrial and Engineering Chemistry, 36(2): 811-12.
77. SATO, M. and AKATSUKA, T. (1959) - Purification of Peptidases of *Aspergillus oryzae* and some Properties of the Purified Peptidases. Bull Agr. Chem. Soc. Japan, 23(6): 465-74.
78. SEKINE, H., NASUNO, S. and IGUCHI, N. (1970) - Digestion of Soybean Protein by the Proteolytic Enzymes of *Aspergillus sojae*. Agr. Biol. Chem., 34(11): 1690-96.
79. SILMAN, R.W. et alii (1979) - Production of Aflatoxin in Corn by a Large Scale Solid-Substrate Fermentation Process. Biotechnology and Bioengineering, 21: 1799-1808.

80. SODEK, J. and HOFMANN, T. (1979) - Microbial Acid Proteinases. *Methods in Enzymology*, 19: 372-406.
81. THIEMANN, J.E. (1985) - Produção de Enzimas por Fermentação em Substrato Semi-Sólido com Especial Referência às Celulases. *Anais do II Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, V.1: 107-31.
82. TOYAMA, N. (1976) - Feasibility of Sugar Production from Agricultural and Urban Cellulosic Wastes with *Trichoderma viride* Cellulase. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 6: 207-19.
83. TSUJITA, Y. and ENDO, A. (1977) - Extracellular Acid Protease of *Aspergillus oryzae* Grown on Liquid Media : Multiple Forms due to Association with Heterogeneous Polysaccharides. *J. Bacteriology*, 130(1): 48-56.
84. UEHARA, H. et alii (1974) - Regulation of Neutral Protease Productivity in *Bacillus subtilis*: Transformation of High Protease Productivity. *Journal of Bacteriology*, 119(1): 82-91.
85. UNDERKOFER, L.A., SEVERSON, G.M. and GOERING, K.J. (1946) - Saccharification of Grain Mash for Alcoholic Fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry*, 38(10): 980-85.
86. UNDERKOFER, L.A., FULMER, E.I. and SCHOENE, L. (1939) - Saccharification of Starchy Grain Mash for the Alcoholic Fermentation Industry. *Industrial and Engineering Chemistry*, 31(6): 734-38.

87. UNDERKOFER, L.A. et alii (1949) - Commercial Production and Use of Mold Bran. *Cereal Chemistry*, 24(1): 1-22.
88. VEZINA, C., SEHGAL, S.N. and SINGH, K. (1968) - Transformation of Organic Compounds by Fungal Spores. *Adv. Appl. Microbiol.*, 10: 221-68.
89. YAMAMOTO, A. (1975) - Enzymes in Food Processing. Ed. by Reed, G.. Academic Press, 573p.
90. YEMM, E.W. and COCKING, E.C. (1955) - The Determination of Amino-acids with Ninhydrin. *Analyst*, 80: 209-13.
91. WHITAKER, J. (1972) - Principles of Enzymology for the Food Science, Cap. 19. New York, Marcel Dekker Inc.
92. WINDISH, W.W. and MHATRE, N.S. (1965) - Microbial Amylases. *Advances in Applied Microbiology*, 2: 273-304.
93. ZADRAZIL, F. and BRUNNERT, H. (1981) - Investigation of Physical Parameters Important for the Solid State Fermentation of Straw by White Rot Fungi. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 183-8.