

## Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido

Leandro Daniel de Paris<sup>1\*</sup>, Fabiano Bisinella Scheufele<sup>2</sup>, Ademir Teixeira Júnior<sup>2</sup>, Thiago Luiz Guerreiro<sup>2</sup> e Salah Din Mahmud Hasan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: leandroparis@hotmail.com

**RESUMO.** A soja possui ampla disponibilidade de componentes bioquímicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, lecitina, dentre outros, tornando interessante sua utilização como substrato para a fermentação em estado sólido (FES). Este processo, apesar de não ser tão utilizado industrialmente quanto à fermentação submersa (Fsm), apresenta-se viável, pois tem apresentado resultados superiores de produtividade, principalmente no cultivo de fungos filamentosos e na produção de enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de comparar a produção de diferentes tipos de complexos enzimáticos por FES utilizando diferentes tipos de sojas (orgânica, transgênica e convencional) com o fungo *Aspergillus niger*. Realizou-se a caracterização dos substratos para a produção de amilase, protease e lipase, avaliação das curvas de crescimento do microrganismo e das condições ótimas de produção da protease utilizando planejamento de experimentos. As maiores atividades enzimáticas no estudo dos parâmetros da fermentação foram observadas para a protease, utilizando soja convencional com umidade inicial de 50%, 144h de fermentação, concentração inicial do inóculo de  $4.10^6$  esporos  $g^{-1}$  e tamanho de partícula de 0,6 mm. O estudo de otimização do processo indicou que os melhores resultados de atividade enzimática para a protease foram obtidos em pH 3,0 e tamanho de partícula dos grãos de soja de 0,6 mm após a fragmentação para as fermentações.

**Palavras-chave:** fermentação sólida, planejamento de experimentos, complexos enzimáticos.

### Enzyme complexes production by *A. niger* from soybean under solid state fermentation

**ABSTRACT.** Soybean has a wide availability of biochemical compounds as proteins, polysaccharides, lipids, carbohydrates, minerals, vitamins, fibers, lecithin, among others, making interesting its employment as substrate for solid state fermentation. Although the process of SSF is not extensively used industrially like the submerged fermentation (SmF), it can be a viable alternative, since presents higher results of productivity, especially at the cultivation of filamentous fungi and enzymes production. In this way, this study compared the production of different types of enzymes through solid-state fermentation, using different types of soybean cultures (organic, transgenic and conventional) with the fungus *A. niger*. We accomplished the characterization of the substrates for the production of amylase, protease and lipase, evaluation of the growth curves of the microorganism and the optimal conditions of enzymes production using experimental design. The highest enzyme activities in the study of fermentation parameters were observed for the protease, using conventional soybeans with initial moisture of 50%, 144h of fermentation, initial inoculum concentration of  $4.10^6$  spores  $g^{-1}$  and particle size of 0.6 mm. The study of process optimization indicated that the best results of enzyme activity for the protease were obtained at pH 3.0 and particle size of soybean fragmentation of 0.6 mm.

**Keywords:** solid fermentation, experimental design, enzymes.

### Introdução

A soja é o carro chefe da produção agrícola nacional. Os grãos maduros contêm cerca de 40,7% de proteína, 22,7% de óleo, 10,9% de açúcares totais, 6,7% de fibra e cerca de 5,8% de cinzas e 30,8% de carboidratos, em base seca (COSTA et al., 1974, apud VIEIRA et al., 1999).

A soja convencional é produzida pela maneira tradicional, bastante difundida em todo o mundo, com a utilização de técnicas adequadas de plantio e adubos químicos e defensivos agrícolas. O cultivo de soja orgânica é realizado sem a presença de adubos químicos e defensivos (herbicidas, fungicidas e inseticidas), e o produto final, além de proporcionar benefícios e não agredir o meio ambiente, ainda

possui valor agregado mais alto do que o cultivo tradicional. No cultivo transgênico, a soja é modificada geneticamente em estudos laboratoriais com a finalidade de obter um produto com características novas ou melhoradas em relação ao produto original, como maior produtividade, melhor resistência a pragas e doenças etc. Assim, a soja é uma matéria-prima de custo acessível e apresenta em sua composição importantes elementos bioquímicos (proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, isoflavonoides etc.) que constituem excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos utilizados em processos de Fermentação em Estado Sólido.

Este processo apresenta grande capacidade de produção de enzimas, tornando-se importante pelo fato de se poder utilizar o sólido fermentado bruto como fonte direta para a obtenção das mesmas (PANDEY, 2003). Diversas aplicações para as enzimas hidrolíticas são encontradas na indústria de alimentos, produção de detergentes, na indústria farmacêutica, de cosméticos, no tratamento de couros, na obtenção de biocombustíveis, entre outras.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o potencial de uso das sojas convencional, orgânica e transgênica na produção das enzimas amilase, protease, lipase e celulase por FES usando o fungo *A. niger*.

## Material e métodos

### Microrganismo e substratos

O microrganismo utilizado foi o fungo *A. niger*, cedido pelo Laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Foram preparados repiques em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) esterilizado e mantidos em refrigeração. No preparo do inóculo, foram utilizados 700 mL de meio BDA inclinado, com o fungo mantido em estufa bacteriológica a 30°C por sete dias. Realizou-se a retirada dos esporos com Tween 80 (0,01%) e filtragem da suspensão em algodão para retirada do micélio vegetativo. Foi determinada a concentração de esporos em suspensão por meio de microscópio óptico em Câmara de Neubauer. Os substratos utilizados foram a soja convencional, a transgênica e a orgânica doadas por uma empresa da região de Toledo, Estado do Paraná. Os grãos foram fragmentados e classificados em diferentes tamanhos de partícula (1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm), sendo determinados os teores de umidade para a condução das fermentações.

### Fermentação em estado sólido e extração das enzimas

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL em estufa bacteriológica a 30°C. No estudo das curvas de crescimento do *A. niger*, a umidade inicial do meio sólido foi de 50%. Os substratos esterilizados foram inoculados com suspensão de esporos e os valores de pHs corrigidos com solução-tampão. Para pH's 3,0 e 3,9 foi utilizado o tampão acetato 0,05 M, para pH's 6,0 e 8,1 foi utilizado o tampão fosfato de sódio 0,2 M e para pH 9,0 foi utilizado o tampão ácido bórico-Borax (DEUTSCHER et al., 1990). Os nutrientes foram adicionados conforme o meio ágar-Czapeck modificado por Yunginger et al. (1980). Após a fermentação, foi realizada a extração das enzimas, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 na proporção sólido:líquido 1:17 a 35°C durante 2h em incubadora orbital a 130 rpm. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 10.000 g para a remoção dos sólidos suspensos e, posteriormente, acondicionado a -20°C.

### Métodos analíticos

A determinação da concentração de gorduras no material sólido foi baseado no método citado por Silva e Queiroz (2002). Para determinação das proteínas presentes nas amostras sólidas utilizou-se o método de Kjeldahl (AOAC, 1984), que se baseia na quantificação do nitrogênio total presente na amostra sólida. O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico (AOAC, 1995). A determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foi adaptada do método de Miller (1959), que utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A determinação da atividade enzimática da amilase foi realizada segundo a metodologia descrita por Pandey (1992). Uma unidade de atividade amilolítica (U) foi definida como a quantidade de micromols de açúcares redutores liberados por min por g de massa seca pela enzima, nas condições de ensaio descritas, ( $U = \mu\text{mol AR min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). A atividade enzimática da protease foi realizada segundo adaptação do método descrito por Germano et al. (2003), utilizando solução de BSA (Bovine Serum Albumine) como substrato para a enzima, e uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma variação na medida de absorvidade (em relação ao branco) nas condições da análise, para 20 min. de incubação por g de massa seca da amostra sólida,  $U = \text{Abs min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Na determinação da atividade enzimática da lipase, a metodologia utilizada foi adaptada de Freire et al.

(1997a e b), citados por Gombert et al. (1999). Uma unidade da atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 micromol de ácidos graxos equivalentes por min por g de massa seca da amostra sólida ( $U = \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). Para todas as enzimas estudadas, a atividade enzimática específica foi determinada pelo quociente entre a AE e a quantidade de proteína presente no sólido fermentado.

#### Análise estatística

Utilizou-se o programa computacional STATISTICA™ (v. 8.0, StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos à Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 5%. O planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional) e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimizar as condições da FES e fornecer um modelo matemático adequado para a atividade enzimática (AE) e atividade enzimática específica ( $AE_{\text{esp}}$ ) do processo.

### Resultados e discussão

#### Caracterização das sojas

Foi realizada a caracterização dos três tipos de soja quanto aos teores de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), proteínas, gorduras e atividades de amilase e protease, em diferentes tamanhos de partícula. Com relação ao conteúdo de AR, observou-se o maior valor para soja orgânica ( $0,75 \text{ mg glicose mL}^{-1}$ ) para a fração de tamanho de partícula 0,6 mm. Nesta mesma fração granulométrica, as sojas transgênica e convencional apresentaram valores inferiores (aproximadamente  $0,5 \text{ mg glicose mL}^{-1}$ ). Para o conteúdo de ART, a soja orgânica apresentou  $3,2 \text{ mg glicose mL}^{-1}$  na fração de 0,6 mm, sendo que, para o mesmo tamanho de partícula, a soja transgênica apresentou valor semelhante e a soja convencional atingiu menor teor ( $0,25 \text{ mg glicose mL}^{-1}$ ). O maior valor de ART ( $3,75 \text{ mg glicose mL}^{-1}$ ) foi observado para a soja convencional com 1,4 mm. Com relação aos teores de proteína, na fração de 0,6 mm observou-se o maior valor para a soja convencional (43%), enquanto que as sojas transgênica e orgânica atingiram valores inferiores a 40%. Com relação à quantidade de gordura, na fração de 0,6 mm o maior valor foi obtido para a soja transgênica (26%). Na determinação da atividade amilolítica, notou-se que para os três tipos de soja, houve um nível mais elevado de atividade na fração que contém partículas de 0,6 mm. Para a atividade da protease, verificou-se

que as sojas orgânica e convencional apresentaram valores reduzidos para a fração de 0,3 mm e valores mais altos para a fração correspondente a 1,0 mm de tamanho de partícula. Este resultado pode ser justificado pela maior quantidade de material proteico presente nas camadas intermediárias e externas do grão de soja, que estão contidas nas maiores frações granulométricas, de acordo com Moraes e Silva (1996).

#### Curvas de crescimento do *A. niger*

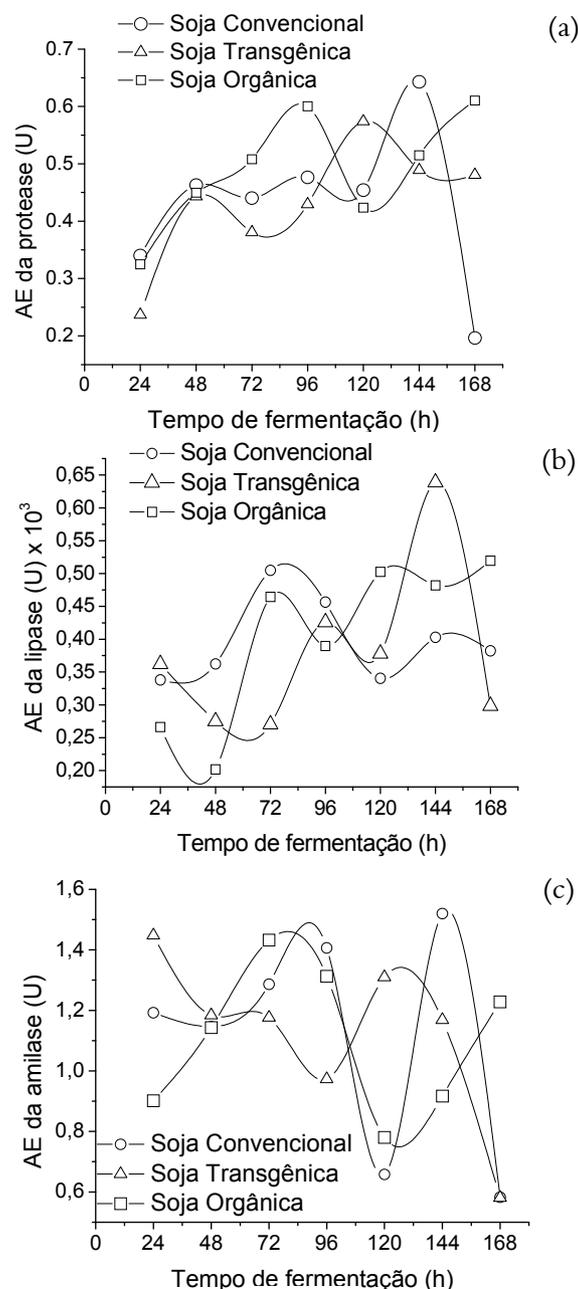
Foi avaliada a produção da enzima protease pelo fungo, considerando o tamanho de partícula de 0,6 mm do substrato, fração que apresentou maior teor de proteína na caracterização das sojas. O gráfico da Figura 1(a) apresenta as curvas de atividade de protease, para os três tipos de soja. Os valores mais altos foram obtidos nos tempos de 96 e 168h de fermentação para a soja orgânica, 120h para a soja transgênica e 144h para a soja convencional. Os melhores resultados de produtividade do processo foram:  $0,375 \text{ U h}^{-1}$  para a soja orgânica no tempo de 96h,  $0,283 \text{ U h}^{-1}$  para a soja transgênica no tempo de 120h. A soja convencional apresentou produtividade de  $0,264 \text{ U h}^{-1}$  para 144h, observando-se também a maior atividade enzimática (aproximadamente  $0,642 \text{ U}$ ). Menezes et al. (2006) observaram atividade enzimática da protease de  $5,78 \text{ U mL}^{-1}$ , utilizando como substratos resíduo de maracujá (33,25%) e farelo de trigo (66,75%), com umidade de 62,5%, após 64h de fermentação, o que corresponde a  $0,09 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , na produção de poligalacturonase por FES por meio do fungo *A. niger*. Coelho et al. (2001), na produção de enzimas a partir da casca de coco verde por FES com *A. niger*, obtiveram produtividade máxima de protease de  $26 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  para um tamanho de partícula do substrato de 0,59 mm.

Nas curvas de atividade enzimática da lipase (Figura 1(b)), notou-se que, para a soja convencional, a máxima atividade da lipase foi obtida em torno de 72h. Para a soja orgânica obtiveram-se os resultados mais altos entre 120 e 168h e para a soja transgênica o pico de atividade foi obtido em 144h. Observou-se a inexistência de um padrão de comportamento cinético para os diferentes tipos de sojas, o que poderia sugerir eventual diferença nas rotas metabólicas seguidas pelo fungo, em função do tipo de soja usado. Com base nos valores de produtividade para o processo, obteve-se melhor resultado para a soja convencional no tempo de 72h com produtividade de  $0,0069 \cdot 10^{-3} \text{ U h}^{-1}$ , seguido da soja orgânica ( $0,00625 \cdot 10^{-3} \text{ U h}^{-1}$ ) e da soja transgênica no tempo de 144h com produtividade de  $0,0045 \cdot 10^{-3} \text{ U h}^{-1}$ . Vargas et al. (2004), na produção de lipase por *Penicillium simplicissimum*, utilizando

torta de soja como substrato, obteve produtividade de  $0,375 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , em ensaios realizados em béqueres, com parâmetros operacionais ótimos ( $27,5^\circ\text{C}$  e 55% de umidade). O autor observou que a umidade e a temperatura foram os principais fatores na obtenção da enzima. De maneira semelhante, Kempka et al. (2008), na produção e caracterização da lipase por FES com *Penicillium verrucosum*, utilizando farelo de soja como substrato, obtiveram uma atividade enzimática de  $40 \text{ U g}^{-1}$  em 48h de fermentação e  $52 \text{ U g}^{-1}$  em 72h de fermentação, em condições ótimas de operação de  $27,5^\circ\text{C}$  e 55% de umidade inicial do substrato. A máxima produtividade foi alcançada com  $0,74 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Os autores afirmam que os diferentes indutores usados para a produção da enzima não afetaram o processo, que foi influenciado pela temperatura e umidade inicial do meio. Comparativamente aos valores encontrados pelos autores mencionados, os quais utilizaram torta e farelo de soja, os valores obtidos neste trabalho podem indicar que o fungo da espécie *Aspergillus* não apresenta características favoráveis à produção de enzimas lipolíticas a partir da soja ou seu resíduo. Uma alternativa a este processo seria a utilização de meios com composição conhecida, capazes de induzir o microrganismo a produzir este complexo enzimático.

Para a atividade enzimática da amilase (Figura 1(c)), observou-se a maior AE para as sojas orgânica e convencional após 96h de fermentação (aproximadamente  $1,5 \text{ U}$ ). Um valor de atividade semelhante foi observado para a soja convencional com 144h de fermentação. No entanto, como os valores de atividade são semelhantes, em termos de rendimento o melhor tempo de fermentação é 96h. Kunamneni et al. (2005) obtiveram uma atividade enzimática de  $534 \text{ U g}^{-1}$  de farelo de trigo, na produção de amilase por FES, utilizando o fungo *Thermomyces lanuginosus*, após um período de 120h de fermentação, com 90% de umidade inicial a  $50^\circ\text{C}$ . Verificaram que a produção de amilase duplicou com a adição no meio fermentativo de 1% de amido solúvel ( $\text{m m}^{-1}$ ) e 1% de peptona ( $\text{m m}^{-1}$ ). Anto et al. (2006) observaram máxima produção da enzima de  $271,2 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando farelo de trigo como substrato, com pH e temperatura ótimos de 5,0 e  $55^\circ\text{C}$ , respectivamente, por FES pelo fungo *Aspergillus* sp., e notaram aumento da produção da enzima pela adição de nitrogênio orgânico (extrato de levedura e peptona,  $0,02 \text{ U g}^{-1}$ ). Os resultados obtidos neste estudo e comparados aos dos autores mencionados sugerem que uma otimização do meio fermentativo pela adição de fonte de nutrientes à soja seria indicada para melhor produção da amilase fúngica. Notou-se que, para cada tipo de soja, uma produção simultânea das enzimas amilase, lipase e protease pelo fungo denotava comportamentos diferentes para cada enzima nos diferentes tempos de fermentação.

Para a produção de lipases, a soja não seria um substrato ideal, pelo fato dela apresentar polissacarídeos e proteínas em altas quantidades em sua composição, em relação à quantidade de lipídeos, fato que foi comprovado pelo baixo valor de produção de lipases.



**Figura 1.** Perfis temporais de atividade enzimática da protease (a), lipase (b) e amilase (c) obtidas por FES das sojas convencional, transgênica e orgânica com *A. niger*.

#### Avaliação dos parâmetros operacionais da FES com *A. niger*

Foram realizadas fermentações com base nos melhores resultados obtidos para a enzima protease, estabelecidos anteriormente, devido à característica

protéica do substrato. O planejamento fatorial completo  $2^3$  foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: umidade inicial do meio (U), tamanho de partícula do substrato (dp) e concentração inicial do inóculo ( $C_0$ ). O tipo de soja utilizado (convencional) e o tempo de fermentação (144h) foram os parâmetros fixos deste planejamento, assim como a temperatura ótima de crescimento do fungo (30°C). Na Tabela 1 estão apresentadas as especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento nas suas formas codificadas (-1, 0, +1) e reais (entre parênteses) bem como os resultados obtidos para atividade enzimática específica ( $AE_{esp}$ ). Observa-se que os melhores resultados foram obtidos no ponto central do experimento (nível 0).

**Tabela 1.** Matriz do planejamento completo  $2^3$  com os resultados de  $AE_{esp}$ .

Ensaio	U (%)	dp (mm)	$C_0$ (esp gms <sup>-1</sup> )	$AE_{esp}$ (U g prot. <sup>-1</sup> )
1	-1 (35)	-1 (0,3)	-1 (5.10 <sup>4</sup> )	7,536
2	+1 (65)	-1 (0,3)	-1 (5.10 <sup>4</sup> )	1,250
3	-1 (35)	+1 (1,0)	-1 (5.10 <sup>4</sup> )	4,994
4	+1 (65)	+1 (1,0)	-1 (5.10 <sup>4</sup> )	-
5	-1 (35)	-1 (0,3)	+1 (4.10 <sup>6</sup> )	10,524
6	+1 (65)	-1 (0,3)	+1 (4.10 <sup>6</sup> )	-
7	-1 (35)	+1 (1,0)	+1 (4.10 <sup>6</sup> )	14,383
8	+1 (65)	+1 (1,0)	+1 (4.10 <sup>6</sup> )	8,603
9	0 (50)	0 (0,6)	0 (5,25.10 <sup>5</sup> )	17,585
10	0 (50)	0 (0,6)	0 (5,25.10 <sup>5</sup> )	15,348
11	0 (50)	0 (0,6)	0 (5,25.10 <sup>5</sup> )	15,858
12	0 (50)	0 (0,6)	0 (5,25.10 <sup>5</sup> )	19,168

Os ensaios 4 e 6 não puderam ser analisados, pelo aspecto leitoso (turvo) do extrato enzimático, com sólidos suspensos. Desta forma, as etapas de filtração e centrifugação do extrato enzimático não puderam ser realizadas com eficiência, já que o extrato obtido não pode ser clarificado, impedindo a aplicação do método colorimétrico para medida de atividade. Assim, fez-se a análise estatística do experimento usando a matriz do planejamento experimental, porém excluindo os ensaios 4 e 6 no programa STATISTICA. Os ensaios 9, 10, 11 e 12 são replicatas realizadas do ponto central (nível 0), com o intuito de verificar a reprodutibilidade e o erro experimental.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis e demais cálculos estatísticos para o planejamento estão apresentadas na Tabela 2, para a  $AE_{esp}$ . Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Nota-se que a umidade (U), a concentração inicial do inóculo ( $C_0$ ), a interação entre dp e  $C_0$ , bem como a interação

entre as três variáveis avaliadas foram significativas no intervalo de confiança de 95%. Observa-se que U e  $C_0$  têm influência positiva na resposta, ou seja, aumentando estas variáveis, verifica-se aumento no valor de  $AE_{esp}$ . Já, para as interações  $dp \times C_0$  e  $U \times dp \times C_0$ , observa-se influência negativa sobre o valor de  $AE_{esp}$  indicando que não há sinergismo entre as variáveis.

**Tabela 2.** Estimativa dos efeitos para  $AE_{esp}$  da protease no planejamento completo  $2^3$ .

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

$R^2 = 0,970$  (coeficiente de determinação do modelo).

Por meio da análise de variância para o planejamento (Tabela 3), resultados para o teste F foram gerados (BARROS NETO et al., 2007). O valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade é:  $F(6;3;0,05) = 8,94$ ; e como  $F_{calc} > F_{tab}$ , o modelo linear proposto pelo tipo de planejamento usado é válido. Pode-se, então, descrever empiricamente o modelo matemático de  $AE_{esp}$  em função das variáveis significativas (Equação 1).

**Tabela 3.** Análise de variância obtida para o planejamento completo  $2^3$  para  $AE_{esp}$ .

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{calc}$
Regressão	301,30	6	50,22	16,60
Resíduos	9,08	3	3,03	
Total	310,38	9		

$$AE_{esp} = 16,9898 + 7,6305 \cdot U + 3,0943 \cdot C_0 - 9,0468 \cdot dp \cdot C_0 - 10,6470 \cdot U \cdot dp \cdot C_0 \quad (1)$$

em que:

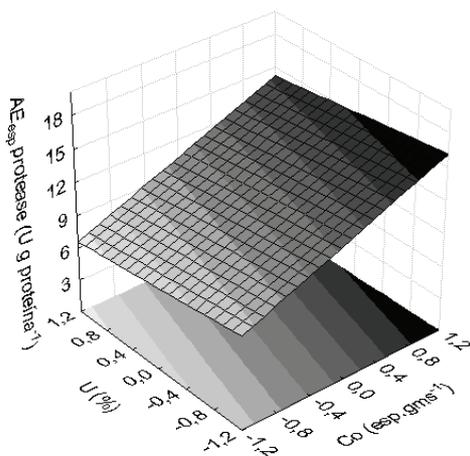
$AE_{esp}$  é a atividade enzimática específica (U g de proteína<sup>-1</sup>)

U é a umidade inicial do meio (%)

dp é o tamanho de partícula do substrato (mm)

$C_0$  é a concentração inicial de inóculo (esporos g<sup>-1</sup>)

A superfície de resposta obtida para o modelo linear é apresentada no gráfico da Figura 2. Como mencionado anteriormente, para a obtenção de valores mais elevados de  $AE_{esp}$ , deve-se conduzir os experimentos na direção dos maiores valores de umidade e concentração inicial de inóculo.



**Figura 2.** Superfície de resposta para  $AE_{esp}$  da protease em função de  $C_0$  e  $U$ .

Han et al. (2003), analisando os efeitos da temperatura e umidade relativa no crescimento e produção de enzimas por *Actinomucor elegans* e *Rhizopus oligosporus* na preparação de queijo de soja, observaram produção de protease de  $108 \text{ U g}^{-1}$  de substrato após 48h de incubação e  $25^\circ\text{C}$ , com umidade relativa entre 95-97%, para *Actinomucor elegans*. Para *Rhizopus oligosporus*, os autores observaram produção de  $104 \text{ U g}^{-1}$  de substrato após 48h de incubação e  $35^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de 95-97%. Concluíram que *Rhizopus oligosporus* era uma boa alternativa ao *Actinomucor elegans* para a produção de queijo de soja em estações climáticas com temperaturas elevadas. Agrawal et al. (2004) obtiveram máxima atividade da protease ( $8500 \text{ U g}^{-1}$ ) em pH 9,0 a  $45^\circ\text{C}$ , na produção de protease alcalina por *Penicillium* sp. por FES e utilizando farelo de soja. Comparando aos resultados dos autores citados anteriormente, os resultados obtidos neste presente trabalho são inferiores, indicando que, além da umidade e concentração inicial de inóculo, a espécie do microrganismo utilizado e o pH do meio podem exercer influência significativa na produção da protease. De acordo com os melhores resultados apresentados na avaliação dos parâmetros da FES, na sequência do estudo foram utilizados como parâmetros fixos a umidade ( $U$ ) de 50% e o valor mais alto para  $C_0$  ( $4.10^6$  esporos  $\text{g}^{-1}$ ), com o intuito de otimizar as variáveis do processo fermentativo. O valor mais alto de  $AE_{esp}$  foi  $19,168 \text{ U g proteína}^{-1}$  (ensaio 12).

#### Otimização dos parâmetros operacionais da FES para a protease com *A. niger*

Com o intuito de determinar as melhores condições para a produção de protease, utilizou-se um planejamento experimental do tipo DCCR

(delineamento composto central rotacional), com duas variáveis: tamanho de partícula do substrato ( $dp$ ) e pH da solução nutriente ( $pH$ ), utilizando soluções-tampão com diferentes valores de  $pH$  para o preparo das soluções nutrientes. Este planejamento permite, por meio da análise de regressão dos pontos experimentais, gerar modelos quadráticos, resultando em superfícies de resposta curvas (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Os demais parâmetros operacionais foram mantidos fixos para a FES com soja convencional: concentração inicial de inóculo de  $4.10^6$  esporos  $\text{g}^{-1}$ , tempo de fermentação de 144h, umidade do meio fermentativo de 50% e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . A Tabela 4 apresenta o DCCR, em que os níveis (-1,414) e (+1,41) permitem gerar os termos quadráticos na equação do modelo.

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referente à  $AE_{esp}$  é apresentada na Tabela 5, em que (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Assim, nota-se que nenhuma variável avaliada foi significativa para  $AE_{esp}$ .

**Tabela 4.** Matriz do planejamento DCCR com os resultados de  $AE_{esp}$ .

Ensaio	$dp$ (mm)	$pH$	$AE_{esp}$ ( $\text{U g prot.}^{-1}$ )
1	-1 (0,4)	-1 (3,9)	17,155
2	1 (0,9)	-1 (3,9)	14,778
3	-1 (0,4)	1 (8,1)	15,946
4	1 (0,9)	1 (8,1)	19,795
5	0 (0,6)	0 (6,0)	20,457
6	0 (0,6)	0 (6,0)	17,919
7	0 (0,6)	0 (6,0)	17,454
8	0 (0,6)	1,414 (9,0)	15,385
9	0 (0,6)	-1,414 (3,0)	21,400
10	1,414 (1,0)	0 (6,0)	14,008
11	-1,414 (0,3)	0 (6,0)	15,533

**Tabela 5.** Estimativa dos efeitos para  $AE_{esp}$  da protease para o planejamento DCCR.

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

$R^2 = 0,560$  (coeficiente de determinação do modelo).

A análise de variância para o planejamento obtida para  $AE_{esp}$  está apresentada na Tabela 6. Para um intervalo de confiança de 95%, tem-se o valor tabelado de  $F$ , com os respectivos graus de liberdade:  $F_{tab}(5;5;0,05) = 5,05$ . Assim, sendo  $F_{calc} < F_{tab}$ , o modelo linear proposto não é válido para prever o comportamento do processo. Entretanto, a

superfície de resposta para  $AE_{esp}$  da protease pode ser usada no sentido de verificar a direção a ser tomada nos próximos planejamentos, visando à modelagem mais precisa para a otimização dos parâmetros.

**Tabela 6.** Análise de variância obtida para o planejamento DCCR para  $AE_{esp}$ .

Fonte de variação	Soma Quadrática	Gráus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{calc}$
Regressão	33,17	5	6,64	1,27
Resíduos	26,06	5	5,21	
Total	59,23	10		

Como observado nos resultados de  $AE_{esp}$  do planejamento e nos valores negativos dos efeitos das variáveis, melhores resultados podem ser obtidos para valores mais baixos de pH e valores intermediários de dp. Assim, planejamentos experimentais subsequentes podem ser conduzidos com diferentes faixas de estudo das variáveis, objetivando maior precisão dos parâmetros a serem otimizados. A matriz de dados (Tabela 4) indica, para o melhor resultado de  $AE_{esp}$  (21,40 U g de proteína<sup>-1</sup>), que o pH 3,0 e dp 0,6 mm foram os melhores parâmetros de processo para este planejamento, juntamente com o uso da soja convencional, U 50%,  $C_0$  4.10<sup>6</sup> esporos g<sup>-1</sup>, 144h de fermentação a 30°C.

Li et al. (2008) obtiveram uma AE de protease de, aproximadamente, 30 U mL<sup>-1</sup>, em pH ácido a 45°C, no estudo da protease extracelular por *A. niger* B1-D recombinante. Os autores observaram aumento significativo na atividade da enzima em temperaturas elevadas (em torno de 45°C), ao passo que, na produção de protease extracelular por *A. niger* AB100 mutante, Basu et al. (2008) notaram máxima produção de protease de 2,776  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ , utilizando farelo de soja como substrato, com pH e temperatura ótimos de 7,0 e 30°C, respectivamente. Concluíram que a atividade máxima da enzima foi encontrada quando o meio fermentativo foi enriquecido com 5% de glicose ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 2,5% de ureia ( $\text{m v}^{-1}$ ). Observando os resultados obtidos da fermentação com soja e os resultados dos autores anteriormente citados, nota-se que este substrato pode ser considerado viável para a produção de protease, utilizando o fungo *A. niger*, sendo que os parâmetros de otimização no processo fermentativo, neste caso, indicaram maior produção de complexos enzimáticos em pH ácido.

## Conclusão

As curvas de crescimento impossibilitaram a determinação do comportamento cinético das

enzimas, sugerindo uma discrepância nas rotas metabólicas seguidas pelo fungo. A avaliação e otimização da fermentação foram conduzidas com relação à protease. O melhor substrato foi a soja convencional com 144h de fermentação, umidade de 50%,  $C_0$  de 4.10<sup>6</sup> esporos g<sup>-1</sup> e dp de 0,6 mm. Na otimização dos parâmetros de fermentação, dp e pH não influenciaram significativamente o processo. Os valores negativos dos efeitos indicaram que melhores resultados podem ser obtidos em pH 3,0 e dp de 0,6 mm, onde observou-se o melhor resultado de  $AE_{esp}$  (21,40 U g proteína<sup>-1</sup>).

## Agradecimentos

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

## Referências

- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BARNEJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 977-981, 2004.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1161-1166, 2006.
- AOAC-Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis**. 12th ed. Washington, D.C.: AOAC, 1984.
- AOAC-Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, D.C.: AOAC, 1995.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Unicamp, 2007.
- BASU, B. R.; BANIK, A. K.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB<sub>100</sub> grown on fish scale. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 449-455, 2008.
- COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. P. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.
- DEUTSCHER, M. P.; SIMON, M. I.; ABELSON, J. N. Guide to protein purification. In: STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. (Ed.). **Buffers: principles and practice**. San Diego: Academic Press, Inc., 1990. p. 24-38, Cap. IV.
- FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. **Journal of the Brazilian Society of Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1997a.

- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, n. 1, p. 409-421, 1997b.
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.
- GOMBERT, A.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 85-90, 1999.
- HAN, B.-Z.; MA, Y.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT, M. J. R. **Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 27-34, 2003.
- KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.
- KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005.
- LI, Q.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 333-341, 2008.
- MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista Universidade Rural**, v. 25, n. 1, p. 15-27, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: suas aplicações**. São Paulo: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996.
- PANDEY, A. Production of starch saccharifying enzyme in solid culture. **Starch-Stärke**, v. 44, n. 2, p. 75-77, 1992.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 2002.
- VARGAS, L. H. M.; PIÃO, A. C. S.; DOMINGOS, R. N.; CARMONA, E. C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 137-142, 2004.
- VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 1277-1283, 1999.
- YUNGINGER, J. W.; JONES, R. T.; NEIHEM, M. E.; GELLER, M. Studies on *Alternaria allergens* III. Isolation of a major allergenic fraction (Alt-1). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 2, p. 138-147, 1980.

Received on February 20, 2010.

Accepted on January 26, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.