

## **AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS OPERACIONAIS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO FUNGO *Aspergillus niger* sp EM SOJA BRUTA.**

Fabiano Bisinella Scheufele, Ademir Teixeira Júnior, Leandro Daniel De Paris, Lexandra Novaki, Salah Din Mahmud Hasan (Orientador/UNIOESTE),  
e-mail: fabianoscheufele@gmail.com

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Toledo – PR.

**Palavras-chave:** fermentação em estado sólido, soja, protease.

### **Resumo:**

Dado o potencial regional do Oeste do Paraná para a produção de soja convencional, e também a ampla disponibilidade de componentes bioquímicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, lecitina, dentre outros, presentes no grão, torna-se 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), pode ser uma alternativa 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 avaliar e otimizar parâmetros operacionais do processo de FES para a produção da enzima protease, utilizando a soja convencional como substrato e o fungo *A. niger*. Foi realizada a seleção das melhores condições de produção da enzima (tipo de soja, umidade do meio fermentativo, pH, concentração inicial de inóculo, diâmetro de partícula do substrato e tempo de fermentação) utilizando planejamento fatorial. Pode-se observar que a soja convencional com umidade de 50%, tempo de fermentação de 144h, concentração inicial do inóculo de  $4 \cdot 10^6$  esporos/gms e diâmetro de partícula de 0,6 mm foram as melhores condições para a produção da enzima protease. No estudo da variação do pH inicial do meio fermentativo, onde foram avaliadas as enzimas protease, amilase, lipase e celulase, constataram-se atividades enzimáticas em diferentes níveis, sendo as maiores atividades obtidas em meio alcalino (pH 9,0).

### **Introdução**

A soja convencional é produzida pela maneira tradicional, bastante difundida em todo o mundo, com a utilização de técnicas adequadas ao plantio e adubos químicos e defensivos agrícolas. Possui composição quase completa, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e muitos minerais. Seu valor calórico é alto, com a vantagem deste não resultar de uma grande quantidade de amido; entretanto, é deficiente em vitaminas, e suas fibras estão contidas quase totalmente na casca. As frações de proteína e óleo da

soja compreendem aproximadamente 60% do total do peso seco da semente. 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, citados por VIEIRA *et al.*, 1999). Apresenta também em sua constituição, diversos tipos de enzimas que influenciam a germinação da semente e seu crescimento. Algumas destas enzimas são as lipoxigenases, hidroperóxido liase, peroxigenase, hidroperóxido redutase, amilase, protease, tripsina, etc. (SILVA, 2004).

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ele está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Del Bianchi *et al.*, 2001, citados por LIMA *et al.*, 2001). Entre as vantagens da FES, podem ser citadas algumas: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais, simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma. Por outro lado, as desvantagens são: uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, escassez de dados e de projeto para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, e produtos formados (PANDEY, 1991).

De acordo com Pandey (1992), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (*Polysporus*). Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um bom crescimento em concentrações elevadas de açúcar e sal, portanto em muitos alimentos com baixo teor de atividade de água. Os conídios desse gênero de fungo possuem uma coloração esverdeada e seus ascósporos se encontram dentro de ascas cujos peritécios têm cor que varia de amarelo a avermelhado (FARZIER & WESTHOFF, 1993).

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto (WHITAKER, 1994). Scheuer, (1990) e Ikasari, (1996) citam que a protease constitui um dos grupos mais importantes comercialmente de enzimas microbianas extracelulares, sendo amplamente usada em diversos setores industriais, particularmente na indústria alimentícia, farmacêutica, de detergentes, produtos químicos, couro e seda, além da panificação, laticínios, destilação, cervejas, processamento industrial de proteínas, sínteses orgânicas, dentre outras.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar e otimizar parâmetros operacionais do processo de FES para a produção da enzima

protease, utilizando a soja convencional como substrato e o fungo *A. niger*, por meio de planejamento fatorial.

## **Materiais e Métodos**

### *Material*

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *A. niger*, cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel. O substrato utilizado foi a soja convencional bruta, doado à UNIOESTE-Toledo pelas empresas COODETEC e SADIA.

### *Preparo do inóculo e substratos*

Utilizou-se o meio de cultura PDA (potato dextrose ágar) para o crescimento do microrganismo, que foi inoculado e mantido por 7 dias em estufa bacteriológica, a 30°C. Realizou-se a raspagem dos esporos e a solução foi filtrada em funil de vidro com algodão para retirada de micélio vegetativo. Em seguida, determinou-se o número e esporos em suspensão na solução, utilizando microscópio óptico com aumento de 400x e Câmara de Neubauer. A soja (grão) foi fragmentada e classificada em diferentes tamanhos de partícula usando peneiras Tyler de 12, 16, 28 e 48 MESH, que correspondem a 1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm, respectivamente. Após, determinou-se o teor umidade do substrato.

### *Fermentação em estado sólido (FES)*

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL, onde foi adicionado o substrato e, em seguida, esterilizado. Após, foram adicionadas a solução de esporos, a solução-tampão e os nutrientes, de acordo com as quantidades especificadas em cada experimento. Os frascos foram acondicionados em estufa bacteriológica, sendo o tempo de fermentação estimado de acordo com cada experimento, a 30°C. Todas as soluções-tampão utilizadas no estudo foram preparados conforme Deutscher *et al.* (1990). As quantidades de nutrientes utilizados para o preparo das soluções foram baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para um volume final de líquido (solução-tampão) de 500 mL. Para a análise do sólido fermentado, foi feita a extração dos seus componentes, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão), à 35°C e 130 rpm, durante 2h em incubadora tipo *shaker*. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 2500 rpm, para remoção dos sólidos suspensos.

### *Métodos analíticos*

Para determinação das proteínas presentes nas amostras sólidas utilizou-se o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984). O método de

determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) usado neste trabalho foi adaptado do método proposto por Miller (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A determinação da atividade enzimática da protease foi realizada segundo adaptação do método descrito por Germano *et al.*, (2003). O teor umidade foi determinado por método gravimétrico (A.O.A.C., 1995).

### *Estudo da otimização*

Realizou-se estudo da otimização da FES através de planejamentos estatísticos experimentais, onde foi usado o programa computacional STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos a Análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições da FES e fornecer um modelo matemático adequado para a AE e AE<sub>esp</sub> do processo.

## **Resultados e Discussão**

### *Avaliação dos parâmetros operacionais da FES com Aspergillus niger*

Um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste estudo: umidade inicial do meio (U), diâmetro de partícula do substrato (dp) e concentração inicial do inóculo (C<sub>0</sub>). O tipo de soja utilizado (convencional) e o tempo de fermentação (144h) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da temperatura ótima de crescimento do fungo, de 30°C. Na tabela 1 são apresentadas as especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento. A tabela 2 apresenta matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (AE) e atividade enzimática específica (AE<sub>esp</sub>) após o processo fermentativo.

**Tabela 1 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento**

| Variável                                                        | Níveis            |                      |                   |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
|                                                                 | -1                | 0                    | +1                |
| Umidade inicial do meio (U) (%)                                 | 35                | 50                   | 65                |
| Diâmetro de partícula do substrato (dp) (mm)                    | 0,3               | 0,6                  | 1,0               |
| Concentração inicial do inóculo (C <sub>0</sub> ) (esporos/gms) | 5.10 <sup>4</sup> | 5,25.10 <sup>5</sup> | 4.10 <sup>6</sup> |

Observa-se na tabela 2 que os melhores resultados foram obtidos no ponto central (0,0,0), que corresponde a 50% de umidade, diâmetro de partícula de 0,6 mm e 5,25.10<sup>5</sup> esporos/gms. Os ensaios 9, 10, 11 e 12 são replicatas realizadas no ponto central do experimento, com intuito de verificar a reprodutibilidade e o erro experimental.

**Tabela 2 - Matriz do planejamento**

| Ensaio | U | dp | C <sub>0</sub> | AE (U) | AE <sub>esp</sub> (U/g proteína) |
|--------|---|----|----------------|--------|----------------------------------|
|--------|---|----|----------------|--------|----------------------------------|

|    |    |    |    |        |        |
|----|----|----|----|--------|--------|
| 1  | -1 | -1 | -1 | 4,437  | 7,536  |
| 2  | 1  | -1 | -1 | 0,691  | 1,250  |
| 3  | -1 | 1  | -1 | 2,637  | 4,994  |
| 4  | 1  | 1  | -1 | -      | -      |
| 5  | -1 | -1 | 1  | 6,815  | 10,524 |
| 6  | 1  | -1 | 1  | -      | -      |
| 7  | -1 | 1  | 1  | 6,666  | 14,383 |
| 8  | 1  | 1  | 1  | 5,435  | 8,603  |
| 9  | 0  | 0  | 0  | 10,811 | 17,585 |
| 10 | 0  | 0  | 0  | 9,903  | 15,348 |
| 11 | 0  | 0  | 0  | 10,877 | 15,858 |
| 12 | 0  | 0  | 0  | 9,485  | 19,168 |

Os ensaios 4 e 6 não puderam ser analisados, devido ao aspecto leitoso (turvo) do extrato enzimático, com sólidos suspensos. Assim, fez-se a análise estatística do experimento usando a matriz do planejamento acima, porém excluindo os ensaios 4 e 6.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento são apresentadas nas tabelas 3 e 4 para AE e AE<sub>esp</sub>. Os valores destacados em negrito e *italico* 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 diâmetro de partícula e concentração inicial do inóculo, bem como a interação entre todas as variáveis avaliadas no experimento foram significativas no intervalo de confiança de 95% para ambos os casos.

Observa-se que U e  $C_0$  têm influência positiva na resposta; aumentando estas variáveis haverá um aumento no valor da AE e AE<sub>esp</sub>. Já para  $dp \times C_0$  e  $U \times dp \times C_0$ , observa-se uma influência negativa; se os valores de  $dp$ ,  $C_0$  e U aumentarem simultaneamente, haverá uma diminuição no valor da resposta desejada.

**Tabela 3 - Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento**

| Variável                                   | Efeito          | Erro padrão   | p-valor         | Coefficiente   |
|--------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|----------------|
| <b>Intercepto</b>                          | <b>10,2690</b>  | <b>0,3430</b> | <b>0,000082</b> | <b>10,2690</b> |
| <b>U</b>                                   | <b>10,2607</b>  | <b>0,9702</b> | <b>0,001806</b> | <b>5,1303</b>  |
| dp                                         | 0,2828          | 0,6860        | 0,707872        | 0,1414         |
| <b><math>C_0</math></b>                    | <b>3,2037</b>   | <b>0,6860</b> | <b>0,018543</b> | <b>1,6018</b>  |
| U x dp                                     | 1,2575          | 0,6860        | 0,164190        | 0,6287         |
| <b><math>Dp \times C_0</math></b>          | <b>-11,9235</b> | <b>0,9702</b> | <b>0,001160</b> | <b>-5,9617</b> |
| <b><math>U \times dp \times C_0</math></b> | <b>-12,7492</b> | <b>0,9702</b> | <b>0,000952</b> | <b>-6,3746</b> |

$R^2 = 0,987$  ;  $R = 0,993$

A análise de variância para o planejamento é apresentada na tabela 5. Segundo BARROS NETO *et al.* (2007), o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade, para AE e AE<sub>esp</sub> é:  $F(6;3;0,05) = 8,94$ .

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos para  $AE_{esp}$  da protease para o planejamento

| Variável                                   | Efeito          | Erro padrão     | p-valor         | Coefficiente    |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Intercepto</b>                          | <b>16,9898</b>  | <b>0,869641</b> | <b>0,000293</b> | <b>16,9898</b>  |
| <b>U</b>                                   | <b>15,2610</b>  | <b>2,459715</b> | <b>0,008437</b> | <b>7,6305</b>   |
| dp                                         | 0,9115          | 1,739281        | 0,636486        | 0,4558          |
| <b><math>C_0</math></b>                    | <b>6,1885</b>   | <b>1,739281</b> | <b>0,037872</b> | <b>3,0943</b>   |
| U x dp                                     | 0,2530          | 1,739281        | 0,893569        | 0,1265          |
| <b><math>Dp \times C_0</math></b>          | <b>-18,0935</b> | <b>2,459715</b> | <b>0,005193</b> | <b>-9,0468</b>  |
| <b><math>U \times dp \times C_0</math></b> | <b>-21,2940</b> | <b>2,459715</b> | <b>0,003242</b> | <b>-10,6470</b> |

$R^2 = 0,970$  ;  $R = 0,985$

Desta forma, pelo teste F, tem-se que  $F_{calc} > F_{tab}$  para ambos os casos, portanto o modelo linear proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente os modelos matemáticos de AE e  $AE_{esp}$  em função das variáveis significativas (equações 1 e 2).

$$AE(U) = 10,2690 + 5,1303.U + 1,6018.C_0 - 5,9617.dp.C_0 - 6,3746.U.dp.C_0 \quad (1)$$

$$AE_{esp}(U/g \text{ de proteína}) = 16,9898 + 7,6305.U + 3,0943.C_0 - 9,0468.dp.C_0 - 10,647.U.dp.C_0 \quad (2)$$

Tabela 5 - Análise de variância obtida para o planejamento para AE e  $AE_{esp}$

| Fonte de variação | SQ     |            | GL |            | MQ    |            | $F_{calc}$ |            |
|-------------------|--------|------------|----|------------|-------|------------|------------|------------|
|                   | AE     | $AE_{esp}$ | AE | $AE_{esp}$ | AE    | $AE_{esp}$ | AE         | $AE_{esp}$ |
| <b>Regressão</b>  | 110,25 | 301,30     | 6  | 6          | 18,38 | 50,22      | 39,04      | 16,60      |
| <b>Resíduos</b>   | 1,41   | 9,08       | 3  | 3          | 0,47  | 3,03       |            |            |
| <b>Total</b>      | 111,66 | 310,38     | 9  | 9          |       |            |            |            |

As superfícies de resposta obtidas para os modelos lineares são apresentadas nos gráficos da figura 1 (a e b). Se forem desejados maiores valores de AE e  $AE_{esp}$ , deve-se conduzir os experimentos na direção dos maiores valores de umidade e concentração inicial de inóculo. Os valores mais altos de AE e  $AE_{esp}$  encontrados foram de 10,877 U e 19,168 U/g de proteína (ponto central do planejamento), respectivamente.

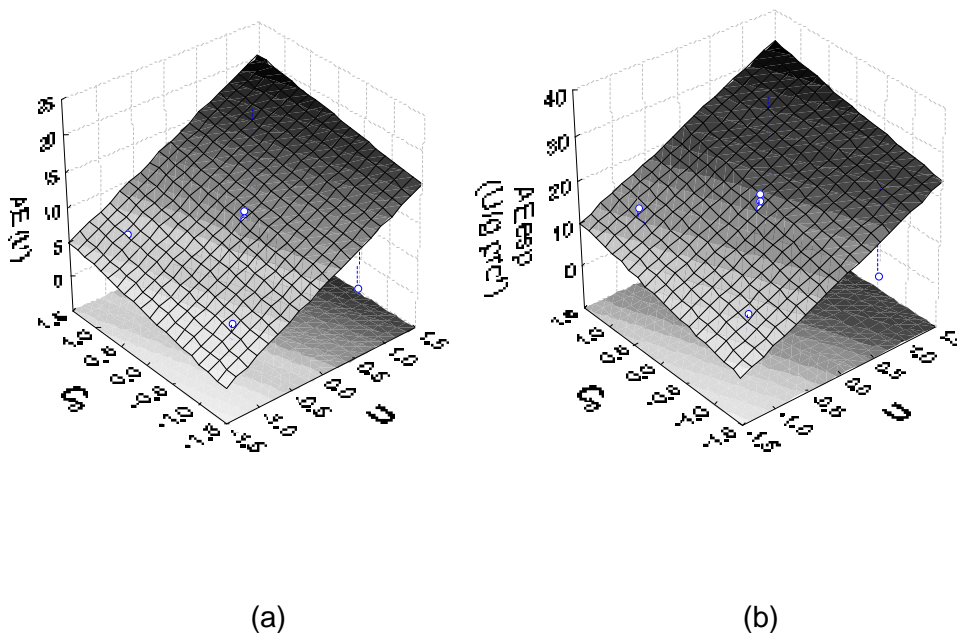


Figura 1 - Superfícies de resposta: (a) AE e (b)  $AE_{esp}$  da protease em função de  $C_0$  e U

#### Estudo de otimização da FES

Para a realização deste estudo os melhores parâmetros obtidos no estudo anterior foram repetidos: soja convencional como substrato, concentração inicial de inóculo de  $4.10^6$  esporos/gms, tempo de fermentação de 144h, umidade do meio fermentativo de 50% e temperatura de incubação de 30°C. Utilizou-se um planejamento experimental do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional), com duas variáveis a serem avaliadas: diâmetro 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. As especificações dos níveis das variáveis usadas no planejamento DCCR são apresentadas na tabela 6. A tabela 7 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos para AE e  $AE_{esp}$  da protease.

Tabela 6 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento

| Variável                    | Níveis |     |     |     |        |
|-----------------------------|--------|-----|-----|-----|--------|
|                             | -1,414 | -1  | 0   | +1  | +1,414 |
| <b>dp (mm)</b>              | 0,3    | 0,4 | 0,6 | 0,9 | 1,0    |
| <b>pH solução nutriente</b> | 3,0    | 3,9 | 6,0 | 8,1 | 9,0    |

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à AE e  $AE_{esp}$  estão apresentadas nas tabelas 8 e 9, onde (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em **negrito** e *itálico* indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Tabela 7 - Matriz do planejamento

| Ensaio | dp     | pH     | AE (U) | AE <sub>esp</sub> (U/g de proteína) |
|--------|--------|--------|--------|-------------------------------------|
| 1      | -1     | -1     | 11,189 | 17,155                              |
| 2      | 1      | -1     | 8,376  | 14,778                              |
| 3      | -1     | 1      | 9,732  | 15,946                              |
| 4      | 1      | 1      | 12,590 | 19,795                              |
| 5      | 0      | 0      | 11,515 | 20,457                              |
| 6      | 0      | 0      | 11,281 | 17,919                              |
| 7      | 0      | 0      | 11,505 | 17,454                              |
| 8      | 0      | 1,414  | 11,498 | 15,385                              |
| 9      | 0      | -1,414 | 13,429 | 21,400                              |
| 10     | 1,414  | 0      | 8,866  | 14,008                              |
| 11     | -1,414 | 0      | 9,677  | 15,533                              |

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para AE da protease para o planejamento

| Variável               | Efeito          | Erro padrão     | p-valor         | Coefficiente    |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Intercepto</b>      | <b>11,43375</b> | <b>0,534793</b> | <b>0,000004</b> | <b>11,43375</b> |
| dp (L)                 | -0,27548        | 0,655034        | 0,691541        | -0,13774        |
| <b>dp (Q)</b>          | <b>-2,36075</b> | <b>0,779747</b> | <b>0,029162</b> | <b>-1,18037</b> |
| pH (L)                 | 0,00664         | 0,655034        | 0,992301        | 0,00332         |
| pH (Q)                 | 0,83222         | 0,779747        | 0,334640        | 0,41611         |
| <b>dp (L) x pH (L)</b> | <b>2,83550</b>  | <b>0,926288</b> | <b>0,028065</b> | <b>1,41775</b>  |

R<sup>2</sup> = 0,821 ; R = 0,906Tabela 9 - Estimativa dos efeitos para AE<sub>esp</sub> da protease para o planejamento

| Variável          | Efeito          | Erro padrão     | p-valor         | Coefficiente    |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Intercepto</b> | <b>18,60993</b> | <b>1,317979</b> | <b>0,000032</b> | <b>18,60993</b> |
| dp (L)            | -0,17111        | 1,614310        | 0,919705        | -0,08556        |
| dp (Q)            | -3,67173        | 1,921660        | 0,114282        | -1,83587        |
| pH (L)            | -1,17448        | 1,614310        | 0,499519        | -0,58724        |
| pH (Q)            | -0,04864        | 1,921660        | 0,980786        | -0,02432        |
| dp (L) x pH (L)   | 3,11300         | 2,282806        | 0,230856        | 1,55650         |

R<sup>2</sup> = 0,560 ; R = 0,748

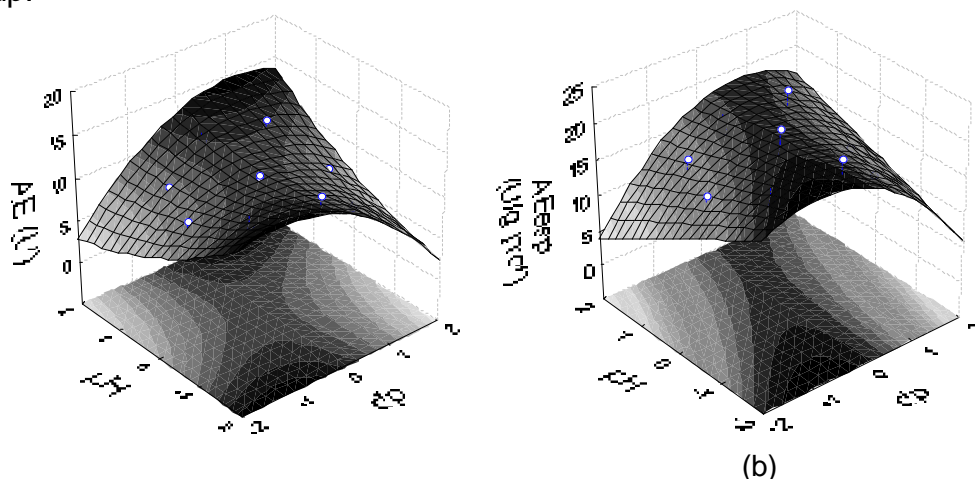
Apenas o diâmetro de partícula quadrático e a interação entre diâmetro de partícula e pH lineares foram significativos para AE, ao passo que, para AE<sub>esp</sub>, nenhuma variável avaliada foi significativa. A interação dp(L) x pH(L) influencia positivamente atividade enzimática, já o diâmetro de partícula quadrático influencia a atividade enzimática da protease negativamente, ou seja, se o valor de dp for aumentado, haverá uma diminuição do valor da resposta (AE). A análise de variância para o planejamento, obtida para AE e AE<sub>esp</sub>, é apresentada na tabela 10. Nos dois casos, para um intervalo de confiança de 95%, temos o valor tabelado de F, com os respectivos graus de liberdade: F<sub>tab</sub> (5;5;0,05)=5,05.



**Tabela 10 - Análise de variância obtida para o planejamento para AE e AE<sub>esp</sub>**

| Fonte de variação | SQ    |                   | GL |                   | MQ   |                   | F <sub>calc</sub> |                   |
|-------------------|-------|-------------------|----|-------------------|------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                   | AE    | AE <sub>esp</sub> | AE | AE <sub>esp</sub> | AE   | AE <sub>esp</sub> | AE                | AE <sub>esp</sub> |
| <b>Regressão</b>  | 19,66 | 33,17             | 5  | 5                 | 3,93 | 6,64              | 4,58              | 1,27              |
| <b>Resíduos</b>   | 4,29  | 26,06             | 5  | 5                 | 0,86 | 5,21              |                   |                   |
| <b>Total</b>      | 23,94 | 59,23             | 10 | 10                |      |                   |                   |                   |

Pelo teste F, tem-se que  $F_{calc} < F_{tab}$ , logo, o modelo não é válido para prever o comportamento do processo. Entretanto as superfícies de resposta para AE e AE<sub>esp</sub> (figura 2 (a) e (b)) podem ser usadas no sentido de verificar a direção a ser tomada nos próximos planejamentos visando a otimização do processo. Como observado nos resultados apresentados para o planejamento, os efeitos negativos das variáveis para AE e AE<sub>esp</sub> podem sugerir que melhores resultados são obtidos para valores mais baixos de pH e dp.



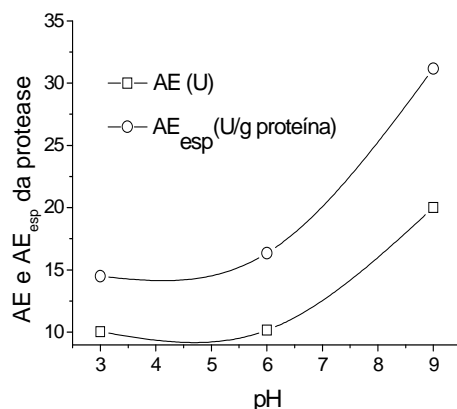
**Figura 2 - Superfícies de resposta: (a) AE e (b) AE<sub>esp</sub> da protease em função de dp e pH**

Para o melhor resultado (AE 13,43 U e AE<sub>esp</sub> 21,40 U/g de proteína), 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<sub>o</sub> 4.10<sup>6</sup> esporos/gms, tempo de fermentação de 144h e temperatura de incubação de 30°C.

#### *Avaliação da influência do pH inicial da FES*

Foram feitas fermentações utilizando os parâmetros otimizados, indicados pelos estudos anteriores, fixados em: tipo de soja (convencional), umidade do meio (50%), diâmetro da partícula do substrato (0,6 mm), concentração inicial do inóculo (4.10<sup>6</sup> esporos/gms), tempo de fermentação (144h) e temperatura de incubação (30°C). Avaliou-se o pH da solução nutriente. Para isso, foram preparados três diferentes soluções-tampão, com

pH's 3,0; 6,0 e 9,0, para o preparo das soluções nutrientes. A figura 3 apresenta a AE e  $AE_{esp}$  da protease, onde verificou-se uma maior produção de protease alcalina (pH 9,0), com os maiores valores de AE e  $AE_{esp}$  em 20,0 (U) e 31,2 (U/g de proteína), respectivamente.



**Figura 3 - Perfis de AE e  $AE_{esp}$  para a protease em função do pH**

## Conclusões

Na avaliação dos parâmetros operacionais da FES, que teve como objeto de estudo a produção da protease utilizando soja convencional como substrato e 144h de fermentação, realizou-se um planejamento experimental completo  $2^3$ , que indicou uma umidade inicial do meio fermentativo de 50% e concentração inicial do inóculo ( $C_0$ ) de  $4 \cdot 10^6$  esporos/gms. No estudo do tamanho de partícula do substrato e pH inicial do meio fermentativo, por meio de um planejamento experimental DCCR, ambas as variáveis não apresentaram influência significativa, porém, utilizando a metodologia de superfície de resposta, obteve-se um indicativo de aumento de AE e  $AE_{esp}$  da protease para valores mais baixos de dp (0,6 mm) e pH (3,0). Já na avaliação da produção de protease em diferentes pH's, obteve-se a melhor atividade da enzima em meio alcalino (pH 9,0), apresentando uma  $AE_{esp}$  de 34,4 U/g de proteína.

## Agradecimentos

A Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

## Referências

- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. *Official methods of analysis*. 12<sup>a</sup> ed., Washington D.C., 1984.
- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. *Official methods of analysis*. 16<sup>a</sup> ed., Washington D.C., 1995.

Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. *Como fazer experimentos*. Campinas: UNICAMP, 2007.

Deutscher, M.P.; Simon, M.I.; Abelson, J.N. Guide to protein purification In *Buffers: Principles and Practice*, Stoll, V.S.; Blanchard, Ed.: Academic Press, Inc.San Diego, 1990; 24-38.

Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. *Microbiologia de los alimentos: microrganismos importantes em microbiologia de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1993.

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 Microb. Technol.* 2003, 32,246-251.

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. *Proc. Biochem.* 1999, 35,85–90.

Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Proc. Biochem.* 2003, 38, 1599-1616.

Hasan, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Ikasari, L.; Mitchell, D.A. Leaching and characyerization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microb. Technol.* 1996, 19, 171-175.

Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotechnologia industrial-vol.3*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 1959, 31, 3, 426-428.

Pandey, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. *Proc. Biochem.* 1991, 26, 335-361.

Pandey, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* 1992, 27, 109-117.

Scheuer, P.J. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential. *Science*, 1990, 248, 173-177.

Silva, L.B.C. Identificação de lipoxigenases em sementes de soja [Glycine max (L.) Merrill] de diferentes linhagens. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 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. *Pesq. Agrop. Bras.* 1999, 34, 1277-1283.

Whitaker, J.R. *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker, 1994.

Wooley, P.,Peterson, S.B. *Lipases their structure production. Biochemistry and application*. New York: Cambridge University Press, 1994.