

SANDRO GERMANO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Penicillium* sp,
POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos, Área de Concentração:
Agroindústria, Setor de Tecnologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**CURITIBA
2000**

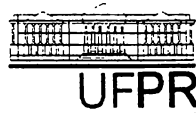
SANDRO GERMANO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Penicillium* sp,
POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos, Área de Concentração:
Agroindústria, Setor de Tecnologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**CURITIBA
2000**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Curso de Doutorado em processos Biotecnológicos
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

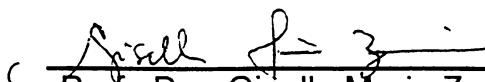
Aos treze dias de dezembro de 2000, no auditório do CESEC, foi instalada pelo Prof.Dr.Carlos Ricardo Soccol, coordenador do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a Banca Examinadora para a primeira Defesa de Doutorado, área de concentração: Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Doutorado em processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Gisella Maria Zannin (UEM), Elba P S Bom (UFRJ), Telma Teixeira Franco (UNICAMP), Giovanni Mocelin (UFPR), Carlos Ricardo Soccol (UFPR-Orientador), Nina Waszczynskyj (UFPR), Luciana Vandenbergue (PUC-PR). Às 09:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o(a) Candidato(a) **SANDRO GERMANO** a fazer a apresentação da Tese intitulada " Desenvolvimento de bioprocessos para produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium sp*, por fermentação em estado sólido ". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

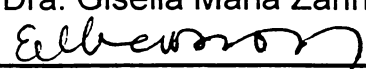
Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca atribuiu as seguintes conceitos: Profa.Dra. Gisella Maria Zannin, A, Profa.Dra. Telma Teixeira Franco, A, Profa. Dra. Elba P S Bom, A, Profa. Luciana Vandenbergue, A, Prof.Dr. Giovanni Mocelin, A, Profa. Nina Waszczynskyj, A, Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, A.

A média obtida resultou no conceito A do candidato, (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

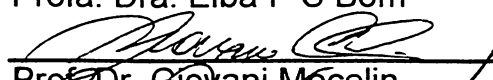
Curitiba, 13 de dezembro de 2000.



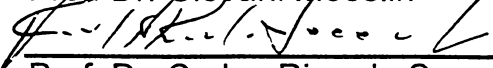
Profa.Dra. Gisella Maria Zannin



Profa. Dra. Elba P S Bom



Prof. Dr. Giovanni Mocelin



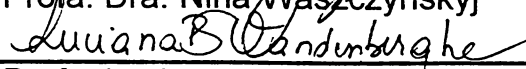
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol



Profa. Dr. Telma Teixeira Franco



Profa. Dra. Nina Waszczynskyj



Profa. Luciana Vandenbergue

SANDRO GERMANO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Penicillium*
sp, POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Depto. Engenharia Química-Setor de Tecnologia, UFPR

Examinadores:

Prof. Dra. Elba P. S. Bon
Prof. Dra. Gisella M. Zanin
Prof. Dr. Giovani Mocelin
Prof. Dra. Luciana Vandenbergue
Prof. Dra. Nina Wasczynkyj
Prof. Dra. Telma Teixeira Franco

Depto. Bioquímica -UFRJ
Depto. Engenharia Química -UEM
Depto. Engenharia Química -UFPR
Depto. Engenharia de Alimentos -PUC-PR
Depto. Engenharia Química -UFPR
Depto. Engenharia Química -UNICAMP

Curitiba, 13 de dezembro de 2000.

"A Deus pela razão da vida e do conhecimento".

Agradecimentos

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade de realizar este trabalho e compartilhar seus conhecimentos, e acima de tudo, obrigado pela orientação, dedicação, incentivo, persistência e amizade, mesmo nas horas mais difíceis, a eterna gratidão e admiração.

Aos professores doutores, Elba P. S. Bon, Gisella M. Zanin, Giovani Mocelin, Luciana Vandenbergue, Nina Wasczynkyj e Telma Teixeira Franco, pelo aceite na análise deste trabalho.

Aos colegas e amigos do curso de doutorado e do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela experiência compartilhada e incentivo recebido.

À Dra. Clarice e Valéria pela amizade e auxílio durante minha caminhada durante estes anos.

Aos amigos Fabiano, Mariza e Luiz os mais sinceros agradecimentos por terem compartilhado minhas tristezas e alegrias.

À minha mãe Anita, por estar sempre ao meu lado "benção mãe".

"The last but the first" Deus, pela saúde e pelo conhecimento, enfim a razão de tudo, muito obrigado.

RESUMO

Resíduos agroindustriais se constituem em substratos de grande potencial para serem utilizados como meio de cultivo na produção de inúmeros bioprodutos celulares de interesse comercial. Neste trabalho demonstrou-se a importância da fermentação no estado sólido na produção de enzimas proteolíticas. As proteases possuem ampla aplicação nas indústrias do couro, alimentícia e na fabricação de detergentes. O resíduo utilizado neste trabalho como substrato-suporte, foi o farelo de soja. Os resultados mostraram que o fungo *Penicillium* sp, foi selecionado como bom produtor de enzimas proteolíticas em farelo de soja com a umidade de 55 %, solução tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,2 M) e temperatura de 28 °C no período de 48 horas. O perfil respirométrico foi avaliado, sendo caracterizado como um processo aeróbio de produção de proteases, sendo que o fator aeração (65 mL/min/coluna) aumentou a produção de enzimas. O perfil de crescimento pode-ser avaliado pela determinação da glicosamina presente no micélio do *Penicillium* sp. A protease extra-celular obtida, no processo fermentativo, foi analisada através de métodos analíticos e avaliada através de parâmetros cinéticos. Os resultados demonstraram que a protease apresentou melhor atividade enzimática utilizando-se como substrato a azocaseína, com um pH ótimo de 6,5 em tampão fosfato (0,2 M) e temperatura de 45 °C. Os estudos de estabilidade ao pH, apresentaram uma ampla faixa de pH (6-9). Os estudos de termoestabilidade revelaram temperaturas altas, em torno de 35 °C-45 °C. A atividade é reduzida na presença de íons Co^{+2} , Mg^{+2} e Zn^{+2} , enquanto na presença do Ca^{+2} e Na^{+} houve um discreto aumento na atividade proteolítica. A protease foi classificada como sendo uma serina protease, inibida cerca de 93% de sua atividade por PMSF, tendo um valor de $K_m \text{ app} = 2,66 \text{ mg/mL}$. A protease foi compatível aos detergentes comerciais restando cerca de 60 % de sua atividade em 60 minutos. A enzima apresentou boa estabilidade frente a agentes oxidantes e surfactantes, sugerindo a possibilidade de aplicação em indústria de detergentes. Os estudos de purificação revelaram a presença de duas proteases serínicas, isoenzimas, com ponto isoeletrico idênticos, sendo caracterizadas pela massa molecular de 16 e 38 kDa.

Palavras-chaves: *Penicillium* sp, protease serínica, fermentação no estado sólido,, farelo de soja.

ABSTRACT

Agro-industrial residues, which represent raw materials of low cost, often contain all the nutrients required for microbial growth. Solid State Fermentation (SSF) offers substantial advantages, such as superior enzyme productivity, process simplicity, lower capital investment and energy requirements, on production of different cellular metabolites of commercial interest. In this work the importance of solid state fermentation was demonstrated in the production of proteolytic enzymes. Proteases possess wide applications in the food industries and in the production of detergents. The substrate support used in this work was soybean waste. The results showed that the strain of *Penicillium* sp. selected was a good proteolytic enzymes producer in the substrate support with: humidity of 55%, citrate-phosphate buffer, pH 5,0 (0,2 M) and a temperature of 28 °C over a period of 48 hours. The respirometric profile was evaluated, resulting in a aerobic process of proteases production. The best aeration for enzymes production was found to be 65 mL/min/column. The growth profile was evaluated through the determination of the glucosamine present in the mycelium of the *Penicillium* sp. Extra-cellular protease obtained in this fermentative process, was analysed through analytic methods and evaluated through kinetic parameters. The results showed that proteases presented better enzymatic activity when azocasein was used as substrate, with a pH of 6,5 in phosphate buffer (0,2 M) and a temperature of 45 °C. The studies of pH stability, showed that the enzyme was stable a pH range of 6 to 9. Stability studies revealed high temperatures, around 35 C-45 °C. The activity is reduced in the presence of Co^{+2} , Mg^{+2} and Zn^{+2} ions, while in the presence of Ca^{+2} and Na^{+} resulted in a discreet increase in proteolytic activity. Proteases were classified as serine proteases and were inhibited to about 93% by PMSF, with a value of app $K_m = 2,66$ mg/mL. Proteases were compatible with commercial detergents retaining about 60% of their activity for 60 minutes. The enzymes presented good stability towards oxidants and surfactant agents, suggesting the possibility for industrial use as detergents. Purification studies revealed the presence of two serine proteases, isoenzymes, with identical isoelectric point, being characterised by a molecular weight of 16 and 38 kda, respectively.

Key words: *Penicillium* sp, serine protease, solid state fermentation, soybean

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivos Gerais.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Fermentação em estado sólido.....	5
3.1.1 Características gerais da FES.....	7
3.1.2 História, aplicações atuais e perspectivas.....	13
3.1.3 Variáveis do processo em Fermentação em estado sólido.....	17
3.2 Proteases: conceito e classificação.....	22
3.2.1 Exopeptidases.....	23
3.2.1.1 Aminopeptidases.....	23
3.2.1.2 Carboxipeptidases.....	24

3.2.2 Endopeptidases.....	24
3.2.2.1 Serina Proteases.....	24
3.2.2.2 Aspártico Protease.. ..	26
3.2.2.3 Cisteína Proteases.....	28
3.2.2.4 Metaloprotease.....	29
3.3 Mecanismo de ação de proteases.....	30
3.4 Funções fisiológicas e importância das enzimas proteolíticas (proteases).....	32
3.5 Microorganismos produtores de proteases.....	34
3.6 Aplicações de enzimas proteolíticas.....	35
3.7 Fungos.....	37
3.8 Soja.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Microorganismos.....	44
4.1.1 Isolamento do fungo <i>Penicillium</i> sp.	44
4.1.1.1 Microcultivo.....	45
4.1.2 Manutenção da cepa.....	46
4.1.3 Preparo da solução de esporos.....	46
4.1.4 Contagem dos esporos.....	47
4.1.5 Fotomicroscopia.....	47
4.1.6 Microscopia eletrônica.....	48
4.1.7 Screening para detectar presença de enzimas proteolíticas.....	48
4.2 Obtenção do substrato-suporte.....	49
4.2.1 Composição físico-química do farelo da soja utilizado.....	49
4.3 Esterilização dos meios e equipamentos.....	51
4.4 Fermentação em Erlenmeyers 1.....	51
4.4.1 Extração de enzimas.....	51
4.4.2 Otimização da produção de protease por FES em Erlenmeyers.....	52

4.4.3 Produção de proteases em bioreator tipo coluna.....	52
4.5 Métodos analíticos.....	53
4.5.1 Determinação da biomassa em FES.....	54
4.5.1.Extração da quitosana do material fermentado.....	54
4.5.2 Análise por Infra-vermelho.....	56
4.5.3 Determinação da glicosamina.....	57
4.5.4 Determinação da biomassa produzida por fermentação em meio líquido.....	58
4.5.5 Determinação do pH.....	59
4.5.6 Determinação da atividade proteolítica.....	59
4.5.7 Determinação de proteínas – Método de BRADFORD.....	60
4.5 Determinação da atividade de protease extracelular utilizando diferentes substratos...	60
4.7 Temperatura ótima e pH ótimo para a atividade enzimática.....	61
4.8 Estabilidade da protease extracelular frente ao pH e estabilidade térmica.....	62
4.9 Inibidores da atividade proteolítica.....	63
4.10 Ensaio com cátions para atividade da protease.....	63
4.11 Efeitos da concentração do substrato.....	63
4.12 Estudos prévios de estabilidade do extrato bruto enzimático frente a agentes oxidantes surfactantes e de compatibilidade com detergentes comerciais.....	64
4.13 Fracionamento com Sulfato de amônio.....	64
4.14 Cromatografia em DEAE-Sepharose.....	65
4.15 Cromatografia de exclusão molecular em aparelho FPLC.....	66
4.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e nativo.....	66
4.17 Isoeletrofocalização.....	67

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de fungos para a produção de proteases.....	68
5.2 Composição físico-química do farelo de soja.....	69
5.3 Seleção de fungos para a produção de proteases por FES.....	70
5.4 Caracterização morfológica de <i>Penicillium sp.</i>	70

5.5 Otimização das variáveis físico-químicas na fermentação no estado sólido.....	71
5.5.1 Planejamento experimental 1.....	71
5.5.2 Planejamento experimental 2.....	79
5.6 Cinética de produção de proteases em FES.....	81
5.6.1 Determinação da biomassa nos processos de FES.....	82
5.7 Microscopia eletrônica do crescimento do <i>Penicillium sp.</i> em farelo de soja.....	88
5.8 Otimização da fermentação em bioreator tipo coluna.....	92
5.8.1 Planejamento experimental 3 – efeito da umidade e aeração.....	93
5.8.2 Planejamento experimental 4	94
5.9 Análise respirométrica	95
5.10 Estudos da caracterização enzimática do extrato bruto de <i>Penicillium sp.</i>	96
5.10.1 Efeito da temperatura e pH.....	101
5.11 Estabilidade da protease extracelular frente ao pH e temperatura.....	106
5.12 Atividade enzimática frente a diferentes substratos.....	108
5.13 Ensaios com cátions para ativação da protease.....	110
5.14 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.....	111
5.15 Compatibilidade da protease com detergentes comerciais e estabilidade frente a agentes oxidantes e surfactantes.....	112
5.16 Purificação da protease produzida por FES.....	116
5.16.1 Fracionamento com sulfato de amônio	117
5.16.2 Perfil eletroforético do extrato parcialmente purificado.....	117
5.16.3 Análise da atividade proteolítica em eletroforese.....	118
5.17 Cromatografia em DEAE-Sepharose.....	120
5.18 Cromatografia de exclusão molecular em FPLC.....	124
CONCLUSÕES.....	128
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
aw	Atividade de água
AMPSF	Fluoreto p-amidinofenil-metil-sulfonila
BSA	Soro albumina bovina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
E-64	Butano – trans – epoxisuccineil – L – leucilamido – (4- guanidino)
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (β -aminoetil éter) N', N'-tetracético
FES	Fermentação em Estado Sólido
KDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
PCMB	p- cloromercuriobenzoato
p-CMPSA	Ácido p-cloromercúrio-fenil-sulfônico
PMSF	Fenilmetanosulfonafluoreto
r.p.m	Rotações por minuto
SDS	Sódio dodecil sulfonato
SS	Subtrato seco
TCA	Ácido tricloroacético
TPCK	N-tosil-L-fenilamina-clorometil cetona
Da	Dalton
app	Aparente
Km	Constante de Michaelis-Menten
U	Unidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sítios ativos de proteases.....	31
Figura 2:	Mercado mundial de enzimas.....	33
Figura 3:	Equipamento de fermentação no estado sólido utilizando bioreator de colunas de baixa capacidade.....	53
Figura 4:	Processo de extração da quitosana.....	56
Figura 5:	Fluxograma de determinação da glicosamina no meio fermentado.....	58
Figura 6.1:	Microcultivo do fungo para o estudo morfológico.....	71
Figura 6.2:	Cultura do fungo <i>Penicillium sp.</i> ágar Sabourad.....	71
Figura 6.3:	Aspecto microscópico de <i>Penicillium sp.</i>	72
Figura 7:	Superfície de resposta representando a influência dos fatores, temperatura e pH sobre a produção de protease.....	77
Figura 8:	Superfície de resposta representando a influência dos fatores, pH e umidade, sobre a produção de protease.....	78
Figura 9:	Projeção da superfície de resposta dos fatores estudados (pH e umidade), a temperatura de 28 °C.....	80
Figura 10:	Crescimento do fungo <i>Penicillium sp.</i> , no substrato-suporte (farelo de soja) após 48 h de fermentação.....	81
Figura 11:	Espectro de Infra Vermelho do Biopolímero (Quitosana).....	83
Figura 12:	Teor de glicosamina em diferentes tempos de fermentação.....	86
Figura 13:	Determinação da biomassa em fermentação em meio líquido.....	86
Figura 14:	Curva de Biomassa Produzida em Fermentação em Estado Sólido.....	87
Figura 15:	Microscopia da superfície do substrato-suporte (farelo de soja), tempo 12 horas.....	89
Figura 16:	Crescimento do fungo <i>Penicillium sp.</i> , no tempo 24 horas.....	89
Figura 17:	Crescimento do fungo <i>Penicillium sp.</i> , no tempo 48 horas.....	90
Figura 18:	Crescimento do fungo <i>Penicillium sp.</i> , no tempo 72 horas.....	91
Figura 19:	Efeito da aeração e umidade na produção de enzimas proteolíticas Planejamento experimental 4: efeito da aeração e umidade na	94
Figura 20:	produção de proteases de <i>Penicillium sp.</i> Evolução do Oxigênio consumido, CO ₂ produzido, e protease	95
Figura 21:	sintetizada em U/mL..... Coeficiente respirométrico (QR) durante a FES do farelo de soja	97
Figura 22:	por <i>Penicillium sp.</i>	98
Figura 23:	Efeito da temperatura sobre a atividade proteásica.....	103
Figura 24:	Efeito do pH na atividade proteásica.....	103
Figura 25:	Projeção da superfície resposta e superfície de resposta, dos fatores estudados, pH e temperatura, sobre a atividade proteolítica.....	105

Figura 26:	Termoestabilidade da protease entre 37 e 70 °C.....	107
Figura 27:	Curva de estabilidade ao pH entre 3,2 e 12.....	107
Figura 28:	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.....	111
Figura 29:	Compatibilidade da ação da protease de <i>Penicillium sp</i> em relação a do detergente comercial (OMO Multi-ação).....	113
Figura 30:	Compatibilidade da ação da protease de <i>Penicillium sp</i> em relação a do detergente comercial (OMO máquina).....	114
Figura 31:	Curva do efeito do agente oxidante (peróxido de hidrogênio) na atividade da protease de <i>Penicillium sp</i>	114
Figura 32:	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do Extrato Bruto e Extrato parcialmente purificado.....	119
Figura 33:	Eletroforese de atividade proteolítica em gel contendo gelatina do Extrato bruto e Parcialmente purificado.....	119
Figura 34:	Perfil de Eluição do Extrato Parcialmente Purificado em DEAE-Sephrose.....	120
Figura 35:	Eletroforese das frações com atividade proteolítica obtidas da cromatografia em DEAE-Sephrose.....	122
Figura 36:	Eletroforese de atividade proteolítica em gel contendo gelatina, das frações com maior atividade.....	123
Figura 37:	Isoeletrofocalização das frações com maior atividade proteolítica obtidas em cromatografia em DEAE-Sephrose.....	123
Figura 38:	Curva de calibração de padrões de massa molecular (KDa).....	125
Figura 39:	Perfil de eluição das amostras cromatografadas em DEAE-Sephrose, submetidas a cromatografia em gel de exclusão molecular por FPLC.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Seleção de microorganismos para a produção de protease.....	69
Tabela 02:	Composição físico-química do farelo de soja.....	69
Tabela 03:	Atividade proteolítica dos fungos selecionados por fermentação no estado sólido.....	70
Tabela 04:	Apresentação dos ensaios para a otimização da FES das diferentes variáveis (temperatura, pH e umidade) com suas respectivas atividades.....	74
Tabela 05:	Análise química de carboidratos do micélio de <i>Penicillium</i> sp.....	84
Tabela 06:	Níveis de fatores estudados no Planejamento experimental 3.....	92
Tabela 07:	Influência da umidade e aeração na produção de enzimas proteolíticas.....	93
Tabela 08:	Parâmetros cinéticos e biomassa estimada à partir da OUR durante a fermentação no estado sólido do farelo de soja por <i>Penicillium</i> sp.....	100
Tabela 09:	Planejamento experimental por otimização das variáveis físico-químicas (pH e temperatura) relacionada a atividade enzimática.....	104
Tabela 10:	Atividade proteolítica de <i>Penicillium</i> sp. frente a diferentes substratos.....	108
Tabela 11:	Efeitos de inibidores na atividade enzimática.....	109
Tabela 12:	Efeitos dos íons metálicos na atividade enzimática.....	110
Tabela 13:	Efeitos do surfactante na atividade enzimática de <i>Penicillium</i> sp.....	111
Tabela 14:	Purificação parcial da protease de <i>Penicillium</i> sp. no extrato bruto com Fracionamento pelo sulfato de amônio.....	115
Tabela 15:	Determinação do peso molecular de serinas proteases de <i>Penicillium</i> sp. em gel Permeação por FPLC.....	126

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se disseminado os processos fermentativos para a produção de inúmeros produtos industriais. Dentre esses processos podemos citar a produção de aminoácidos, biopolímeros, vitaminas, ácidos orgânicos, inseticidas microbianos, antibióticos, enzimas fúngicas, hormônios, pigmentos, corantes, aromas, etc. (PENAZOLA, *et al.*, 1985; CRUEGER e CRUEGER, 1989; SOCCOL, 2001).

A técnica da fermentação no estado sólido (FES) se caracteriza pelo crescimento microbiano sobre um material orgânico sólido que funciona como substrato e suporte. Dentre os materiais mais utilizados estão os grãos de cereais, legumes ou materiais lignocelulósicos contendo alto teor em fibras. Esse tipo de fermentação apresenta inúmeras vantagens em relação à fermentação em meio líquido, especialmente na produção de enzimas fúngicas extracelulares (BATAGLINO, *et al.*, 1991).

As enzimas atuam como catalisadores orgânicos e são produzidas por células vivas responsáveis pelas reações bioquímicas dos organismos vivos. Todas as enzimas são compostas basicamente por proteínas, embora muitas possuam um grupo químico prostético não protéico (LIMA *et al.*, 1975 ; GODFREY e WEST, 1996).

Uma das características importantes das enzimas é a sua alta especificidade sobre o substrato. As enzimas atuam sobre um número muito limitado de compostos, e não têm qualquer efeito sobre outros. As reações enzimáticas se processam, muitas vezes, sob condições brandas de temperatura e pH.

Segundo LIMA *et al.*, (1975) e GUPTA *et al.*, (1999), as enzimas podem também ser caracterizadas por possuir atividade em baixas concentrações de substrato, rapidez no mecanismo de ação e não apresentar toxicidade. São empregadas em indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis, de couro, de papel e de minérios.

De acordo com MANONMANI e JOSEPH (1973) e KANG *et al.*, (1995) recentemente tem surgido grande interesse no uso de enzimas no processamento de alimentos, produção de substâncias químicas, sistemas analíticos e de diagnóstico e no tratamento de enfermidades, além de novas tecnologias.

Segundo CRUEGER e CRUEGER (1989), as proteases são classes de enzimas que ocupam uma posição importante tanto nas aplicações patofisiológicas como biotecnológicas, devido sua grande diversidade e especificidade ; sendo enzimas degradativas, catalisam hidrólises de proteínas. São produzidas em torno de 500 toneladas por ano dessas enzimas, para serem utilizadas principalmente na indústria de detergentes e láctea, como também na indústria farmacológica.

As vendas mundiais de enzimas industrializadas alcançam a cifra de 1 bilhão US\$/ano. Destas enzimas, as proteases representam 60% do mercado (RAO *et al.*, 1998).

Novas aplicações de proteases têm surgido, sendo a mais expressiva na indústria de couro, substituindo o uso contínuo de produtos químicos tóxicos.

A grande diversidade das proteases tem atraído a atenção mundial na tentativa de explorar suas aplicações como forma de desenvolver tecnologias industriais limpas que não agredam o meio ambiente (KUN-HEE *et al.*, 1999 ; RAO *et al.*, 1998).

A tecnologia para produzir e utilizar comercialmente importantes produtos enzimáticos combinam áreas de microbiologia, genética, bioquímica e a engenharia de processo. Estas áreas em separado ou de forma interrelacionadas conduzem a uma evolução constante nos temas relacionados com a pesquisa e produção de enzimas.

Considerando que, o Brasil gera quantidades expressivas de resíduos, subprodutos agrícolas e agroindustriais, nosso trabalho teve por objetivo desenvolver uma alternativa tecnológica para agregar valor ao farelo de soja através da produção, caracterização e purificação de enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo selvagem *Penicillium* sp. por FES.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Produção, purificação e caracterização de proteases de *Penicillium sp.* por FES, utilizando como substrato-suporte o farelo de soja

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Seleção de cepas produtoras de proteases
- b) Otimização do meio de cultivo através do estudo do efeito dos parâmetros físico-químicos (umidade, pH, temperatura e aeração) envolvido na produção de proteases.
- c) Avaliar a evolução dos parâmetros cinéticos (crescimento celular, atividade enzimática, consumo de O₂, produção de CO₂) da fermentação.
- d) Cinética enzimática do extrato bruto
 - verificação do efeito do pH
 - verificação do efeito da temperatura
 - verificação do efeito da concentração do substrato
 - ensaios de estabilidade (pH e temperatura)
 - ensaios com inibidores de protease e efeito de sais sobre a atividade enzimática
 - ensaios da estabilidade frente a agentes surfactantes e oxidantes
 - ensaios da compatibilidade com detergentes comerciais.
- e) Purificação da Protease
 - fracionamento com sulfato de amônio
 - técnicas cromatográficas: (cromatografia de troca iônica, filtração em gel)
 - técnicas eletroforéticas

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fermentação em estado sólido

Os processos conhecidos como fermentação em estado sólido(FES) ou em substrato sólido compreendem fermentações nas quais o crescimento do microorganismo ocorre sobre um material sólido e na ausência de água livre, de tal modo que, o material atua simultaneamente como fonte de nutrientes e ou como suporte no crescimento de microorganismos (CARRIZALES *et al.* 1986).

O estado sólido da matéria oferece grandes condições quando fungos são utilizados (HESSELTINE, 1987) neste tipo de processo. Eles são diferentes de outros microorganismos pois tipicamente crescem ao natural em substrato sólido, assim como pedaços de madeira, sementes, caules, raiz, frutas e partes secas de animais como couro, ossos e material fecal (AIDOO *et al.*, 1982).

As diferenças entre uma fermentação em substrato sólido e em meio líquido surgem fundamentalmente da disponibilidade de água, da relação desta com o substrato e do tipo de substrato empregado.

Segundo LONSANE *et al.* (1985), a metodologia empregada no desenvolvimento de um processo de FES em geral é simples e pode ser resumida nos seguintes pontos:

preparação do substrato sólido: usualmente se faz necessário com um pré-tratamento para diminuir o tamanho da partícula ou aumentar a disponibilidade de nutrientes para o microorganismo. Nesta etapa o substrato-suporte pode ser suplementado com nutrientes e o pH ajustado;

cocção do substrato: o substrato de modo geral é esterilizado, porém também pode ser pasteurizado ou utilizado sem qualquer tipo de tratamento térmico. Este procedimento causa a absorção de água por parte das partículas do substrato-suporte;

preparação do inóculo: é feito pela técnica de cultivo misto proveniente de uma fermentação anterior ou por técnicas de cultivos puros com cepas selecionadas;

inoculação do substrato-suporte: o material sólido já úmido é inoculado com uma solução de esporos fúngicos, células de bactérias ou leveduras de concentração conhecida;

incubação: o substrato-suporte inoculado é acondicionado em diferentes modelos de bioreatores e incubação à temperatura controlada;

recuperação das biomoléculas produzidas: o material fermentado retirado do bioreator poderá ser desidratado ou então enviado para etapa de recuperação e purificação das biomoléculas presentes.

3.1.1 Características gerais da fermentação em estado sólido

A produtividade de um sistema de fermentação em substrato-suporte sólido é afetada por diversos fatores. O mais importante é o conteúdo de água presente no substrato-suporte. A água é de fundamental importância para o desenvolvimento do microorganismo e sua disponibilidade no substrato-suporte, e é a principal diferença entre este tipo de processo e a fermentação em meio líquido. A água presente em um sistema de fermentação em estado sólido, se encontra embebida na matriz sólida (CANNEL e MOO YOUNG, 1980). A água livre (água não embebida no substrato) aparece uma vez que a capacidade de absorção do substrato-suporte sólido é excedida.

Nem toda a água contida no substrato-suporte está disponível para o desenvolvimento das funções biológicas dos microorganismos. O parâmetro da atividade da água (a_w) descreve a forma mais apropriada do seu conteúdo, a umidade do substrato-suporte e a água disponível para os microorganismos (BATTAGLINO *et al.*, 1991). Este parâmetro está definido como o quociente entre a pressão do vapor da água no substrato-suporte e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura de um sistema em equilíbrio, $a_w = \% \text{ Hre} / 100$ (umidade relativa).

Segundo LONSANE e GHILDYAL (1992), a quantidade reduzida de água da FES permite um melhor crescimento dos fungos filamentosos, muitos dos quais apresentam um ótimo desenvolvimento na atividade da água entre 0,93 e 0,98. Para a

maioria das bactérias e leveduras o crescimento é ótimo a uma atividade da água em torno de 0,99.

Esta característica da FES limita o tipo de microorganismo utilizado neste tipo de processo. Deste modo, cerca de 50% dos microorganismos utilizados nos processos de FES pesquisados nos últimos 20 anos pertencem aos fungos filamentosos, sendo 30% leveduras, 15% *actinomyces* e 5% bactérias (GUTIÉRREZ-ROJAS *et al.*, 1995).

A transferência de calor é um dos grandes problemas da FES. Tem sido demonstrado que em processos realizados em grande escala, a temperatura do substrato-suporte se eleva significativamente o que pode comprometer o desenvolvimento dos microorganismos. O resfriamento por evaporação é provavelmente, o método mais efetivo para a FES, mesmo que isto reduza o teor de água presente.

Os substratos são mais concentrados na FES que em fermentações em meio líquido. Nestas últimas, a água tipicamente compreende 90-99 % da massa total, enquanto em FES pode variar entre 10-85%. A concentração dos substratos solúveis e produtos podem alcançar altos níveis, exacerbando efeitos inibitórios e repressivos.

Os substratos-suportes empregados na FES são geralmente produtos de origem agrícola ou agroindustrial, de características estruturais e nutricionais complexas. Esta heterogeneidade dificulta a caracterização da FES e interfere na reprodutibilidade das determinações analíticas dos diferentes parâmetros. A presença de misturas de componentes de alto e baixo peso molecular pode levar a diversos padrões de indução, repressão e inibição na regulação dos metabólitos microbianos (MUDGET, 1986).

A estrutura básica dos substratos sólidos está formada por biomoléculas. Estas são a fonte de carboidratos, proteína e lipídeos, que representam a forma de energia para o desenvolvimento microbiano. A utilização destas biomoléculas requerem a síntese e secreção de enzimas hidrolíticas por parte do microorganismo.

A natureza sólida do substrato-suporte empregado nos processos de FES podem apresentar as seguintes características (SOCCOL, 1996) :

- a massa do substrato não está distribuída uniformemente no espaço, e existem espaços inter-partículas vinculados ao fluxo da fase gasosa externa;

- alguns sistemas de medidas usados para monitorar as variáveis da fermentação em meio líquido não podem ser usados porque o contato necessário com o substrato em FES não pode ser assegurado;

- o manuseio de sólidos requer o uso de equipamentos especiais;

- o fluxo de sólidos é complexo. Misturar sólidos durante o cultivo requer reatores e agitadores especiais para prevenir que o micélio se rompa; e

- em razão que a matriz sólida restringe a transferência de oxigênio, o crescimento microbiano está em grande parte restringindo a superfície dos substrato-suporte. A ação do microorganismo em relação ao substrato-suporte se concentra preferencialmente na superfície o qual leva a gradientes de concentração diferentes de substratos, metabólitos e pH em uma mesma partícula.

Diversos autores têm destacado as vantagens e desvantagens da FES em relação à fermentação em meio líquido (AIDDO *et al.*, 1982; MUDGET, 1986; CARRIZALES e JAFFE, 1986; HESSELTINE, 1987, SOCCOL,*et al.*,1994, SOCCOL,1996). Em geral as vantagens estão associadas ao baixos custo e alta produtividade dos processos de FES. Enquanto que as desvantagens se relacionam com a falta de conhecimento científico deste tipo de processo (como consequência da dificuldade de controle e monitoramento das variáveis do mesmo) , bem como a falta de conhecimento e desenvolvimento tecnológico para produção industrial em grande escala.

Segundo MUDGET (1986), as vantagens da FES com respeito à fermentação em meio líquido, podem ser resumidas nos seguintes pontos:

- podem ser agregados nutrientes suplementares aos substratos sólidos. Em geral os pré-tratamentos aplicados ao substrato-suporte são simples, de baixo custo e se realizam com o único objetivo de auxiliar a acessibilidade deste ao microorganismo;

- os volumes dos bioreatores são relativamente pequenos em relação ao rendimento do produto, em razão de que a água está concentrada no substrato-suporte. Isto poderá implicar num menor investimento de capital;

- pode-se utilizar esporos como inóculo e portanto não se requer etapas prévias que envolvam grandes volumes e tanques para seu desenvolvimento;
- baixa umidade e/ou atividade da água reduz o problema de contaminação especialmente no caso de bactérias. A possibilidade de utilizar inóculos muito mais concentrados que na fermentação em meio líquido, pelo qual as possíveis contaminações se vêem inibidas, permite que os processos de FES se desenvolvam em condições de menor assepsia que nos processos em meio líquido;
- as condições para o crescimento de fungos são similares às de seu habitat natural. Este ponto justifica o fato dos fungos filamentosos se desenvolverem de forma altamente satisfatória em FES;
- a aeração é facilitada por espaços entre partículas e pela difusão do oxigênio na água que umedece as partículas do substrato. Devido a isto e a diferença dele no meio líquido, não é necessária a aplicação de aeração forçada a alta pressão nem de mecanismos que agitem violentamente o fermentado;
- os rendimentos na produção de metabólitos, podem ser mais altos que em meio líquido e serem reproduzíveis;
- os sólidos fermentados podem ser extraídos imediatamente por adição direta de solventes, desidratados ou congelados até sua extração; e
- os processos de purificação dos produtos se vêem simplificados pela maior concentração no líquido de extração.

Segundo (LONSANE, 1992 e SOCCOL, *et al.*, 1994) as desvantagens que a FES apresenta em relação à fermentação em meio líquido são:

- ainda que tenha sido realizada FES com bactérias, a FES está restrita a microorganismos que podem crescer em sistemas de umidade e/ou atividade de água reduzida;
- a remoção do calor metabólico é um problema central, especialmente quando o processo se realiza em grande escala;

- a natureza sólida do substrato dificulta a determinação e controle dos parâmetros da fermentação; e
- a determinação da biomassa que é essencial para a caracterização do desenvolvimento microbiano não pode ser determinada de forma direta já que o microorganismo se encontra intimamente associado ao substrato.

Muitos dos aspectos importantes e básicos não estão muito desenvolvidos ou compreendidos na FES dentre eles podemos citar :

- modo de crescimento dos fungos no interior de um substrato composto por partículas de forma irregular;
- cinética de crescimento;
- informação quantitativa para o projeto de reatores, critérios de escalonamento e otimização de processos; e
- devido ao fato de os microorganismos em FES apresentarem velocidades de crescimento menores que as registradas em meio líquido, os tempos de cultivo podem ser maiores.

O Quadro 1 apresenta de forma sintética as principais diferenças entre a fermentação em meio líquido e no estado sólido.

Quadro 1. Principais diferenças entre a fermentação em estado sólido e fermentação em meio líquido

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	FERMENTAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO
O meio de cultivo não flui	O meio de cultivo flui
A profundidade do meio de fermentação é pequena, exceto em alguns biorreatores.	A profundidade do meio de fermentação é altamente significativa.
É utilizado um único substrato, em geral insolúvel. O mesmo é a fonte de carbono, nitrogênio, minerais e energia.	São utilizadas diferentes substâncias solúveis.
O substrato sólido absorve água e se umedece para permitir o acesso aos nutrientes.	Os nutrientes estão homogeneamente dispersos e dissolvidos no meio, portanto sempre disponíveis.
A quantidade de água é suficiente para permitir um crescimento e metabolismo ótimo do microorganismo e portanto, constitui uma proporção pequena do volume total do meio de fermentação.	A água é o componente majoritário no meio de fermentação.
O sistema apresenta três fases: sólida, líquida e gasosa	O sistema apresenta duas fases: líquida e gasosa
A fermentação não se realiza em condições assépticas	Todo o sistema está em condições assépticas
Não requer um controle rigoroso das variáveis de fermentação durante o processo salvo na remoção de calor, da oxigenação e da umidade	É geralmente essencial o controle de todas as variáveis de fermentação
A relação inóculo/meio é alta	A relação inóculo / meio é baixa

Quadro 1. Principais diferenças entre a fermentação em estado sólido e fermentação em meio líquido

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	FERMENTAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO
O oxigênio para o crescimento e metabolismo provém principalmente da fase gasosa e em menor quantidade do oxigênio dissolvido na fase aquosa.	O oxigênio disponível se encontra dissolvido na fase aquosa.
A aeração produz o oxigênio e remove o calor metabólico através da corrente gasosa.	A aeração produz o oxigênio da fase aquosa e remove os produtos gasosos mas a remoção de calor ocorre por esfriamento com água.
No geral o meio não necessita de agitação	A agitação é essencial para homogeneizar, exceto em fermentações anaeróbias
O crescimento fúngico envolve a penetração das hifas nas partículas do substrato sólido	O crescimento fúngico ocorre na forma de micélios ou de “pelletes” de micélio uniformemente distribuídos.
As bactérias e leveduras crescem aderidos as partículas sólidas	As bactérias e leveduras crescem uniformemente distribuídas no líquido agitado
O meio é um sólido úmido que contém os produtos da fermentação muito concentrados	O meio é líquido e os produtos da fermentação estão mais diluídos

FONTE: LONSANE, 1992 e SOCCOL, *et al.*, 1994

3.1.2 História, aplicações atuais e perspectivas

A FES foi provavelmente o método mais antigo que o homem utilizou para obter benefícios dos microorganismos (HESSELTINE, 1987). Existem inúmeros processos tanto de produção e/ou de preservação de alimentos fermentados que remontam há centenas de anos na antiguidade e que ainda são utilizados. O uso da fabricação do molho de soja através do processo “koji” no Japão e sudeste da Ásia, foi desenvolvido 1000 anos a.C. e há 3000 anos a.C. na China (PANDEY, 1992). Os microorganismos que atuam nestes processos fermentativos são contaminantes naturais e não patogênicos dos

alimentos. Os mesmos são responsáveis pela mudança no sabor, na textura, cor e propriedades nutricionais dos alimentos fermentados. Estas mudanças qualitativas dos alimentos mediante processo de FES, têm beneficiado diferentes grupos étnicos por todo o mundo (PAREDEZ – LOPES e GWYNETH, 1988).

A maioria dos processos de FES citados estão relacionados com pequenas unidades de fabricação em pequenos estabelecimentos agrícolas. Entretanto, alguns deles têm sido comercializados em escala industrial. Entre eles o processo de koji (fermentação de diferentes grãos por fungos do gênero *Aspergillus* e que habitualmente é utilizado como sinônimo de FES) a partir do qual se produzem anualmente no Japão milhões de litros de molho de soja (shoyu) e pasta de soja (miso) (CARRIZALES e JAFFE, 1986).

O “koji” foi utilizado de forma empírica e durante séculos na produção de enzimas para elaboração da maioria dos alimentos fermentados produzidos na Ásia. As exoenzimas produzidas por esse processo incluem: amilases, maltases, isomaltase, invertases, fitases, lipases, fosfatases, glicoamilases, celulasas e proteases.

O “koji” é preparado tradicionalmente em bandejas, e nelas se distribuem o substrato tomando o cuidado para que a profundidade não seja superior a 7 cm (isto permite uma boa dissipação do calor metabólico e aeração do cultivo). As bandejas são dispostas em fileiras com certo espaço entre si, o qual facilita a circulação do ar. A temperatura ambiente é mantida entre 25 e 30°C, a umidade entre 80 e 90 %, o qual é fácil de se obter em uma região de clima tropical (CARRIZALES, 1986).

Os preparados enzimáticos de “koji” que se agregam aos alimentos, consistem no substrato fermentado (que inclui a biomassa gerada), exoenzimas e demais metabólitos produtores de aromas e pigmentos. Desta forma, não se realiza extração alguma de enzimas a partir do “koji” sendo seu uso análogo ao da maltagem na produção de bebidas alcoólicas fermentadas como a cerveja.

A produção de “koji” como fonte de enzimas foi a base para o desenvolvimento da tecnologia de FES para a produção e extração de enzimas específicas a partir de substratos sólidos de baixo custo. No ano de 1896, Takamine produziu e comercializou o preparado enzimático com propriedades diastásicas, chamado “Takadiastasa”. Mais tarde introduziu este procedimento no ocidente aonde foi utilizado para substituir a malta de

cevada na produção de álcool por fermentação de grãos e batatas. Até aproximadamente o ano de 1940, obteve-se diferentes tipos de produtos por FES (enzimas, antibióticos, alimentos, etc.) e por sua vez o processo foi enriquecido com diferentes contribuições tecnológicas (novos desenhos de fermentadores, etc.). Atualmente são produzidas no Japão em nível industrial diversas enzimas de origem fúngica como celulases, lipases, amilases, pectinases e proteases. Ao sistema tradicional de bandejas se adicionaram controles de umidade e temperatura mediante o emprego de câmaras com ar condicionado e umidificado. Além do mais se implantaram mecanismos que permitem a agitação ou rotação do substrato fermentado podendo desta forma melhorar a aeração e dissipação do calor metabólico o qual permite trabalhar com uma espessura maior do leito de fermentação (ROUSSOS, *et al.*, 1989).

No ocidente a partir dos anos 40 e 50 a indústria da fermentação abandonou os processos de FES e se concentrou no desenvolvimento tecnológico da fermentação em meio líquido. Já na década de 60 devido à necessidade de obter quantidades importantes de micotoxinas, foi renovado o interesse pela FES. Isso ocorreu em consequência da elevada concentração de metabólitos obtidos por FES em comparação com o rendimento alcançado em meio líquido. O abandono dos processos de FES por parte dos países ocidentais, foi considerado um erro histórico (LONSANE *et al.*, 1985). O autor fundamenta esta conclusão na vantagem comparativa no desenvolvimento das fermentações industriais no Japão em relação ao ocidente, assim como nos conhecimentos alcançados nos últimos anos sobre a FES que permitiram levar para diversos centros de investigação em todo o mundo, processos de produção econômicos e práticos de diversos metabólitos (enzimas, aromas, etanol, tetraciclinas e penicilinas, etc.), mesmo quando essa tecnologia utiliza leveduras e bactérias.

Existe muito pouca informação disponível no que diz respeito aos aspectos econômicos dos processos de FES. Este fato é consequência da confidencialidade com que são tratadas as informações nas empresas produtoras de metabólitos. Uma comparação detalhada da produção de glicoamilase por FES em relação à produção em meio líquido foi relatada por GHILDYAL *et al.* (1985). Este autor descobriu que em meio sólido se produzem 10 vezes mais enzimas que em meio líquido. A inversão total de capital assim

como os custos de produção para uma planta de 150 m³ de capacidade para a produção desta enzima por FES foram estimados entre 18% e 50% menores que os custos necessários para uma planta de fermentação em meio líquido com a mesma capacidade. A grande vantagem da FES consiste na inversão de recursos para compra de equipamentos e infra-estrutura são de ordem de 10% quando comparado com a fermentação em meio líquido.

SHAH *et al.*, (1991) descobriu que a produção de α -amilase de *Aspergillus oryzae* por FES empregando farelo de trigo como substrato foi mais eficiente e econômico que a produção em meio líquido.

A FES apresenta uma série de possibilidades socioeconômicas às comunidades rurais de países em desenvolvimento, pois permitem a utilização de processos com baixa complexidade tecnológica. De fato, muitos dos processos de FES que estão nesta categoria e que atualmente estão em uso, foram desenvolvidos, neste tipo de comunidade rural e formando parte da cultura tradicional desses povos. Esses processos normalmente permitem o aproveitamento de resíduos agrícolas, agroindustriais ou domésticos, pois melhoram a qualidade nutricional dos alimentos, preservam a qualidade de produtos agropecuários ou transformam esses subprodutos em alimentos apropriados para o consumo animal ou humano (SHAH *et al.*, 1991).

As aplicações de caráter comercial da FES incluem a produção em grande escala de enzimas e alimentos fermentados. Em relação a produção de enzimas por FES, esses processos devem competir em muitos casos e especialmente nos países do ocidente com a fermentação em meio líquido. A possibilidade de desenvolvimento de novos processos de FES é amplo e se baseia fundamentalmente nas vantagens comparativas que esta modalidade de fermentação apresenta sobre a fermentação líquida, assim como em obter uma eficiente exploração comercial dos processos tradicionais ou de interesses sócioeconômico. Segundo SOCCOL (1995) e LONSANE *et al.*, (1992) os novos campos de aplicação da FES de acordo com as suas potencialidades poderiam resumir-se em :

- a utilização de FES nos processos de produção de metabólitos fúngicos que habitualmente se produzem em meio líquido;

- a possibilidade de obtenção de metabólitos que dependem da diferenciação celular do micélio a qual normalmente está suprimida ou restringida na fermentação em meio líquido;
- a transferência de aplicação sócioeconômicas da FES aos países industrializados. Isto permitirá a cooperação e intercâmbio entre regiões pobres e desenvolvidas, além do mais permitirá explorar mercados para alimentos fermentados em países desenvolvidos o que resultaria em melhoras tecnológicas nos processos de elaboração tradicional;
- a aplicação de processos tradicionais no enriquecimento protéico dos alimentos, especialmente produtos agroindustriais com alto conteúdo de amido ou celulose. Estes podem ser utilizados diretamente na alimentação humana;
- a produção de metano através da digestão anaeróbia de dejetos humanos, animais ou resíduos sólidos em geral;
- a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos do solo como pesticidas e herbicidas por meio de microorganismos que requerem grandes quantidades de inóculo;
- na produção de enzimas industriais, o maior potencial consiste fundamentalmente na redução significativa dos custos de produção tanto de enzimas fúngicas como bacterianas e de leveduras; e
- no aproveitamento de diferentes resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato para obtenção de um produto de alto valor comercial como : hormônio vegetal, bioinseticidas, pigmentos naturais, aromas naturais, ácidos orgânicos, etc. (SOCCOL, 2001, *in press.*).

3.1.3 Variáveis do processo em fermentação em estado sólido (FES)

Nos estudos cinéticos da FES, a caracterização da produção de biomassa, o consumo de substrato e a disponibilidade de água no substrato-suporte, natureza e porosidade da partícula, etc. não têm recebido a mesma atenção que é dada à fermentação

em meio líquido. A causa disso é a dificuldade associada à determinação dos diferentes parâmetros que descrevem este tipo de fermentação.

A heterogeneidade dos meios empregados os quais são fontes nutricionais estruturalmente complexos, unida a falta de água livre e o seu consumo por parte do microorganismos facilita a geração de gradientes dificultando, as medidas e controle das variáveis da FES (PANDEY, 1992).

AIDOO *et al.*, (1982) descreveram que o baixo nível de desenvolvimento dos estudos cinéticos do crescimento microbiano na FES provêm fundamentalmente de três fatores: a complexidade da interação micélio substrato, a heterogeneidade intrínseca do substrato e a impossibilidade de obter uma determinação direta da biomassa.

No processo de FES pode-se considerar como variáveis críticas, em relação a seu controle e monitoramento, a transferência de calor, umidade, a_w , aeração e pH (PANDEY, 1992; PRIOR *et al.*, 1992).

Estas variáveis afetam de grande forma o desenvolvimento da fermentação em relação ao crescimento microbiano, consumo de substrato e a produção de metabólitos de interesse.

** Controle da temperatura na FES*

O principal problema operacional da FES está na liberação de calor produzido pela atividade microbiana durante a fermentação. A heterogeneidade do material sólido entra como formação de gradientes da temperatura e da forte atividade microbiana. A ausência de agitação pelo uso de fermentadores estáticos, a fraca condutibilidade térmica dos materiais biológicos são os principais responsáveis pela elevação da temperatura e conseqüente redução da atividade microbiana (HESSELTINE, 1987).

** Controle do pH*

O pH inicial de um meio de cultura sólido é ajustado com a adição de uma solução mineral que irá se impregnar no substrato-suporte. Neste meio é possível controlar o pH evitando assim variações que podem ser desfavoráveis ao crescimento do microorganismo.

RAIMBAULT e ALAZARD (1980) preconizam a utilização de sais minerais que dão ao meio de cultura um poder tamponante. Uma mistura de sulfato de amônio e de uréia em proporções adequadas permite a estabilização do pH dentro de valores favoráveis ao crescimento do *Aspergillus niger*.

O pH da fermentação pode afetar tanto no crescimento do microorganismo como na produção e estabilidade dos metabólitos obtidos. O controle do pH na FES é dificultado pela geração de gradientes característicos em determinados pontos do bioreator. Na FES, é possível fixar um valor de pH inicial para obter um rendimento ótimo, mas além desta condição inicial, o pH do meio sofrerá uma evolução durante a fermentação em razão da atividade metabólica do microorganismo, da fonte de nitrogênio utilizada e do grau de crescimento alcançado pelo cultivo que é de difícil controle. O controle desta variável na FES mediante soluções de álcalis ou ácidos tem-se mostrado pouco eficiente. Um certo grau de controle do pH na FES pode ser obtido através da aspersão de soluções de amônio e uréia (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980).

** Controle da umidade*

A relação água-massa troca-se constantemente durante a FES, devido a alteração estrutural do sistema, liberação dos produtos em reações enzimáticas e produção de água devido ao metabolismo respiratório celular afetando os resultados da fermentação (GRAJEK e GERVAIS, 1987; GERVAIS *et al.*, 1988). Todavia, o efeito do conteúdo de água é indicado na forma mais certa pela atividade de água (aw) que dá a idéia de água disponível para o microorganismo no sistema (BATTAGLINO *et al.*, 1991).

Os valores ótimos de umidade para o crescimento e utilização do substrato variam entre 40% e 70% dependendo do organismo e do substrato utilizado no processo. Por exemplo, no crescimento de *Aspergillus niger* em substratos amiláceos como mandioca (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980) e farelo de trigo (NISHIO *et al.*, 1979) foram utilizados com teores de umidade consideravelmente inferiores aos utilizados para polpa

de café (PENAZOLA *et al.*, 1985) e bagaço da cana de açúcar (ROUSSOS *et al.*, 1989), provavelmente devido a maior capacidade de retenção de água destes últimos substratos.

** Determinação da biomassa*

A determinação da biomassa é um dos pontos mais críticos da FES. As técnicas facilmente utilizadas em fermentação em meio líquido são impraticáveis na FES. As dosagens são difíceis em razão da interferência de métodos químicos e da heterogeneidade do meio. Normalmente os métodos de dosagem utilizados são os mesmos utilizados para proteínas, glicosamina, aminoácidos, ácidos nucleicos e pela precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético.

Na FES, a biomassa está associada ao substrato-suporte de tal forma que a separação física para sua quantificação não é facilitada. Recorre-se então ao emprego de técnicas indiretas de determinação, que se baseiam na correlação entre o enriquecimento do meio de cultivo com metabólitos provenientes da biomassa (glicosamina, proteínas, ergosterol, DNA, ATP, etc.) da mesma. Então, é de se entender que o problema a resolver para se obter um melhor entendimento destes sistemas, passa pela caracterização da cinética de produção de biomassa assim como no desenvolvimento de modelos matemáticos os quais são necessários para otimizar estes tipos de processos (RAMBAULT e ALAZARD, 1980; RODRIGUEZ-L.*et al.*, 1997).

O desenvolvimento da biomassa no leito da fermentação pode dar lugar a um aumento de temperatura. A FES, devido a sua alta densidade de substrato por unidade de volume gera no sistema maior quantidade de calor por unidade de volume que um cultivo líquido podendo-se elevar a temperatura, cessar e afetar a produção do metabólito de interesse (PRIOR *et al.*, 1992).

** Aeração e trocas de gases*

A aeração em FES se faz por ejeção de ar comprimido estéril através do leito de fermentação. As trocas gasosas são realizadas entre o ar e a matriz sólida. Em geral, o fluxo de ar empregado, é função do microorganismo estudado, da quantidade de O₂ consumido ou de CO₂ produzido, da espessura do leito de fermentação utilizado, da quantidade de calor gerado pelo metabolismo e dos metabólitos que devem ser produzidos (LONSANE *et al.*, 1985).

Na FES, o controle dos gases envolvidos é um fator importante no desenvolvimento dos microorganismos. Numa analogia com as reações catalíticas MOO-YOUNG *et al.*, (1983) distingue dois tipos de mecanismos na transferência de gases:

- a) a transferência interpartículas que se refere a trocas de massa por convecção entre a fase gasosa e a interface sólido para gás; e
- b) a transferência interpartículas que se refere a difusão de O₂ e de CO₂ entre as interface sólido/gasoso no interior da matriz sólida.

No lugar do material fibroso, existem espaços disponíveis favorecendo a difusão do O₂. Nos substratos amiláceos, os espaços são mínimos, por consequência dificulta a difusão do ar e limita o seu crescimento.

Uma alternativa, para resolver este problema, está na realização de pré-tratamentos que permitem a obtenção de substratos através de uma granulometria homogênea (SOCCOL *et al.*, 1994). Um bom sistema de aeração na FES permite:

- * manter as condições aeróbias durante toda fermentação;
- * manter a temperatura próxima do ideal através da remoção do calor de metabolismo celular; e
- * regular os níveis de umidade através da ejeção de ar saturado no leito de fermentação.

O reator mais simples utilizado em FES é do tipo bandeja. Este sistema está baseado no método tradicional da produção de “Koji” (AIDDO *et al.*, 1992). As características básicas deste sistema são:

- a) uma camada relativamente fina de substrato em uma área horizontal considerável;
- b) não existe aeração forçada, esta se vê facilitada pela convecção natural dos orifícios da bandeja;
- c) não se realiza mistura no leito fermentação (sistema estático);
- d) a temperatura e a umidade podem variar com as condições do ambiente que podem ser controladas.

As desvantagens deste sistema são as dificuldades para automatização do processo e pela grande área necessária para a realização de uma produção de grande escala. Contudo este tipo de sistema é sumamente simples e de baixo custo e vem sendo utilizado com sucesso na a produção comercial de alguns metabólitos (LONSANE *et al.*, 1992).

Um problema da FES que é minimizado com o sistema de fermentação em bandejas é o aumento da temperatura em um leito fermentativo de considerável espessura como já descrito acima. A pequena espessura do leito do substrato permite evitar o uso de aeração forçada que contribuem para elevar os custos do processo (MUDGETT, 1986).

A falta do controle da umidade neste tipo de bioreator representa também um problema pois poderá reduzir a crescimento microbiano assim como a produtividade dos metabólitos de interesse (SOCCOL & KRIEGER, 1998).

3.2 Proteases: conceito e classificação

Proteases são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise total de proteínas. A clivagem proteolítica das ligações peptídicas é uma das mais freqüentes e importantes modificações enzimáticas das proteínas (BEYNON e BOND 1989 ; HARTLEY, 1960).

Os avanços em técnicas analíticas têm demonstrado que proteases conduzem a altas especificidades e modificações seletivas de proteínas, tal como ativação de formas zimínogênicas de enzimas por proteólise limitada, processamento e transporte de proteínas secretórias através de membranas (GODFREY e WEST, 1996). Proteases são uma classe única de enzimas que

ocupam única posição central com relação às suas aplicações em ambas as áreas fisiológicas e comerciais (RAO *et al.*, 1998).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, proteases são classificadas no subgrupo 4 do grupo 3 (hidrolases) (International Union of Biochemistry, 1992). Entretanto, proteases não são facilmente agrupadas no sistema geral de nomenclatura enzimática, devido a sua enorme diversidade de ação e estrutura. As enzimas proteolíticas são classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico, serinas proteases utilizam serina para realizar suas funções catalíticas, outras utilizam cisteína (cisteína proteases), aspartato (aspartato protease) ou íons metálicos (metaloproteases) (HARTLEY, 1960). Proteases que hidrolisam ligações peptídicas dentro de uma cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases, e aquelas que quebram a ligação peptídica de aminoácidos COOH-(carboxi) ou NH₂-(amino) terminais são classificadas como exopeptidases (RAO e DESHPANDE, 1995; ARGOS, 1987; SAMPATH *et al.*, 1997).

3.2.1 Exopeptidases

3.2.1.1 Aminopeptidases

Aminopeptidases agem por removerem a N-terminação livre de cadeias polipeptídicas e liberam resíduos menores de aminoácidos, por exemplo dipeptídeo ou tripeptídeo (RAO *et al.*, 1998). Aminopeptidases são encontradas em uma ampla variedade de espécies microbianas inclusive bactérias e fungos. Em geral, aminopeptidases são enzimas intracelulares (KANG *et al.*, 1995), mas em um relato feito por SINGH *et al.*, (1994) verificaram uma aminopeptidase extracelular produzida por *Aspergillus orizae*. RAO *et al.*, (1998) observaram em seu estudo 2 tipos diferentes de aminopeptidases: Aminopeptidase I de *Escherichia coli* com alto peso molecular (400 kDa) que possui um amplo pH (7,5-10,5) para atividade ótima e requer Mg⁺² para essa atividade ótima, por outro lado aminopeptidase II de *B. stearothermophilus* é um dímero com peso molecular de 80 kDa a 100 kDa e é ativada por íons de Zn⁺², Mn⁺², ou Co⁺².

3.2.1.2 Carboxipeptidases

As carboxipeptidases agem nos grupos carboxi (COOH-) terminais de cadeias polipeptídicas e liberam aminoácidos simples ou dipeptídeos. Carboxipeptidases podem ser divididas em três grupos principais, carboxipeptidases serina, metalocarboxipeptidases, e carboxipeptidases cisteína, baseado na natureza dos resíduos de aminoácido no sítio ativo das enzimas (RAO *et al.*, 1998). As carboxipeptidases serina isoladas de *Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp., *Aspergillus* spp. são semelhantes quanto aos seus substratos específicos mas diferem ligeiramente em outras propriedades como pH ótimo, estabilidade, peso molecular, e efeito de inibidores. As carboxipeptidases cisteína geralmente exercem atividade somente na presença de grupos redutores como HCN ou cisteína. Metalocarboxipeptidases de *Saccharomyces* spp. e *Pseudomonas* spp. requerem íons de Zn^{+2} ou Co^{+2} para suas atividades (HARTLEY, 1960; NEURATH, 1996; FASTREZ e FERHST, 1973).

3.2.2 Endopeptidases

3.2.2.1 Serina proteases

Serina proteases são uma família de enzimas que utilizam um único resíduo de serina ativada no sítio de ligação ao substrato para, cataliticamente, hidrolisar ligações peptídicas (WARD, 1991). Essa serina pode ser caracterizada pela reação irreversível do grupo hidroxila de sua cadeia lateral com diisopropilfluorofosfato (DFP), de todas as serinas da proteína, DFP reage somente com a serina cataliticamente ativa, formando um éster de fosfato (FOX *et al.*, 1991).

São numerosas e difundidas entre vírus, bactérias, e eucariontes, o que sugere que elas sejam vitais aos organismos. Podem ser encontradas em exopeptidases, endopeptidases, sendo mais frequentes nas segundas (RAO *et al.*, 1998; POLDERMANS, 1990).

Podem ser reconhecidas por sua inibição irreversível pela 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E.64), diisopropilfluorofosfato (DFP), fenilmetanosulfona fluoreto (PMSF) e tiosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Algumas serinas são inibidas pelos reagentes tióis assim como pelo p-

cloromercuriobenzoato (PCMB) (FISCHER e THOMPSON., 1979 ; HASNAIN *et al.*, 1992 ; USHA *et al.*, 1996). São, geralmente, ativas em pH neutro ou alcalino. Com pH ótimo entre 6 e 11. Elas têm uma ampla especificidade pelo substrato incluindo atividade esteriolítica e amidase, a massa molecular varia 18 A 35 kDa (YOUNG *et al.*, 1996 ; RAO *et al.*,1998). O ponto isoelétrico das serina proteases está geralmente entre pH 4 e 6 (RAO *et al.*, 1998). Proteases alcalinas que são altamente ativas em pH alcalino representam o subgrupo mais abundante das serina proteases (WARD, 1991). BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1987) purificaram uma serina protease secretada pela *Beauveria bassiana*, sendo que esta protease foi inibida em 95% por PMSF, e ainda por HgCl₂, mas não por iodoacetamida, levando os autores a sugerirem que o grupo sulfidrílico não se encontra localizado no sitio ativo da enzima. A temperatura ótima para exercer sua atividade enzimática é de 37 °C a 42 °C, foi estável por 40 minutos a 27 °C, mas foi inativada a temperaturas mais altas, havendo aproximadamente ainda 40% de atividade após 30 minutos a 40 °C ou depois de 5 minutos a 50 °C. A temperatura de 60°C a protease foi rapidamente inativada em 5 minutos.

COLE *et al.*, (1993) purificaram e caracterizaram parcialmente 2 proteases de *Metarthizium anisopliae*. Uma das proteases, com ponto isoelétrico de 5,4 e massa molecular de 28,8 kDa, foi inibida em 100% por PSMF, sendo classificada como uma "clássica" tripsina acompanhando a classe das serinas proteases. A outra protease com ponto isoelétrico de 4,6 e massa molecular de 26,7 kDa foi inibida por ácido iodoacético (46%), PCMB (78%), e DTNB (98%) e foi ativada por ditiotreitól e 2-mercaptoetanol. Como esta enzima foi inibida por reagentes tióis e sua atividade aumentou pela presença de agentes redutores foi classificada como cisteína protease.

Agentes redutores DTT e cisteína inibiram a atividade proteolítica de *Rhizophydium* sp. O reagente sulfidrílico PCMB também causou um decréscimo nos níveis da atividade proteolítica. Para KRARUP *et al.*, (1994) isto significava que as pontes dissulfeto apresentavam efeito estabilizante sobre a enzima e a inibição por PCMB seria devida à quebra das pontes acompanhada pela reação entre PCMB e os resíduos de cisteína.

CARMONA *et al.*, (1995) caracterizaram a protease extracelular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A atividade de peptidase extracelular do fungo foi máxima em pH 9,0 e foi irreversivelmente inibida por PMSF, acetato de mercúrio e p-hidroximercuribenzoato.

A inibição por compostos mercuriais foi parcialmente revertida por cisteína/EDTA. O butano-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) (E-64) foi um fraco e reversível inibidor, entretanto o EDTA e a pepstatina não tiveram ação sobre esta protease. Considerando que a protease do fungo *P. brasiliensis* era homogênea os autores sugeriram que a enzima seria da subfamília das serinas contendo grupos SH. A massa molecular aparente da enzima nativa carboxipeptidase 3 (CP3) de *Mucor racemosus* foi estimada por filtração em gel em 52 kDa (DiSANTO *et al.*, 1992 ; NORTH, 1982). Utilizando um inibidor marcado [H3] DFP, os autores observaram que o resíduo do sítio catalítico está sobre uma pequena subunidade de carboxipeptidase. A CP3 (carboxipeptidase 3 foi classificada como serina protease, desde que sua atividade catalítica foi bloqueada por inibidores de serina proteases como PMSF 100 μ M(72%), DFP 0,6 μ M (96%) e 3-4 dicloro Socoumarin (DCI) 10 μ M (96%). A enzima foi fortemente inibida por compostos mercuriais como PCMB 0,1 μ M (96%), com temperatura ótima para atividade enzimática de 45°C e o pH ótimo de 6,5.

3.2.2.2 Aspártico proteases

Aspártico proteases, comumente conhecidas como proteases ácidas, são endopeptidases que dependem dos resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica (LOWTHER *et al.*, 1995 ; LEE *et al.*, 1995). A maior parte das aspártico proteases mostram atividade máxima em pH baixo (pH 3 a 4) e tem pontos isoelétricos de pH 3 a 4,5. Sua massa molecular oscila de 30 a 45 kDa (RAO *et al.*, 1998 ; PEARL, 1987). Esta classe de proteases são inibidas pela pepstatina, também são sensíveis a componentes diazocetônicos como diazoacetil-dl-norleucina metil éster (DAN) e 1,2-epoxi-3-(p-nitrofeoxi)propano (EPNP) na presença de íons de cobre (MONOD *et al.*, 1994 ; MILLER *et al.*, 1989 ; KUN-HEE *et al.*, 1999). Podem ser divididas amplamente em dois grupos, (i) como pepsina enzimas produzidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, e *Neurospora* e (ii) como renina enzimas produzidas por *Endothia* e *Mucor* spp. (LEE *et al.*, 1995 ; LOWTHER *et al.*, 1995). A purificação e caracterização de uma protease, em cultivos com substrato sólido, de *Phanerochaete chrysosporium* foi descrita por DATTA (1992) e TAKEUCHI *et al.*, (1995). A proteína purificada tem uma massa molecular em torno de 40 kDa em

eletroforese com SDS. O seu ponto isoeletrico é de 5,6 e o pH ótimo de 4,0. A enzima proteolítica foi totalmente inibida por Hg^{2+} , ácido p-hidroximercuribenzoato e N-bromomosuccinamida, mas foi insensível ao PMSF, pepstatina A e EDTA. A ligação da protease com concanavalina A indica que ela é uma glicoproteína. Os dados sugerem propriedades de proteases tipo aspártica proteases.

TSUSHIMA *et al.*, (1994) utilizaram 2 μM de pepstatina e obtiveram uma inibição de 100% em proteinase aspártica de *Candida albicans*.

TSUJITA e ENDO (1980) e SEKINE (1998), isolaram várias formas moleculares de proteases ácidas de *Aspergillus oryzae* que possuem as mesmas propriedades catalíticas tais como pH ótimo, ativação por tripsinogênio pancreático bovino e inativação por baixas concentrações sódio dodecil sulfonato. As massas moleculares das proteases ácidas de *Aspergillus oryzae* variaram entre 32 kDa e 150 kDa, em função do conteúdo de carboidratos.

O fungo ectomicorrizico *Hebeloma crustuliniforme* (ZHU *et al.*, 1994) foi cultivado em meio MMN líquido de composição definida contendo diferentes combinações de amônia, glucose e soro albumina bovina (BSA) como fonte de carbono e de nitrogênio. A produção de protease extracelular foi máxima em meio contendo BSA como fonte de nitrogênio. O pH ótimo para a produção de protease ficou na faixa de 4,0 a 5,0. No pH 3,0 o fungo produziu 10% a menos de massa micelial do que no pH 5,0, embora a produção de protease por mg de peso seco não tenha sido afetada. A produção de protease é dependente do pH, sendo máxima em pH 3,0, correspondente ao pH ótimo da enzima e dentro da faixa de pH em que ela é estável.

SINGH *et al.*, (1994), estudando a produção de proteases ácidas de *Aspergillus niger* encontraram um pH ótimo de 4,0 para a atividade enzimática e uma atividade máxima a 60°C, conservando 60% da atividade a 80°C. A protease ácida de *Penicillium expansum* foi estável somente a 45°C, entretanto as enzimas de *Aspergillus oryzae* e as de *Aspergillus claudii* perderam suas atividades em temperaturas superiores a 40°C. Foi determinado o pH ótimo para a atividade proteásica ácida dos seguintes fungos: *Aspergillus saitoi*: 3,0 a 4,5, *Aspergillus oryzae*: 3,0 a 4,0, *Paecilomyces varioti*: 3,5 a 5,5, *Mucor pusillus*: 3,5 a 4,5 e *Rhizopus oligosporus*: 3,3 (FARLEY, 1992).

A protease ácida do fungo *Phycomyces blakesleeanus* foi purificada e caracterizada por De VICENTE *et al.*, (1996), a massa molecular da enzima nativa foi estimada por filtração em

gel, como sendo de 40 kDa. O ponto isoelétrico da protease foi estimado em 4,2 e pH ótimo de 2,5 e temperatura ótima de 70° C, usando a hemoglobina como substrato. A atividade enzimática foi fortemente inibida por pesptatina A, um inibidor universal de proteases aspárticas. Os dados da análise realizada indicam existência de inibição competitiva.

3.2.2.3 Cisteína proteases

Cisteína proteases aparecem em procariontes e eucariontes. Existem cerca de 20 famílias já reconhecidas. A atividade de todas as cisteína proteases depende de um ativador catalítico que baseia-se na cisteína e histidina. A ordem dos resíduos de Cys e His (Cys-His ou His-Cys) difere entre as famílias (PERLMANN, 1990 ; RAO *et al.*, 1998).

Geralmente, as cisteína proteases são ativadas apenas na presença de agentes redutores como HCN ou cisteína (BEYNON e BOND, 1989). Baseado em sua especificidade segundo o lado da cadeia, elas são amplamente divididas em 4 grupos: (i) papaína, (ii) tripsina com preferência por clivagem em resíduos de arginina, (iii) ácido glutâmico específicas, e (iv) outras. Papaína é a cisteína protease mais conhecida (PAVLUKOVA *et al.*, 1998 ; RAO *et al.*, 1998) . Esta protease tem um pH ótimo neutro, embora poucas proteases têm máxima ação em pH ácido. Elas são sensíveis a agentes sulfidrilicos como PCMB mas não são afetadas por DFP e agentes metal-quelantes (FOX *et al.*, 1991 ; POLGAR, 1999). Clostripaina, produzida pela bactéria anaeróbica *Clostridium histolyticum*, exibe uma seletividade restrita por resíduos de arginina e no lado na porção carboxil de ligações densa e diferem da papaína na sua necessidade por cálcio. Clostripaina tem um ponto isoelétrico de pH 4,9 e massa molecular de 50kDa, enquanto que o ponto isoelétrico e massa molecular da streptopaina são pH 8,4 e 32kDa, respectivamente (KANG *et al.*, 1995 ; KALISZ, 1988 ; RAO *et al.*, 1998). GRONINGER e EKLUND (1966) e KHAN *et al.*, (1994) estudaram a enzima proteolítica do fungo *Trichosporon* sp, observaram a atividade contra os substratos caseína e hemoglobina, a falta de ação contra soro albumina bovina e lisozima. O pH ótimo da enzima oscilou entre 5,8 a 6,2. A inibição ocorreu totalmente com 1mM de PCMB e foi levemente ativada por 10 mM de cisteína, 0,1 mM EDTA e 0,1 mM de Co^{+2} . Com concentrações de 10 mM de Co^{+2} . e 0,1 mM de PMSF foi levemente inibida. O aquecimento a 60°C por 10 minutos inativou completamente a proteinase. BIDOCHKA e

KHACHATOURIANS (1988), determinaram o pH ótimo de 8,5 para a atividade básica de *Beauveria bassiana* tendo como substrato azocoll e observaram que a atividade diminuía para os valores de pH abaixo de 7,0 e acima de 9,0. A protease manteve-se estável ao pH entre os valores de 5,5 a 12,0.

3.2.2.4 Metaloproteases

Metaloproteases são as mais diversas das proteases catalíticas. Elas são caracterizadas por dependerem de íons de metais bivalentes na sua atividade. Elas incluem enzimas de várias origens como collagenases dos organismos superiores, toxinas hemorrágicas de veneno de cobra, e termolisina das bactérias. Cerca de 30 famílias de metaloprotease são conhecidas, das quais 17 possuem apenas endopeptidases, 12 apenas exopeptidases, e 1 contém ambas endo e exopeptidases (SIDORENKOV *et al.*, 1995 ; RAO *et al.*, 1998; TURKIEWICZ, *et al.*, 1999).

As metaloproteases neutras têm maior especificidade por aminoácidos hidrofóbicos, enquanto que as alcalinas possuem uma especificidade mais vasta. Todas são inibidas por agentes quelantes como EDTA mas não por agentes sulfidrílicos ou DFP (SLOMA *et al.*, 1990) .

Metaloproteases produzidas por *B. stearothermophilus* são um peptídeo simples sem pontes de sulfidrina e tem uma massa molecular de 34 kDa. É uma protease Ca^{+2} dependente e muito estável, com tempo de meia vida de 1 hora a 80°C (RAO *et al.*, 1998 ; SAUL *et al.*, 1996).

Colagenase, importante metaloprotease, foi a primeira descoberta no caldo da bactéria anaeróbica *Clostridium hystolyticum* como um componente de produtos tóxicos. Mais tarde, foi encontrada na produção da bactéria aeróbica *Achromobacter iophagus* e outros microorganismos incluindo fungos. A ação da colagenase é muito específica, atua apenas no colágeno e gelatina e não em qualquer substrato protéico usual (MARKARIAN, *et al.*, 1994; COIMBRA *et al.*, 1994). Elastase produzida pela *Pseudomonas aeruginosa* é outra enzima importante da família metaloprotease neutra. As alcalina metaloproteases produzidas pela *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp. são ativas em pH 7 a 9 e têm massa molecular entre 48 a 60 kDa (POLDERMANS, 1990 ; RAO *et al.*, 1998).

Proteases I neutra de *Aspergillus oryzae* possui massa molecular entre 41 kDa um pH ótimo em torno de 7,0 e a faixa de estabilidade de pH entre 5,5 a 12. A enzima foi inibida em 100% por EDTA 0,01M mas não foi inibida por DFP (diisopropilfosfluoreto) 0,01M (NAKADAI *et al.*, 1973 ; GODFREY e WEST., 1996).

GRIPON *et al.*, (1980) sugerem que enzimas de *Penicillium caseicolum*, *Penicillium roqueforti*, a protease II neutra de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae* recebam o nome metaloproteases ácidas, por representarem uma classe distinta, com um pH ótimo baixo (5,0 a 6,0), massas moleculares de 19 a 20 kDa e por terem uma especificidade diferente em relação a oxidação da cadeia β da insulina, comparada a metaloprotease neutra.

MARKARYAN *et al.*, (1994), na caracterização da metaloprotease do fungo *Aspergillus fumigatus* observaram a influência da temperatura entre 30°C a 85°C. A atividade ótima com o substrato azocaseína foi obtida a 60°C. A termoestabilidade da metaloprotease foi medida a 60°C. A enzima perdeu cerca de 50% de atividade durante a incubação a 60°C por uma hora.

A enzima proteolítica do fungo *Rhizophydium sphaerotheca* foi severamente inibida na presença de EGTA no substrato. A adição de um excesso de Ca^{+2} restaurou quase toda a atividade enzimática, sugerindo que pelo menos uma das proteases do complexo proteolítico de *R. sphaerotheca* é uma metaloprotease estabilizada pelo Ca^{+2} (KRARUP *et al.*, 1994).

3.3 Mecanismo de ação de proteases

O mecanismo de ação de proteases tem sido um assunto de grande interesse para os pesquisadores. A purificação de proteases é um pré-requisito para o estudo de seus mecanismos de ação, diversos processos de purificação de proteases envolvendo cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, e técnicas de filtração em gel, têm sido documentados (VANDERSLICE, *et al.*, 1989; PHADATARE *et al.*, 1992 ; GODFREY e WEST, 1996; RAO *et al.*, 1998).

O sítio catalítico das proteases é ladeado em um ou ambos os lados por subsítios específicos, cada um capaz de acomodar a cadeia lateral de um único resíduo de aminoácido do substrato. Esses sítios são numerados a partir do sítio catalítico S1 até Sn sobre o N terminal da

estrutura e S'1 até S'n sobre o C terminal. Os resíduos que eles acomodam a partir do substrato são numerados de P1 até Pn e P'1 até P'n, respectivamente (Figura 01).

Protease	N	Sn-----	S ₃ ----	S ₂ ----	S ₁ ✕	S' ₁ ----	S' ₂ ----	S' ₃ ----	S'n	C
Substrato	N	Pn-----	P ₃ ----	P ₂ ----	P ₁ ✕	P' ₁ ----	P' ₂ ----	P' ₃ ----	P'n	C

Figura 01: Sítios ativos de proteases. O sítio catalítico das proteases é indicado por ✕ e a ruptura da ligação indicada por ✕; S₁ até S_n e S'₁ até S'n são os subsítios específicos da enzima, enquanto P₁ até P'n e P'₁ até P'n são os resíduos do substrato acomodado pelo subsítio da enzima

Fonte: RAO *et al.*, (1998).

Muitas serina proteases preferem hidrolisar ligações peptídicas adjacentes a um aminoácido específico (GODFREY e WEST, 1996). A serina protease tripsina quebra em seguida aminoácidos básicos, como arginina e lisina, e a quimotripsina quebra ligações peptídicas em seguida a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como triptofano, fenilalanina, tirosina e leucina. A elastase quebra ligações peptídicas em seguida a resíduos como alanina (RAO *et al.*, 1998). Uma serina protease pode ser chamada tipo tripsina, se quebrar ligações peptídicas de lisina e arginina; tipo quimotripsina, se quebrar aminoácidos aromáticos, e tipo elastase, se hidrolisar aminoácidos que possuam cadeias laterais pequenas, como a alanina (GODFREY e WEST, 1996). A especificidade por um certo tipo de aminoácido indica sua preferência relativa. Portanto, a especificidade de hidrólise da ligação peptídica de um tipo particular de aminoácido, pode não ser absoluta, mas pode ser melhor descrita como uma faixa de alvos mais prováveis (MURO *et al.*, 1984; LICHENSTEIN, 1993 ; RAO *et al.*, 1998).

Estudos detalhados sobre a especificidade das serina proteases por uma ligação peptídica em particular foram feitos com substratos sintéticos, com menos de 10 aminoácidos (RAO *et al.*, 1998). Como esses substratos são significativamente menores que os substratos naturais, interagem apenas com o sítio catalítico e, por isso, são ditos dirigidos a sítio ativo. Estudos com substratos pequenos e com inibidores indicam que o sítio de hidrólise é flanqueado por, aproximadamente, quatro resíduos de aminoácidos, em ambas as direções, que se ligam à enzima e interferem com a reatividade da ligação a ser hidrolisada (LICHENSTEIN, 1993 ; EL-RAHEEM *et al.*, 1995).

Proteínas específicas inibem as atividades das serina proteases, depois de terem desempenhado seu papel fisiológico. Os inibidores naturais das serina proteases são denominados serpinas, em referência a *serine protease inhibitors* (inibidores de serina protease). Essa família de inibidores ocorre em animais que possuem proteases mas, surpreendentemente, tais inibidores também são encontrados em plantas, que não as possuem (PERLMANN *et al.*, 1990).

Muitas serinas proteases sofrem autólise ou auto- hidrólise. Às vezes a auto-reação leva à clivagem de ligações peptídicas específicas e ativação da atividade catalítica. Outras vezes, a autólise leva à inutilização da protease (POLDERMANS, 1990 ; VANDERSLICE *et al.*, 1989).

3.4 Funções Fisiológicas e Importância das Enzimas Proteolíticas (Proteases)

As proteases exercem uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e funções regulatórias é evidente pela sua ação em todas as formas de vida (NEURATH, 1996). Proteases desempenham uma função crítica em muitos processos fisiológicos e patológicos atuando, por exemplo, na coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, desenvolvimento na morfogênese, inflamação, crescimento tumoral e metástase, ativação de zimógenos, liberação de hormônios, e ativa, farmacologicamente, peptídeos de proteínas precursoras e transporte de proteínas secretoras através de membranas. Em geral proteínas extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas para moléculas menores para subsequente absorção pelas células, já que proteases intracelulares desempenham o papel crítico na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998). Em contraste com as várias funções atribuídas às proteases os conhecimentos sobre os mecanismos de ação pelos quais as proteases atuam são limitados (WARD, 1991 ; PERLMANN *et al.*, 1990).

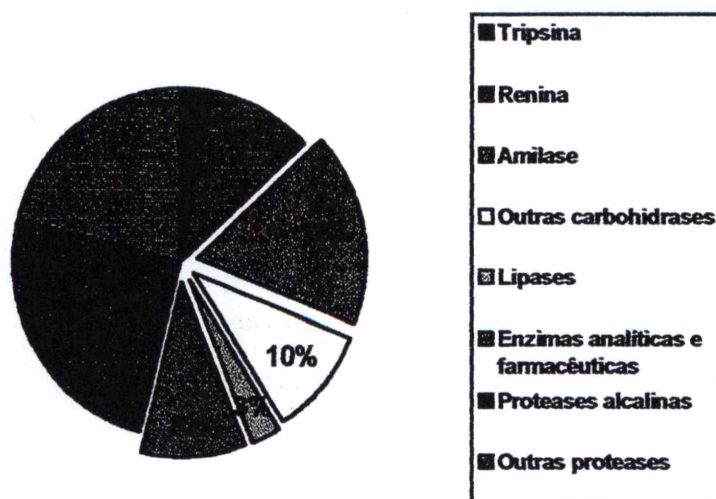


Figura 2 : Mercado mundial de enzimas.

Investigações da cinética, especificidade e inibição das proteases, junto com as análises detalhadas de sua sequência de aminoácidos e da sua estrutura em raios-X, têm liderado a identificação dos componentes e geometria de seus sítios ativos. Enzimas proteolíticas são também o maior instrumento nas análises de sequência de proteínas, na identificação e isolamento de domínios do complexo multifuncional. Com o advento da biologia molecular, uma nova dimensão têm sido adicionada ao estudo das proteases pela clonagem e sequenciamento dos DNAs correspondentes. Tais informações contribuem significativamente para o entendimento da organização do domínio, função e evolução de proteases (THOMAS, *et al.*, 1985; RAO *et al.*, 1998 ; GODFREY *et al.*, 1996).

O valor estimado da venda mundial anual de enzimas industriais é de 1 bilhão de dólares. As proteases representam um dos três mais importantes grupos de enzimas industriais e cerca de 60% da venda mundial de enzimas, (Figura 2). Elas realizam uma ampla variedade de funções, tendo um longo histórico de aplicação em indústrias de alimentos e detergentes (RAO e

DESHPANDE, 1995).

A vasta diversidade de proteases em contraste com a especificidade da sua ação atrai a atenção mundial na tentativa de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (FOX, 1991 e POLDERMANS, 1990).

3.5 Microorganismos produtores de proteases

Muitas proteases têm sido produzidas a partir de fungos e bactérias (KOMINAMI *et al.*, 1981; COWAN *et al.*, 1987; TSUCHIYA *et al.*, 1987). Os microorganismos produzem uma enorme gama de enzimas potencialmente úteis. São capazes de se desenvolverem facilmente e rapidamente em um meio de cultivo (GACESA e HUBBLE, 1990 ; GIMENEZ *et al.*, 2000). A incapacidade das proteases de plantas e animais suprir a demanda mundial tem feito crescer o interesse pelas proteases de microorganismos.

Microorganismos representam uma excelente fonte de enzimas com ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade para a manipulação genética. As proteases microbianas somam aproximadamente 40% do total do comércio de enzimas no mundo. Proteases de origem microbiana são preferidas em relação às de origem animal e vegetal sendo que na maioria, todas possuem características atraentes para aplicações biotecnológicas (BU'LOCK, *et al.*, 1991; GACESA e HUBBLE, 1990; RAO *et al.*, 1998).

As proteases de certas bactérias de natureza alcalifílicas têm se demonstrado efetivas em diversos processos tais como: a remoção de pêlos no processamento do couro, aditivos para detergentes, coagulantes de leite. Bactérias como os *Actinomicetos* são particularmente eficientes na quebra de proteínas do solo, produzindo proteases, e o conhecimento em relação a estas enzimas é ainda muito reduzido, comparado ao de fungos e bactérias (TSUJIBO *et al.*, 1990; ANWAR *et al.*, 1998).

Os fungos produzem uma variedade maior de enzimas do que as bactérias. Por exemplo, *Aspergillus oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas.

As proteases fúngicas são ativas numa faixa maior de pH (pH 4 a 11) e demonstram grande seletividade por seus substratos, mas eles têm uma menor taxa de reação e pior tolerância

ao calor que enzimas bacterianas (WAINWRIGHT, 1995; PAVLUKOVA *et al.*, 1998). Podem ser produzidas enzimas de fungos, convenientemente, em processos de fermentação no estado sólido (MITRA e CHANDRA, 1994).

As vantagens das enzimas microbianas são muitas, ou seja econômicas e técnicas. Econômicas de processamento, porque suas produções podem ser feitas em grande escala; a quantidade de produto que pode ser obtido em uma superfície pequena em reduzido espaço de tempo supera, muitas vezes o que pode ser conseguido de enzimas animais e vegetais; e pela facilidade de extração no meio de cultivo (GACESA e HUBBLE, 1990 ; KANG *et al.*, 1995). As técnicas de processamento de enzimas com microorganismos são mais vantajosas para a produção do que com animais e vegetais, pois existe uma variedade de vias metabólicas (portanto de enzimas) de uma só espécie, que crescem em amplo intervalo de pH, temperaturas, natureza e concentração de substratos, fazendo com que se encontre enzimas estáveis nas condições extremas (TREVAN, 1990 ; GUPTA *et al.*, 1999).

3.6 Aplicações de enzimas proteolíticas

Proteases possuem uma grande variedade de aplicações principalmente em indústrias de detergentes e alimentos. Uma tendência mais recente é o desenvolvimento de tecnologias que não provoquem danos ambientais, e as proteases têm extensas aplicações na indústria do couro, no tratamento para depilação e amaciamento da pele em substituição aos atuais processos que utilizam produtos químicos (PHADATARE *et al.*, 1993; RAO e DESHPANDE, 1995). São utilizadas também em vários processos de bioremediação. A demanda mundial dessas enzimas para aplicações específicas varia consideravelmente. As proteases utilizadas em indústrias alimentícias e químicas são preparadas em grande quantidade e usadas como preparações brutas, enquanto que aquelas usadas em medicina são produzidas em pequena quantidade mas requerem purificação extensiva antes de serem utilizadas (RAO *et al.*, 1998; BARRET *et al.*, 1975).

As proteases são um padrão nos ingredientes de todos os tipos de detergentes. Nos detergentes domésticos, reagentes para limpeza de lentes de contacto ou prótese dentária. O uso

das proteases em detergentes de lavanderia responde por aproximadamente 25% do total das vendas mundiais.

A primeira preparação de detergente enzimático, “Burnus”, datada de 1913 consistia de carbonato de sódio e extrato pancreático animal cru. O primeiro detergente contendo enzimas bacterianas foi introduzido em 1956 e comercializado com o nome BIO-40. A protease ideal para detergente é aquela que possui ampla especificidade a substratos para facilitar a remoção de uma grande variedade de manchas decorrentes de alimentos, sangue, e outras secreções corpóreas. A atividade e a estabilidade a altos valores de pH e temperatura, assim como a compatibilidade com outros agentes oxidantes e branqueadores adicionados aos detergentes, estão entre os maiores pré-requisitos para o uso de proteases em detergentes (BHOSALE *et al.*, 1995 ; ANWAR *et al.*, 1998).

Serinas proteases produzidas por amostras de *Bacillus*, atualmente são usadas na fabricação de detergentes. Proteases alcalinas produzidas por fungos são vantajosas devido a facilidade nos processos de “downstream”, obtendo uma enzima livre de microrganismo (PHADATARE *et al.*, 1993 ; SHARON *et al.*, 1986; IZOTOVA *et al.*, 1983).

Podem ser utilizadas como biocatalisadores em meio de solvente orgânico, e neste caso, catalisam também reações de síntese. A produção de péptidos de cadeia curta e seus derivados, utilizando-se proteases, constitui uma categoria importante das atividades atuais da Indústria Biotecnológica. A importância destes compostos em áreas como a da pesquisa biomédica, o desenvolvimento de fármacos e a indústria alimentícia tem sido implementada progressivamente, encontrando-se atualmente em rápida expansão. Tradicionalmente estes péptidos têm sido produzidos por via química, apresentando limitações importantes nomeadamente a ocorrência de reações laterais com a formação de produtos indesejáveis e a dificuldade em obter produtos opticamente puros. A utilização de enzimas permite contornar esta desvantagens ao utilizar a elevada estereoseletividade destes biocatalisadores (RICHARDS *et al.*, 1993; HERRMANN, *et al.*, 1991)

3.7 Fungos

Há milhares de anos, o homem faz o uso da microbiologia aplicada, mesmo sem ter consciência da existência dos microorganismos (LIMA *et al.*, 1975 ; BROW *et al.*, 1989 ; GODFREY *et al.*, 1996).

Antigamente alguns autores os consideravam como plantas, outros como microorganismos; mas hoje são classificados como um reino próprio, o chamado terceiro reino. São eucariotas possuindo núcleo com membrana, mitocôndrias, retículo endoplasmático com ribossomos aderidos ou não, em geral tem numerosos vacúolos com glicogênio e lipídeo, na grande maioria são considerados quimioheterótrofos incapazes de realizar a fotossíntese, necessitando substratos ricos em energia (WAINWRIGHT, 1995; RAO *et al.*, 1998). Os fungos crescem tipicamente na natureza em substratos sólidos, como pedaços de madeira, sementes, árvores, raízes, restos de plantas, partes secas de animais (couro, chifres, material fecal), etc. (LIMA *et al.*, 1975; MITRA, 1996 ; MORAES, *et al.*, 1988). É conveniente distinguir os fungos em dois grandes grupos: os bolores e as leveduras. Essa distinção não tem qualquer valor taxonômico, pois bolores e leveduras podem ser encontrados nos mesmos grupos de fungos (MIMS, 1995; RAO *et al.*, 1998; SCRIBAN, 1985).

Industrialmente são igualmente importantes as leveduras unicelulares e os fungos que crescem como filamentos denominados hifas, estas rígidas e ramificadas (WAINWRIGHT, 1995 ; MITRA, 1996 ; GIMENEZ *et al.*, 2000).

Os fungos, quando não controlados, são prejudiciais à economia , ou seja, podem deteriorar alimentos, serem responsáveis por infecções ou intoxicações em humanos e animais. Nas contaminações maciças, os bolores quando proliferam sobre os alimentos, modificam seus caracteres físicos, químicos e organolépticos, razão pela qual são feitos a profilaxia e o pré-tratamento para evitar o aparecimento do bolor, que constitui um dos grandes problemas industriais em termos econômicos . Apesar do queijo ser produzido tecnologicamente pela ação de fungos não patogênicos, é um dos alimentos frequentemente contaminados, e, geralmente por espécies toxígenas do gênero *Penicillium*. Os prejuízos econômicos decorrentes da contaminação fúngica nos derivados do leite são incalculáveis, pois, comprometem a qualidade do produto,

além da possibilidade do acúmulo de micotoxinas que colocariam em risco a saúde dos consumidores. Porém, quando se tem controle sobre as contaminações, as atividades benéficas ultrapassam em muito os aspectos negativos que os fungos produzem (WAINWRIGHT, 1995 ; NORBERG, *et al.*, 1993; WARD, 1991; WISEMAN, 1991).

Os fungos mais importantes usados nas fermentações industriais são classificados em dois grupos : os Zygomycotina (ordem Mucorales), asseptados, como os gêneros *Mucor* e *Rhizopus*, e os Deuteromycotina (ordem Moniales), septados, ou Fungi *Imperfecti*, por exemplo, os *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* e *Fusarium*. O gênero *Penicillium* forma micélios soltos em substratos sólidos ou líquidos, ligeiramente coloridos; as espécies desse microorganismo são cosmopolitas, freqüentemente denominados mofos cinzas ou azuis, e se encontram contaminando frutas cítricas ou produzindo deterioração sobre o queijo refrigerado e outros alimentos. Também produzem uma ampla variedade de enzimas extracelulares devido sua grande diversidade bioquímica e susceptibilidade para manipulação genética, e podem utilizar a maior parte dos substratos orgânicos que existe na natureza (celulose, quitina, amido, açúcares, hemicelulose, e lignina), como também álcoois, hidrocarbonetos e glicerol, entre outros já citados, como também produzem ataques sobre o couro e tecidos (PAVLUKOVA *et al.*, 1998 ; RAO *et al.*, 1998).

Entre as razões pelo qual são usados microorganismos na produção de enzimas, pode-se mencionar a facilidade de cultivá-los em maior quantidade, a velocidade com que crescem, o baixo custo dos constituintes gerais do meio de cultivo, como por exemplo, resíduos ou produtos agrícolas e agroindustriais de baixo custo, a grande diversidade de tipos de metabólitos produzidos de interesse comercial, que por sua vez dá lugar a uma diversidade de novos produtos (BROW *et al.*, 1989 ; RAO *et al.*, 1998; WAINWRIGHT, 1995).

O crescimento dos microorganismos se faz necessário em quase todos os processos de fermentação. A velocidade de crescimento varia com o tipo de célula microbiana e as condições meio ambientais físicas e químicas. As reações químicas e enzimáticas dependem de algumas variáveis de fermentação como: a temperatura, sendo que a maioria cresce entre 25 °C e 30 °C, dependendo de sua natureza existe uma temperatura ótima, esse crescimento depende da atividade de água ou da umidade relativa, sendo que microorganismos que crescem bem em sistemas sólidos são aqueles que toleram uma baixa atividade de água e como em qualquer

reação química, o crescimento também depende da concentração de nutrientes químicos, o pH também influi no crescimento microbiano da mesma forma que o faz na atividade enzimática, a maioria cresce dentro de um intervalo de pH entre 3 e 4, porém, o pH ótimo varia dependendo de cada organismo em questão (WARD, 1991; RAO *et al.*, 1998 ; WAINWRIGHT, 1995).

As tecnologias tradicionais que empregam os fungos incluem variadas produções, os avanços iluminam o interesse potencial dos fungos manipulados geneticamente, ampliando suas aplicações na biotecnologia (WARD, 1991). O crescimento do microorganismo leva à geração de numerosos metabólitos secundários, esses podem ser classificados como metabólitos gerais, que são produzidos por um grande número de microorganismos, ou como metabólitos especializados, que são produzidos por um número restrito de espécies (WAINWRIGHT, 1995). Os fungos produzem uma ampla variedade que cobrem a gama completa de necessidades catalíticas como, α -amilases, amiloglucosidase, pululanase, β -glucanase, protease (neutra, ácida e alcalina), celulose, invertase, pectinase, antocianase, renina, lipase, lactase, lacase, hemicelulose, catalase, no entanto, somente um pequeno número é produzido em escala industrial (como serina proteases, lipase, entre outras) (GACESA e HUBBLE, 1990 ; WAINWRIGHT, 1995).

3.8 Soja

Todos os produtos à base de soja como tofu e extrato líquido de soja, são proteínas completas. A disponibilidade de alimentos que sozinhos possuem proteínas completas é limitada. Contudo, os produtos à base da soja contêm aminoácidos essenciais além de vários outros nutrientes e são usados como complementares a dieta vegetariana (BALCH, e BALCH,1995).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da Papilionácea indígena da China, Manchúria e Coréia e vem sendo utilizada há milênios como um alimento popular. A cultura difundiu-se lentamente no Oriente, sendo atualmente reconhecido o seu importante valor econômico, conquistando hoje um dos primeiros lugares entre as oleaginosas cultivadas. Numerosos fatores determinam a riqueza e a qualidade da proteína e do óleo contido nas sementes. Variedades culturais, condições climáticas e fatores geográficos, etc. As sementes caracterizam-se pelo conteúdo elevado de proteínas (24,9 %, média) e menor riqueza de substâncias gordurosas (20 %, média). Extraem-se estas pelos três processos clássicos, com prensas hidráulicas, de torção e recentemente, divulgou-se o dos solventes voláteis (COSTA, 1994).

As qualidades dos óleos dependem, além dos métodos de extração, também o de refino e como são conservados. Os óleos crus mostram-se com tons mais amarelos por vezes muito escurecidos e de cheiro e sabor a favas. Refinam-se geralmente pelas técnicas usadas para o óleo de algodão. Em circunstâncias favoráveis, obtém-se óleos de cor amarela clara viscosos, que pelo repouso deixam separar um pequeno depósito de “estearina”.

Isolaram-se do óleo de soja as seguintes frações de ácidos graxos: linoléico 52-60 %, linolênico 4-9 %, oléico 25-35 %, palmítico 7-10 %, esteárico 3-6 %; encontram-se ainda quantidades exíguas de ácidos mirístico e homólogos inferiores, araquídico, lignocérico, tetradecenóico, hexadecenóico e hexadecadienóico.

Predominam os glicéridos tri-insaturados óleo-dilinoleína e di-óleo-linoleína, óleo-linóleo-linolenina e, ainda, linóleo-linoleninas; é também apreciável o conteúdo de glicéridos di-insaturados-mono-saturados (BALCH e BALCH, 1995).

Na fração insaponificável, reconheceram-se vários constituintes: fosfolípidos, em percentagens variáveis, que podem ascender a 3,2 %, contendo lecitinas, cefalinas e lipositóis; esteróis livres e combinados, até 0,8 %; hidrocarbonetos, raramente atingindo 0,5 %.

Tocoferóis, numa certa riqueza relativa; vitamina K, em percentagens notáveis; pigmentos carotenóides e outros relacionados com a clorofila, etc. Nos óleos brutos encontraram-se saponósidos.

O óleo de soja inclui-se no grupo dos semi-secativos; exposto ao ar, em camada delgada, forma película sólida mas não espessa.

A quantidade de ácidos livres costuma ser inferior a 1%. Não se conhecem reações específicas de identificação. Salienta-se, como característica deste óleo, a riqueza em δ -tocoferol relativamente à dos outros óleos comestíveis.

A soja tem hoje uma importância considerável na alimentação humana, já reconhecida, desde tempos milenares, pelos povos do Oriente. A esta acresce, recentemente, o valor industrial pelos valiosos subprodutos que fornece, como: a caseína, usada na fabricação de colas de grande poder adesivo, na indústria de plásticos, na fabricação de lã artificial; as lecitinas (vulgarmente lecitina vegetal ou de soja), agentes emulsivos e estabilizadores muito úteis em certas fórmulas farmacêuticas, na fabricação de margarinas, etc (HASSE, 1996).

O Brasil é segundo maior produtor de soja do mundo, sendo o Paraná o segundo maior nacional. Da soja em grão, são obtidos diversos derivados, dentre eles o farelo de soja. O farelo é uma matéria-prima de baixo valor comercial (US\$ 175 por tonelada). A produção de farelo no período de safra de todo o Brasil está em torno 1,6 milhões de toneladas por mês (março a agosto de 2000), segundo ABIOVE, (2000).

Uma das principais temáticas de pesquisa dos últimos 15 anos no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR é o da Fermentação no Estado Sólido. Inúmeros estudos foram desenvolvidos visando a produção de ácidos orgânicos, enzimas, bioinseticidas, aromas, hormônios, pigmentos, enriquecimento protéico, antibióticos, fungos comestíveis (SOCCOL *et al.*, 1994, 1995, 1996, 1998, 2001). A maioria desses estudos têm sido realizados utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais de baixo custo como forma de agregar valor comercial a

esses sub-produtos contribuindo para a redução da poluição ambiental. Esse trabalho teve por objetivo a produção, otimização e caracterização de enzimas proteolíticas em FES, utilizando resíduo de soja como substrato-suporte.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microorganismos

Diferentes cepas foram utilizadas, neste estudo, para a produção de enzimas proteolíticas por FES:

A . niger NRRL 599

A . niger LPB 70

A . niger LPB 23

A . niger LPB 28

A . niger LPB 12

A . niger 416- 62415

A . niger NRRL 334

Penicillium sp.

O fungo *Penicillium* sp, foi isolado como contaminante natural do farelo de soja, este material foi gentilmente cedido pela COAMO (Cooperativa Agropecuaria Mourãoense), localizada na cidade de Paranaguá (PR). O mesmo material foi e utilizado como substrato-suporte neste trabalho para a produção de proteases.

4.1.1 Isolamento do fungo *Penicillium* sp.

Com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se o fungo contaminante presente no farelo de soja , o mesmo foi adicionado a uma solução de água peptonada (0,1% de peptona), acrescida de Mycosel – MERCK (33 g/L, pH=6,9 ± 0,1), homogeneizou-se o meio.

Retirou-se do meio de isolamento do fungo, 0,1 mL com auxílio de uma pipeta esterilizada e adicionou-se este volume em placas contendo ágar-soja, devidamente esterilizada. As mesmas foram incubadas em diferentes temperaturas (25, 28 e 31 °C).

A placa que continha o maior crescimento fúngico (28 °C) , foi escolhida e procedeu-se sucessivas repicagens em ágar-soja, (8 x), até observar-se um crescimento de colônias com aspecto homogêneo no meio de cultivo. Posteriormente o fungo isolado foi submetido à caracterização utilizando microcultivo e a estirpe foi mantida por repicagem em tubos inclinados contendo PDA, e mantidos a temperatura a de 4 °C. Uma amostra padrão da cepa foi também conservada em glicerol.

a- Preparo do ágar –soja.

40 gramas de farelo de soja moído, foram diluídas em 1000 mL de água destilada deionizada contendo 15 g de ágar. O meio foi dissolvido , e posteriormente esterilizado em autoclave. Distribuiu-se o ágar soja em placas de Petri estéreis de 85 mm de diâmetro, na razão de 20 mL por placa.

4.1.1.1 Microcultivo

O fungo isolado do farelo de soja foi cultivado em placa de microcultivo. A placa de microcultivo é composta de uma placa de Petri esterilizada contendo papel de filtro ao fundo e sobre este um bastão de vidro em forma de "U", junto com uma lâmina e lamínula de vidro (RIBEIRO *et al.*, 1993). O procedimento para os estudos morfológicos foram realizados por meio das seguintes etapas :

- a) Corte de um quadrado de 5mm de ágar Saboraud e transporte do mesmo com alça de platina à lâmina de vidro estéril.
- b) Retirada de pequenas porções da colônia do fungo isolado e semeadura em dois extremos do quadrado do ágar Saboraud.

- c) Cobertura do cultivo com uma lamínula de vidro estéril
- d) Umedecer o papel de filtro com água destilada estéril. A placa de Petri funciona como câmara úmida.
- e) Identificação da placa e incubação à temperatura ambiente, observando diariamente o desenvolvimento da cultura (colônia).
- f) Após o crescimento da colônia, retirar a lamínula. As faces da lâmina ou lamínula que estavam em contato com o quadrado devem ser fixadas por álcool a 70% e secagem ao ar livre.
- g) Montar a lâmina e a lamínula separadamente em lacto fenol azul-algodão ou outro corante.

4.1.2 Manutenção da cepa

A cepa isolada foi mantida em solução de glicerol e em tubo de ensaio contendo PDA (potato dextrose ágar) por repicagem e armazenada em geladeira à 4°C. Antes do início de cada fermentação, a estirpe foi repicada em 50 mL de PDA contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL e incubado em estufa por um período de 6-7 dias à temperatura controlada de 28°C. Para manter a cepa isolada, foi preparado uma solução de esporos concentrada (10^{15} esporos/ml) e sobre esta adicionou-se glicerol esterelizado (1:1 v/v) e mantidos em tubos esterilizados, hermeticamente fechados e armazenados em geladeira a 4°C .

4.1.3 Preparo da solução de esporos

Sobre o fungo, repicado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de PDA, adicionou-se 50 mL de água estéril contida em um frasco Erlenmeyer contendo 2 gotas de Tween 80 , pérolas de vidro e uma barra magnética estéril. Em câmara estéril, sobre agitador magnético, deixou-se agitando por um período de 15 min para remoção dos esporos. A solução de esporos foi armazenada em geladeira a 4°C em Erlenmeyer estéril.

4.1.4 Contagem dos esporos

1 mL da solução de esporos (item 4.1.3) é retirado assepticamente e diluída em água estéril em diluições sucessivas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . A solução diluída é transferida para uma câmara de Neubauer ou Malassez e contados em M.O. (Coleman). O número de esporos/mL foi calculado através da equação (1).

$$\text{N}^\circ \text{ total de esporos/mL} = \frac{\text{NTE} \times 1/\text{VR} \times \text{FD} \times 10^{-3}}{\text{NRC}} \quad (1)$$

- NTE = Número total de esporos contados em dez quadrículos
- $1/\text{VR}$ = Inverso do volume do retículo
- FD = Fator de diluição
- NRC = Número de retículos contados

4.1.5 Fotomicroscopia

Para os estudos morfológicos e contagem de esporos foi utilizado o microscópio ótico Olympus BX 50.

4.1.6 Microscopia Eletrônica

O estudo de microscopia eletrônica foi realizado em diferentes etapas:

1- Preparo das amostras

A fixação da amostra (1 mL de glutaraldeído a 3% e 1 mL de solução de Cocodilato 0,2 M) pelo menos por 24 horas a 4°C ; rinsagens das amostras com a solução de Cocodilato (3 vezes); desidratação com Etanol (Merck), em concentrações crescentes: 30,

40, 50, 60, 70, 80 e 90 %. Para cada concentração é obedecido um tempo de contato de 10 minutos. A desidratação continuou e desta forma procedeu-se a determinação do ponto crítico ($36,1^{\circ}\text{C}$, 1070 lb/pg^2), para que o gás contido na amostra seja eliminado. Em seguida procedeu-se a montagem das amostras em suportes de alumínio específicos as quais receberam uma camada de carbono sobre a superfície. As amostras foram mantidas em um dessecador até o momento da análise no microscópio eletrônico.

2- Microscopia eletrônica

Para os estudos de microscopia eletrônica foi utilizado o microscópio (Philips, modelo SEM-505). O experimento foi realizado com a colaboração da Professora Dra. Daura Regina Eiras Stofella, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.1.7 “Screening” para detectar presença de enzimas proteolíticas

Foram realizadas duas técnicas para verificação da produção de enzimas proteolíticas nas espécies de fungos selecionados.

*Técnica 1

O meio composto de peptona de carne (5 g/L), extrato de levedura (3 g/L), leite em pó (Molico[®]) (1 g/L), ágar-ágar (12 g/L) foi diluído em água destilada. O pH do meio foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$, e então esterelizado a 121°C por 15 minutos, em autoclave.

Distribuiu-se o meio em placas de Petri esterilizadas. O meio foi resfriado à temperatura ambiente e então o fungo foi inoculado no centro da mesma com auxílio de uma alça de platina. Incubou-se as placas em estufa à temperatura de 28°C por aproximadamente 4 dias e então observou-se o crescimento do fungo e o halo de hidrólise claro sobre o meio turvo.

***Técnica 2.**

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 0,1 % de gelatina, 0,1 % maltose, KNO_3 0,1 % e 0,5 % de agarose, diluídos em água destilada, esterilizados (121°C por 15 minutos) e distribuído em placas de Petri estéreis (HAGERMAN, *et al.*, 1985). O meio resfriado em placa de Petri foi coberto de maneira asséptica com uma membrana estéril de policarbonato (25 mm de diâmetro e porosidade de $0,4\ \mu\text{m}$, da Nucleopore Corp.). Sob esta membrana, com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada, adicionou-se uma gota da solução de esporos. A placa então foi incubada em estufa a 28°C por 4 dias. Após o crescimento do fungo a membrana foi removida da placa e então a mesma foi mantida a temperatura de 30°C por 2 horas. Após este tempo foi adicionada uma solução corante, para evidenciar a presença de protease, através de um halo formado na placa, o tempo de contato com o corante foi de 1 hora. A solução corante utilizada é composta de : cloreto de mercúrio (3%) dissolvido em HCl a 10 %.

4.2 Obtenção do Substrato-suporte

O substrato-suporte utilizado no processo fermentativo para a produção de protease por FES foi o farelo de soja o qual foi cedido pela COAMO (Cooperativa Agropecuaria Mourãoense) localizado em Paranaguá (PR). Este foi seco a $55-60^\circ\text{C}$ em estufa por 24 horas, depois de seco o farelo foi moído, tamisado e embalado em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações com granulometria entre 0,8 a 2,0 mm de diâmetro para os estudo de FES.

4.2.1 Composição físico-química do farelo de soja utilizado

Foram realizadas, seguindo as Normas do Instituto Adolfo Lutz.

a) Lipídios: Foi pesado 5g da amostra e transferida para um cartucho de papel filtro, sendo o mesmo coberto com uma proteção de algodão. Em seguida o cartucho foi

colocado no tubo de extração do Soxhlet, juntamente com n-hexano em aquecimento durante cinco horas para a extração do material lipídico. O cartucho contendo o triturado deslipidificado foi colocado em capela para evaporação do solvente n-hexano. Assim, por diferença entre os pesos da amostra antes e depois da deslipidificação calculou-se a porcentagem de lipídeo contido no farelo de soja comercial.

b) Proteínas: Foi pesado sobre um papel filtro 1 g do material e transferido juntamente com o papel para um balão de Kjeldahl. Adicionou-se cerca de 4g de catalisador, 20 mL de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) e aquecido no conjunto digestor, a princípio lentamente, até que a oxidação completou-se e a solução tornou-se clara. O material foi aquecido por trinta minutos, esfriado e cuidadosamente adicionou-se 150 mL de água. A seguir foi acrescentada uma solução de NaOH (hidróxido de sódio) a 40% até ficar fortemente alcalina (tornando-a mais escura). Destilou-se, em seguida o material (cerca de 100 ml), sendo o mesmo recebido em Erlenmeyer contendo cerca de 25 mL de H_2SO_4 0,1 N e gotas de vermelho de metila. O excesso da solução ácida foi titulada com NaOH 0,1 N até coloração amarela. Paralelamente uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições. O conteúdo de nitrogênio encontrado foi de aproximadamente de 16 %. Desta forma, o valor do nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator 6,25 para o cálculo da proteína total.

c) Cinzas: foi pesado 5g da amostra do farelo de soja em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a $600^{\circ}C$, resfriada em dessecador e pesada. Em seguida o material foi carbonizado em bico de Bunsen e incinerado em mufla a $550^{\circ}C$ até que o resíduo apresentar uma coloração esbranquiçada. Depois da incineração o material foi resfriado em dessecador em temperatura ambiente e pesado.

d) Umidade: Foi pesado 5g da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida em estufa a $105^{\circ}C$, resfriada em dessecador e pesada. O material foi aquecido em estufa a $105^{\circ}C$ por 3 horas, resfriado e pesado; repetindo a operação de aquecimento, com duração de meia hora, até obtenção de peso constante.

4.3 Esterilização dos meios e equipamentos

Para garantir condições estéreis no crescimento do fungo isolado, os meios sólidos de propagação, do pré-inóculo e de produção de proteases, bem como todos os materiais utilizados, foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 min.

4.4 Fermentação em Erlenmeyers

A fermentação no estado sólido foi inicialmente realizada, em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo o farelo de soja (10 g) umidecido à 55 % com solução salina contendo : KNO_3 2,0 g/L; MgSO_4 0,5 g/L; KH_2PO_4 1,0 g/L ; ZnSO_4 0,43 g/L; FeSO_4 1,11 g/L ; MnSO_4 0,15 g/L. O frasco foi tampado, utilizando bucha de algodão para evitar contaminações e então submetido a esterilização (item 4.3). Após este processo o substrato-suporte foi inoculado com uma solução de esporos na concentração de 10^8 esporos/ g de substrato seco. A temperatura de incubação utilizada neste experimento foi de 28 °C e o tempo de fermentação foi de 48 horas.

4.4.1 Extração de Enzimas

Inicialmente foi adicionado ao meio à base de farelo de soja fermentado em Erlenmeyer (item 4.4) , 100 mL de solução de NaCl a 1%. Os frascos foram agitados em “Shaker” a 120 rpm (agitador rotatório) por 60 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo as amostras foram filtradas, utilizando tecido de nylon e submetida a pressão mecânica (manual). O filtrado obtido foi centrifugado a 5000 g por 5 minutos. Após este processo o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

O volume de extração da enzima, no substrato fermentado à base de farelo de soja para o fungo que apresentou melhor atividade enzimática foi otimizado. Desta forma o volume ótimo de extração foi de 50 mL.

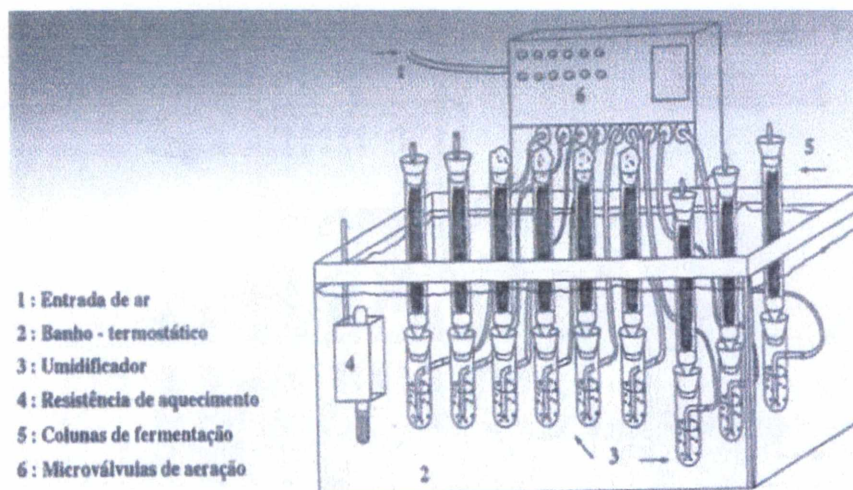
A solução obtida, chamada de extrato bruto, foi acrescida de 0,01% de azida sódica e mantida em geladeira na temperatura de 4 °C.

4.4.2 Otimização da produção de protease por FES em Erlenmeyers

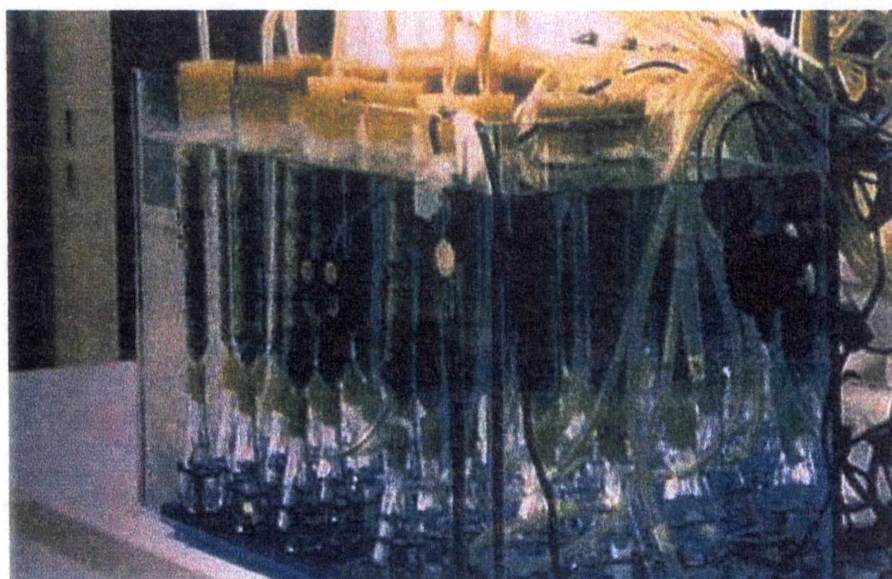
Após ter sido verificada a maior produtividade enzimática (fermentação 1, item 4.4), foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito dos parâmetros físico-químicos (pH, umidade, temperatura) na produção de enzimas proteolíticas por FES. A concentração de inóculo foi mantida constante em 10^8 esporos/ g de substrato seco bem como a concentração de sais minerais utilizados na solução. O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 g de farelo de soja. O programa utilizado para otimização dos fatores físico-químicos foi o Statgraphics, versão 7.0

4.4.3 Produção de proteases em biorreator tipo coluna

Para a produção de proteases de *Penicillium* sp em FES foi utilizado um protótipo para a fermentação no estado sólido com biorreatores do tipo colunas acopladas a um sistema que permite o controle de aeração e temperatura. Todo o sistema é monitorado por computador, através de um programa denominado CHROMA, semelhante ao desenvolvido por RAIMBAULT & ALAZAR (1980). O protótipo é composto de duas cubas de vidro, que permitem a instalação de oito colunas em cada cuba e que podem ser retiradas sem provocar perturbações às outras colunas. O equipamento utilizado está representado na Figura 3.



A



B

Figura 3. Equipamento de fermentação no estado sólido utilizando bioreatores de colunas. (A) esquema do aparelho, (B) fotografia.

O equipamento é composto por bioreator do tipo coluna com 20 cm de altura e 4 cm de diâmetro. Após serem preenchidas com o material a ser fermentado, as colunas são conectadas em borbulhadores de ar de 250 mL, contendo 150 mL de água destilada.

O conjunto (coluna e borbulhador) é colocado em uma cuba de vidro apropriada com água para controle da temperatura de fermentação a 28 °C, utilizando um termostato.

Cada coluna é ligada a uma válvula que permite o ajuste do fluxo de ar ao valor desejado (0-120 mL/min). O fluxo de ar na saída do bioreator é controlando através de um rotômetro (COMEL).

Os gases que saem dos bioreatores, são desidratados através da passagem do fluxo por uma coluna de sílica gel montado em série e analisados por cromatografia gasosa. Foram determinadas a taxa de consumo de oxigênio (TCO), o CO₂ produzido e o quociente respirométrico (QR) durante o processo, segundo o modelo FERSOL desenvolvido por RODRIGUES-L *et al.*, 1988. Estas análises foram realizadas com auxílio de um cromatógrafo gasoso (SHIMADZU-GC-8 A), acoplado a um computador.

Neste experimento foram utilizadas condições otimizadas em Erlenmeyer (item 4.4.2). Nesta fase de trabalho com bioreator do tipo coluna foram otimizados o fluxo de aeração e o teor de umidade inicial no processo de síntese de protease por *Penicilium* sp em FES.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação da biomassa em FES

O experimento, em duplicata, foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g de farelo de soja, umidade de 55 % e 50 ml tampão citrato-fosfato 0,2 M (pH 5,0) contendo sais minerais (item 4.4.1). Os frascos foram incubados em estufa e retirados em diferentes tempos, para analisar a biomassa e a atividade enzimática obtida.

4.5.1 a Extração da quitosana do material fermentado

O material fermentado em diferentes tempos de cultura foi transferido para uma placa de vidro e então submetido a secagem em estufa a 60 °C por 24 horas. Após este tempo, o substrato fermentado foi moído em gral com auxílio de pistilo.

Tomou-se 1g (ou 5 g para os tempos iniciais) do substrato fermentado de farelo de soja e adicionou-se em um balão de fundo redondo, juntamente com 10mL de KOH 50% (1:10) e colocou-se em refluxo em banho termostatizado a 110°C com agitação constante por 12 horas, sendo que de 3 em 3 horas o material foi centrifugado, o sobrenadante desprezado e novamente adicionado 10mL de KOH ao precipitado e levado novamente a refluxo. Decorridas 12hs, o material foi filtrado a vácuo e lavado com água até eliminação de todo o KOH. Foi utilizado como indicador a fenolftaleína. O papel de filtro utilizado foi devidamente seco e pesado (papel quantitativo). Submeteu-se a secagem (papel +resíduo) até peso constante à temperatura de 40°C.

$\text{Peso do (papel + resíduo)} - \text{peso do papel} = \text{peso do resíduo seco.}$

Após a extração, para confirmação da extração do carboidrato presente, o mesmo foi submetido à análise por Infra -Vermelho conforme descrito anteriormente (item 4.5.2).

A Figura 4 representa o fluxograma do processo utilizado.

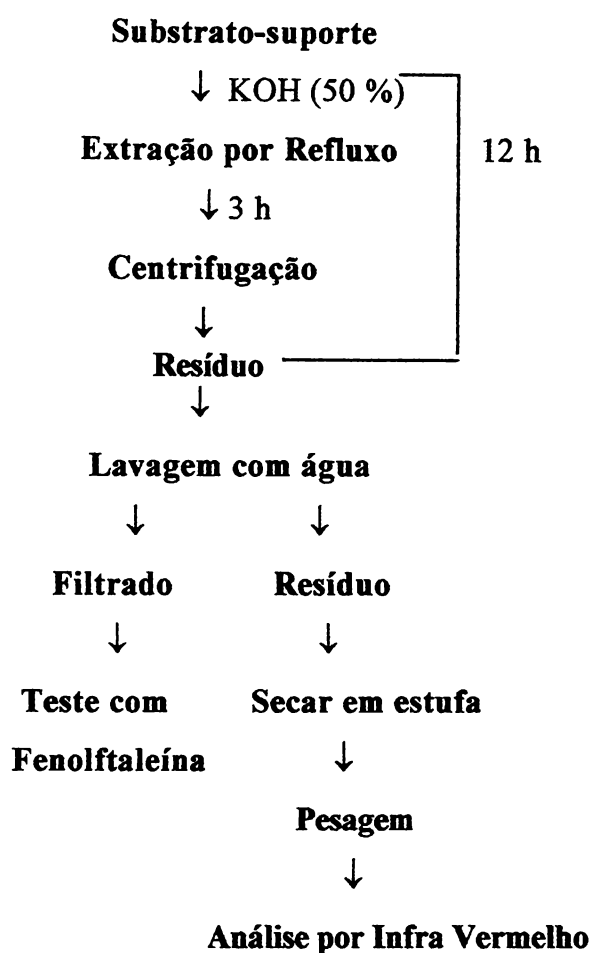


Figura 4. Processo de extração da quitosana

4.5.2 Análise por infra-vermelho (IV)

A análise por IV, foi realizada através do pastilhamento do material com KBr através de prensa manual, posteriormente foi feita a leitura em espectro (BOMEM HARTMANN & BRAUN – MB – SÉRIES).

4.5.3 Determinação da glicosamina

A determinação da glicosamina foi determinada através da modificação do método de ARIMA e UOZUMI (1967).

O resíduo obtido (item 4.5.1) foi colocado em um tubo de ensaio com rosca (Kimax) e suspenso em ácido clorídrico (3 N) 10mL. O tubo foi fechado hermeticamente e deixado em banho termostatizado a 100°C durante 4hs; O hidrolisado foi resfriado e centrifugado para decantar os resíduos sólidos presentes. A 1 mL de sobrenadante foi adicionado 3mL de NaOH 2N sendo então o pH ajustado a 7,5 pela adição de NaOH ou HCl 1N.

Determinou-se a glicosamina em 0,5mL de hidrolisado através da adição de 0,5 mL do reativo A incubando por 20 minutos em banho maria em ebulição. Após esse procedimento foi adicionado 3mL de etanol e rapidamente agitou-se em vortex. Por último adicionou-se 0,5 mL do reativo B, incubando-se o material por 10 min a 65°C, resfriando-se a seguir e fazendo-se em seguida a leitura da densidade ótica a 530nm. Foi feita uma curva de calibração na faixa de 0 a 40 micrograma (μ g) de glicosamina (SIGMA).

REATIVO A: acetilacetona 4% (v/v) em Na_2CO_3 0,6 M.

REATIVO B: 1,6 g de N-N-dimetilparaaminobenzaldeído em etanol absoluto: HCl concentrado (30:30, v/v)

Para correlacionar o valor de glicosamina presente no fungo, foi realizada a fermentação em meio líquido (FML) utilizando farinha de soja em condições otimizadas, inoculando o fungo e retirando-se amostras em diferentes tempos para a determinação da biomassa (item 4.5.4).

O peso seco obtido da massa micelial após 48 h de fermentação, foi utilizada para determinar a concentração de glicosamina diretamente pelo do método descrito acima. Foi utilizada a determinação do peso seco (massa micelial) relacionando a quantidade de glicosamina presente no mesmo.

A Figura 5 mostra o fluxograma da determinação da glicosamina.

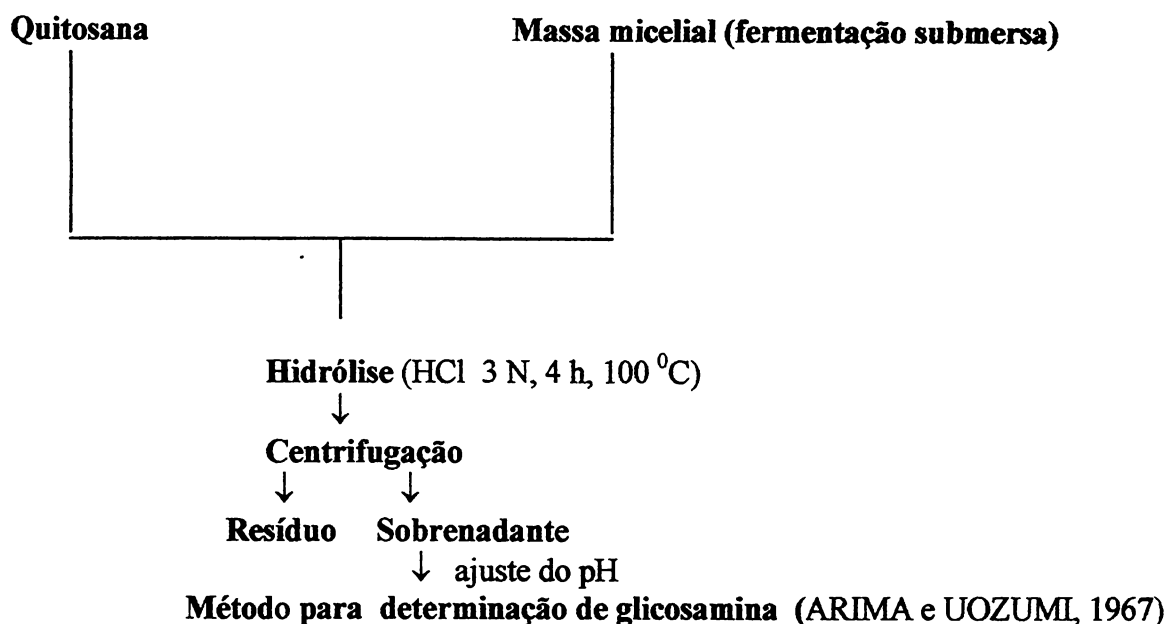


Figura 5 : Fluxograma das diferentes etapas para dosagem da glicosamina em material fermentado.

4.5.4 Determinação da biomassa produzida por fermentação em meio líquido

Tomou-se, em frascos Erlenmeyer 100 g de farelo de soja a qual foi acrescida de 300 ml de solução citrato-fosfato pH 5. O material foi aquecido a 100°C por 20 min., em seguida filtrado e acrescida a solução de sais (item 4.4), posteriormente o substrato foi esterilizado em autoclave conforme descrito em (4.3).

Os frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50 ml de substrato por frasco foram inoculados com uma solução de esporo contendo 10^8 esporos/ml. Esses frascos foram incubados em “Shaker” (Tecnal, modelo TE-420) a temperatura de 28 °C , agitação de 120 rpm por um tempo de 60h.

As amostras de diferentes tempos de fermentação foram filtradas em papel de filtro previamente pesado. O filtrado foi separado e a massa micelial foi lavada com solução de HCl 2 N e sucessivas lavagens com água. Após este processo o papel de filtro

foi seco em estufa (72 h à temperatura de 60 °C) no filtrado foi determinada a atividade enzimática.

4.5.5 Determinação do pH

Para a obtenção dos valores de pH dos cultivos enzimáticos, em solução extratora, foi utilizado pHmetro QUIMIS modelo 10400-A. Após a fermentação as amostras eram acrescidas da solução extratora, NaCl a 1% (item 4.4.1), e então uma porção da solução (extrato bruto) foi transferida para um béquer para a medida do pH.

4.5.6 Determinação da atividade proteolítica

A dosagem de proteases nos extratos brutos foi feita de acordo com o método proposto por LEIGHTON *et al.* (1973), utilizando como padrão uma solução de azocaseína em pH 7,2. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma diferença de absorbância por uma hora, a 37°C e por mL de solução.

Soluções utilizadas:

1% de azocaseína em tampão Tris- HCl 0,2 M contendo 0,001 M CaCl₂.

10% TCA em água.

NaOH 1M.

Procedimento:

150 µL da amostra a ser analisada foram adicionados a 250 µL da solução de azocaseína, em tubos de ensaios tampados e incubados a 37°C, por 1h. Adicionou-se, então, 1,2 mL solução de TCA 10%. As amostras foram retiradas e imersas em banho de

gelo antes da adição do TCA. Após centrifugação (13000xg, 10 min) foram retirados 0,8 mL do sobrenadante e colocados em tubos de ensaio contendo 1,4 mL de NaOH 1 M. A absorbância foi lida, em seguida, a 440 nm, contra um controle com enzimas inativadas pelo calor (100 °C por 10 minutos) e as densidades óticas destes ensaios foram descontados da atividade contendo a enzima ativa.

4.5.7 Determinação de proteínas – método de BRADFORD

A dosagem de proteínas no extrato bruto foi feita de acordo com o método proposto por BRADFORD *et al.* (1976) . Este método é baseado na observação de que o Coomassie Brilliant Blue G-250 existe em duas colorações diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida à forma azul, funcionando como um corante para proteína. O complexo proteína-corante tem um coeficiente de extinção alto, proporcionando uma maior sensibilidade nas medidas das proteínas.

Reagentes:

100 mg de Coomassie blue G-250 dissolvido em etanol 95%. A esta solução foi adicionado 10 mL de ácido fosfórico a 85% e água até volume final de 100 mL. A solução mãe é armazenada em frasco escuro.

Solução padrão: albumina bovina, 100 µg/mL.

Solução de cloreto de sódio 0,15 M.

Procedimento:

A 0,1 mL de amostra adiciona-se 1,0 mL do reagente Coomassie blue G-250. A solução é agitada em vórtex e lida dentro de 5 a 10 minutos a 595 nm, contra um branco preparado com NaCl 0,15 M e 1,0 mL do reagente.

4.6 Determinação da atividade de protease extracelular utilizando diferentes substratos.

A atividade proteolítica usando diferentes substratos:

a. Azocaseína / Azoalbumina

Em tubos de ensaio contendo 150 µl mL do extrato bruto (em NaCl 1%) dialisado por uma noite contra água destilada a 4°C, foram adicionados 250 µl de solução de azocaseína / azoalbumina (sendo utilizado tampão fosfato pH 6,5 0,2M), incubando-os a 45 °C por 1 hora.

b. Azocol

10 miligramas de azocol foram suspensos em 0,5 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 6,5; 1,0 mL do extrato bruto dialisado foram colocados em Erlenmeyer de 25 mL. O frasco foi incubado em banho-maria com agitador rotatório (120 rpm) por 1 hora à temperatura de 45 °C. O conteúdo foi filtrado em papel filtro; a absorção do filtrado foi medida a 520 nm. Foram realizados controles com enzimas inativadas pelo calor (100°C, 10 min) e as densidades óticas destes ensaios foram descontados da atividade contendo a enzima ativa.

Todas as determinações enzimáticas foram feitas em triplicata.

4.7 Temperatura ótima e pH ótimo para a atividade enzimática

a. O ensaio para a temperatura ótima foi feito incubando-se 150 µl do extrato bruto dialisado em 250 µl azocaseína 1% (utilizando tampão tris-HCL 0,2M, pH=7,2). O material foi incubado a diferentes temperaturas (0°C a 55 °C) por 1 hora e determinada a atividade enzimática conforme descrito no item 4.5.6.

b. Em 1 mL do meio de extrato bruto dialisado foi adicionado tampão fosfato de sódio 0,2M, variando o pH da mistura entre pH 5,7 a 8,0; tampão citrato fosfato 0,2M, entre pH 5,0 a 7,0; tampão bicarbonato sódio entre pH 9,1 a 10,1. Em seguida foram incubados com 250 µl de

azocaseína preparada nos diferentes tampões durante 1 hora à temperatura de 45°C (item 4.7.a) Foi realizado um controle contendo tampão tris-HCl 0,2M, pH=7,2. Os demais procedimentos foram realizados conforme item 4.2.a utilizando como substrato azocaseína.

c. Foi realizado a otimização das variáveis físico-químicas para a atividade enzimática e verificação da interação entre diferentes temperaturas e pHs, através de um planejamento experimental 3^{2-0} , 1 bloco, 36 corridas com 3 pontos centrais utilizando tampão fosfato em diferentes pHs e em diferentes temperaturas.

A atividade enzimática foi determinada conforme item 4.5.6, utilizando azocaseína como substrato padrão.

Para o planejamento experimental, os gráficos de superfície de resposta e a verificação dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statgraphics, versão 7.0.

4.8 Estabilidade da protease extracelular frente ao pH e estabilidade térmica

a. Em 100 µl do extrato bruto dialisado foi adicionado 900 µl de tampão acetato de sódio 0,1 M, variando o pH da mistura entre pH 4,0 a 6,0; tampão citrato de sódio 0,1 M entre pH 3,2 a pH 5,6; tampão fosfato de sódio 0,1 M entre pH 6,0 a pH 8,0; tampão glicina/NaOH 0,1 M pH 10,6; e tampão glicina/HCl pH 3,2, foram analisadas no tempo zero (inicial) e após repouso de 24 horas a 4 °C. Após este procedimento foi retirado 150µl da diluição do meio de cultivo em cada tampão e adicionado 250µl de azocaseína (1%, tampão fosfato pH 6,5). Em seguida foram incubados durante 1 hora à temperatura de 45°C. Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no item 4.5.6.

Para cada tubo foi feito um controle contendo os diferentes tampões usados no experimento. As determinações das atividades enzimáticas foram feitas em triplicata.

b. A estabilidade da atividade proteolítica, frente à temperatura foi determinada, incubando o meio de cultivo dialisado em várias temperaturas por diferentes tempos, retirando-se alíquotas e determinando a atividade enzimática, conforme especificado no item a.

4.9 Inibidores da atividade proteolítica

O efeitos de inibidores sobre a atividade proteásica foram determinados incubando-se a enzima em diferentes concentrações de inibidores, utilizando soluções estoques de PMSF 105 mM, EDTA 500 mM, EGTA 500 mM, PCMB 100 mM, Iodoacetamida 50 mM; Pepstatina, o controle foi diluído na mesma proporção com tampão fosfato pH 6,5. A seguir o procedimento da atividade proteolítica foi realizado (azocaseína 1%, tampão fostato pH 6,5 a temperatura de 45 °C), item 4.5.6.

4.10 Ensaio com cátions para a ativação da protease

Soluções estoques a 1mM com os seguintes cátions CaCl_2 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , e NaCl foram preparadas com água destilada para o ensaio da ativação enzimática. A concentração utilizada no experimento foi de 0,1 mM do sal com a presença da enzima, seguindo as condições otimizadas para a mesma, (azocaseína 1%, tampão fostato pH 6,5 a temperatura de 45 °C), item 4.5.6.

4.11 Efeito da concentração do substrato

O extrato bruto dialisado foi incubado (150 μL) com concentrações variáveis de azocaseína (0,05 mg a 25 mg/mL) tampão fosfato de sódio 0,1 M (250 μL), pH 6,5 a 45°C por diferentes tempos (30 minutos e 60 minutos). Após esses tempos foram adicionados 1,2 mL de TCA 10% gelado e mantido o ensaio em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação, a 12000 rpm por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi misturado com 1,4 mL de NaOH . A absorbância foi medida em 440 nm. Os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, para o substrato azocaseína foram estimados com a equação de Michaelis-Menten pelo programa ENZ-FIT.

4.12 Estudos prévios de estabilidade do extrato bruto enzimático frente a agentes oxidantes, surfactantes e de compatibilidade com detergentes comerciais

Estudos prévios foram realizados para verificar o efeito de agentes oxidantes e surfactantes no extrato bruto obtido bem como a compatibilidade deste com detergentes comerciais (PHADATARE, *et al.*, 1993). As amostras foram incubadas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (5, 10 e 15 %) a temperatura ambiente (25 °C). O tempo de incubação variou entre 5 à 60 minutos. Em intervalos de tempo eram retiradas alíquotas e submetidas ao ensaio de atividade proteolítica , utilizando tampão fosfato pH 6,5 e temperatura de 45 °C (item 4.5.6)

O surfactante utilizado foi o Tween 20 e 80, na concentração de 1%. O mesmo procedimento foi realizado, incubando a enzima na solução aquosa contendo o surfactante e então incubados à temperatura ambiente. Aliquotas eram retiradas em diferentes tempos e submetidas à análise da atividade proteolítica.

Os detergentes comerciais Omo Multi-Ação® (Gessy Lever) e Omo Máquina® (Gessy Lever), foram diluídos em água destilada a uma concentração final de 7mg.mL⁻¹ (0,05mg.mL⁻¹ proteína) simulando condições de lavagem para verificar a compatibilidade da protease. Embora, as soluções desses detergentes tivessem enzimas em sua formulação e descrita pelo fabricante, as mesmas foram previamente inativadas pelo aquecimento a 100 °C por 10 minutos.

Após este procedimento a amostra foi diluída em solução de detergentes com enzimas inativadas a uma concentração final de 0,15 mg.mL⁻¹ sendo incubada a temperatura ambiente durante 1 hora, sob agitação constante em um agitador magnético. Amostras de 150 µl foram retiradas em diferentes tempos. A atividade residual foi determinada conforme método descrito no item 4.5.6 e comparada com a atividade da amostra controle, nas mesmas condições de ensaio.

4.13 Fracionamento com Sulfato de Amônio.

O Extrato Bruto foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio de acordo com GREEN e HUGHENS (1955). Ao extrato enzimático adicionou-se o sal (sulfato de amônio) sob agitação lenta. O processo foi mantido em banho de gelo. As frações utilizadas neste experimento foram 0-80 % e 80 a 100 %. Após a dissolução do sal, a agitação permaneceu por mais 30 minutos para permitir o completo equilíbrio entre proteínas dissolvidas e agregadas, decorrido o tempo a solução foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos a temperatura de 4 °C . O sobrenadante foi decantado o volume anotado e ao precipitado foi adicionado tampão fosfato pH 6,5 (0.1 M) e esta solução foi submetida a diálise na temperatura de 4 °C utilizando água destilada no volume de 20 vezes ao volume da amostra, sendo trocado o líquido de 3 em 3 horas durante 12 horas. Na amostra obtida foram dosados o teor em proteína e a atividade enzimática.

4.14 Cromatografia em DEAE-sepharose

A cromatografia foi realizada em uma coluna, que continha DEAE-Sepharose. A coluna foi eluída com água destilada deionizada e submetida em gradiente de NaCl, até a concentração final de 1M. A amostra aplicada, foi obtida através do fracionamento com sulfato de amônio – amostra parcialmente purificada conforme descrito no item 4.13. Foi passada 3 mL da amostra liofilizada (fracionada pelo sulfato de amônio), solubilizada em água destilada deionizada, numa coluna de 6,2 cm de altura e 2 cm de diâmetro (volume total de 20 mL), sendo utilizado um fluxo de 1 mL/min, sendo as amostras coletadas em Coletor Pharmacia-LKB-Frac-100. Após o volume de 60 mL eluídos com água iniciou-se o gradiente de concentração de NaCl. As amostras eluídas foram monitoradas em espectrofotômetro (Shimadzu) lidas a 280 nm e também submetidas à análise da atividade proteolítica.

As amostras com maior atividade enzimática foram liofilizadas (liofilizador HETO) e mantidas em congelador. Antes de serem utilizadas nos experimentos as amostras eram solubilizadas em tampão para a análise.

4.15 Cromatografia de exclusão molecular em aparelho FPLC

A cromatografia de exclusão molecular foi feita em aparelho de FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography-Pharmacia), com 25 mL de volume total, contendo Superose 12HR 10/30 (Pharmacia). O tampão de eluição utilizado foi o fosfato 50 mM pH 7,2 com 150 mM de NaCl, o fluxo foi de 0,4 ml/min, velocidade 5mm/min, sensibilidade 0,02 e volume de amostra utilizado de 200 µL.

A coluna foi equilibrada com diferentes padrões de proteínas sendo de diferentes massas moleculares (Alfa -lactoalbumina – 14,2 kDa, Anidrase carbônica 29 kDa, Albumina 45 kDa, Monomero de albumina – 66 kDa , Dímero de albumina 132 kDa e Urease 240 kDa). Através do volume de eluição de cada amostra (V_e) pode-se calcular o K_{av} (coeficiente de partição) respectivo para cada amostra, através da equação 2.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (2)$$

onde: V_e = volume de eluição da amostra

V_o = volume morto da coluna

V_t = volume total da coluna

Os valores referentes aos resultados de K_{av} obtidos versus o logaritmo das massas moleculares de cada um dos padrões, foram plotados em gráficos, podendo-se, então, traçar uma curva de calibração da coluna. (ANDREWS, 1970).

A amostra liofilizada obtida no ítem 4.14 , foi acrescida de tampão fosfato 50 mM, diluída e aplicada na coluna.

4.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e nativo

a- As eletroforeses em gel de SDS-poliacrilamida foram feitas no aparelho vertical Bio Rad Mini Protean II . Os padrões (Sigma) de massas moleculares utilizados no experimento

foram: Fosforilase b – 94 kDa, BSA – 67 kDa, Ovoalbumina – 43 kDa, Anidrase carbônica- 30 KDa, Tripsina 20 kDa e Lactoalbumina 14,4 kDa.

As amostras contendo aproximadamente 20 µg de proteínas, receberam 20 µL e 30 µL (volume final) do tampão tris-HCl pH 6,8 contendo glicerol 10 % (v/v), SDS 10 %, β-mercaptoetanol a azul de bromofenol 0,05 %. As amostras com tampão foram fervidas durante 5 minutos e aplicadas sobre o gel de SDS-poliacrilamida 10 % e analisadas no aparelho. Após este processo o gel foi corado com nitrato de prata (OAKLEY *et al.*, 1980), ou corante de Coomassie Blue.

b- A análise da atividade proteásica em condições não desnaturantes foi realizada em um gel de poliacrilamida a 7,5 % contendo 0,5 % de gelatina em cuba vertical em aparelho Bio Rad Mini Protean II. As amostras Extrato Bruto e Parcialmente Purificado, foram diluídas em partes iguais com o tampão 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina pH 8,3 numa corrente de 10 mA (100 V), a temperatura ambiente por 2 horas aproximadamente. Após este tempo o gel era retirado, transferido para um recipiente plástico com tampa e então adicionado tampão fosfato pH 6,5 e deixado em estufa a 28 °C por 24 horas, para a digestão da gelatina pela protease. Após este tempo o gel foi corado com 0,1 % de Coomassie Blue em 40% (v/v) de metanol e 10 % (v/v) ácido acético, por uma noite e descorado com metanol: ácido acético:água na proporção de 3:1:6.

4.16 Isoeletrofocalização

Para a análise do ponto isoeletrico, foi utilizado o aparelho Phastsystem (Pharmacia LKB Biotechnology), utilizando um gel preparado PhastGel –IEF-3-9, com padrões internos de 3, 7 e 9 de pH.

As amostras eluídas da coluna de DEAE-Sepharose (liofilizadas), que possuíam maior atividade (item 4.14), foram diluídas em tampão fosfato pH 6,5 e aplicadas no gel preparado (4µL). A análise foi realizada conforme descrito no catálogo do aparelho Phastsystem da Pharmacia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de fungos para a produção de proteases

Muitos fungos filamentosos sintetizam enzimas de interesse comercial. Em geral a habilidade para sintetizar e secretar enzimas proteolíticas têm sido demonstradas através da hidrólise da gelatina durante o crescimento das culturas realizadas em placas. Todavia essa técnica não fornece informações sobre a especificidade, natureza funcional e bioquímica dessas enzimas (HELLMITCH *et al.*, 1988).

O objetivo inicial desse trabalho foi selecionar cepas de fungos com a capacidade de produzir enzimas proteolíticas em concentrações consideráveis.

A Tabela 1 apresenta o resultado da seleção dos fungos testados em relação à sua potencialidade na produção de proteases. Optou-se, pela utilização de dois métodos para os estudos iniciais de seleção de cepas, para avaliar qual das técnicas poderia ser utilizada nos estudos posteriores. Para os estudos posteriores será utilizado a técnica 1 pela sua facilidade, baixo custo e detecção precisa de enzimas proteolíticas. Podemos observar ainda que não foi verificada nenhuma variabilidade de resultado entre as duas técnicas testadas.

Baseando-se nos resultados apresentados na Tabela 1, quatro fungos produziram um halo no meio de cultivo e desta forma foram escolhidos para os estudos sobre a produção de enzimas proteolíticas por FES.

Tabela 1. Seleção de microorganismos para a produção de protease

Fungo	Técnica 1	Técnica 2
<i>A . niger</i> NRRL599	-	-
<i>A . niger</i> LPB 70	+	+
<i>A . niger</i> LPB 23	-	-
<i>A . niger</i> LPB 18	+	+
<i>A . niger</i> 416-62415	+	+
<i>A . niger</i> NRRL-334	-	-
<i>Penicillium sp</i>	+	+

+ = presença ; - = ausência

5.2 Composição físico-química do farelo da soja

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise físico-química do farelo de soja. Podemos observar que o farelo de soja possui elevado teor em proteína, carboidratos além de possuir concentrações importantes de cinzas e fibras. Acreditamos que o farelo de soja possui todos os elementos indispensáveis para ser utilizado como um bom suporte-susstrato na produção de proteases por FES.

Tabela 2. Composição físico-química do farelo da soja*

Lipídio %[*]	Cinzas %[*]	Umidade %[*]	Proteína%[*]	Açúcares %^{**}	Fibras %[*]
1,70	5,42	12,94	44,63	30,11	5,2

* A % foi calculada de acordo com as técnicas recomendadas pelo instituto Adolfo Lutz (NORMAS, 1985).

** A % foi calculada por diferença dos demais itens.

5.3 Seleção de fungos para a produção de proteases por FES.

Os estudos realizados anteriormente permitiram selecionar 4 cepas de fungos filamentosos. Esses fungos foram inoculados em farelo de soja para avaliar a produção de enzimas proteolíticas em meio sólido.

Após 48 horas de fermentação, tempo este preconizado por outros autores para a produção de enzimas (GRIPON *et al.*, 1980; GERMANO *et al.*, 1998; SEKINE, 1998), as amostras foram retiradas do meio fermentativo e as enzimas extraídas, com uma solução de NaCl a 1%.

A Tabela 3 mostra a produção de enzimas, relacionando com a atividade proteolítica em U/mL (Unidade enzimática por mL da solução), bem como a atividade proteolítica em U/g SS (Unidade enzimática por grama de substrato seco).

Os resultados apresentados permitiram selecionar o fungo *Penicillium* sp para prosseguir os experimentos de produção de proteases em FES.

Tabela 3. Atividade proteolítica dos fungos selecionados por FES

Fungo utilizado	Atividade enzimática* (U/mL)	Atividade Total **	Atividade enzimática (U/g.SS)
<i>A. niger</i> LPB70	4,1	377,0	37,7
<i>A. niger</i> LPB28	2,8	252,0	25,2
<i>A.niger</i> 416624	1,9	174,0	17,4
<i>Penicillium</i> sp	13,0	1183,0	118,3

* Determinado através da técnica descrita por Leighon et al (1973)

** Determinada através do volume total (mL) da extração com NaCl 1%

5.4 Caracterização morfológica de *Penicillium* sp

O fungo *Penicillium* sp, foi isolado do farelo de soja proveniente da COAMO, em um meio de cultivo à base de ágar soja. O fungo isolado foi mantido

em estoque através de repicagem em PDA. Amostras do fungo foram enviadas para o Instituto André Tosselo, na cidade de Campinas-SP para identificação.

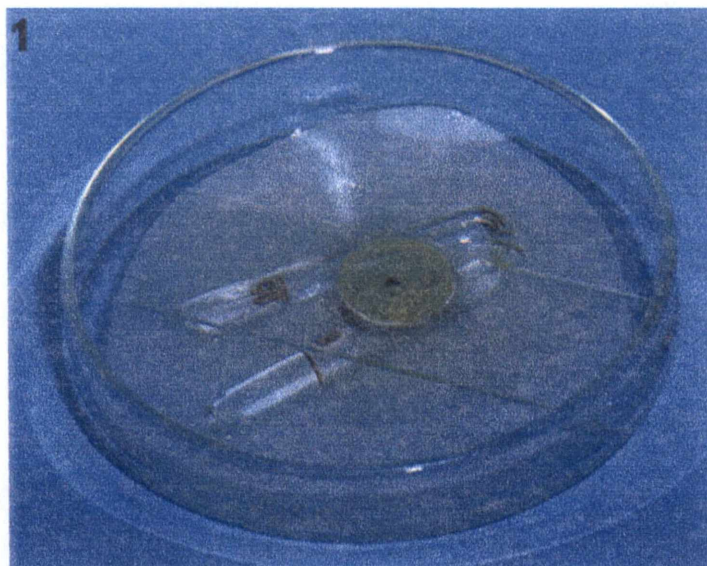


Figura 6.1 Microcultivo do fungo para estudo morfológico



Figura 6.2 Cultura do fungo *Penicillium* sp. ágar Sabouraud

A Figura 6.1 apresenta a técnica do microcultivo para identificação morfológica do fungo isolado do farelo de soja. Na figura do fungo 6.2 podemos observar as características da colônia do fungo de coloração esverdeada..

A microfotografia apresentada na figura 6.3 apresenta as hifas hialinas septadas com conidióforos subdivididos em ramos na forma de pincel, caracterizando um fungo do gênero *Penicillium*.

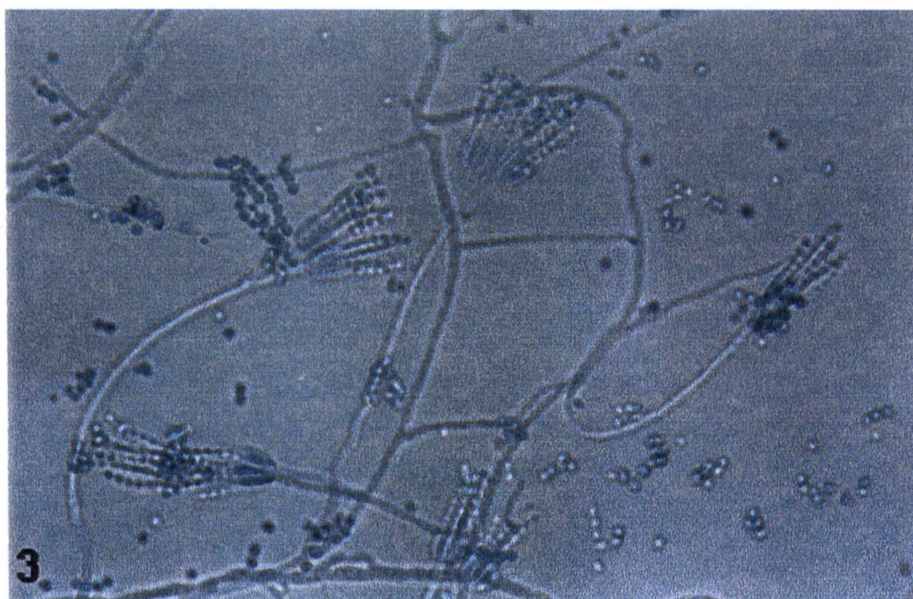


Figura 6.3 Aspecto microscópico de *Penicillium sp* (40 x).

5.5 Otimização das variáveis físico-químicas da fermentação no estado sólido

A maior parte dos processos biotecnológicos, segundo HAALAND (1989), não possuem modelos teóricos que poderiam ser utilizados para explicar o processo em desenvolvimento. Desta forma, os problemas pesquisados nesta área poderiam ser resolvidos empiricamente, com conseqüente resolução de problemas utilizando ferramentas estatísticas que poderiam fornecer possibilidades de otimizar a produtividade dos sistemas.

Na realidade, a otimização é a construção de um modelo matemático que possa propor o comportamento de um processo investigado encontrando uma região ótima de resposta (MACHADO., 2000)

5.5.1 Planejamento experimental 1

As variáveis físico-químicas para a FES na produção de enzima protease utilizando o fungo *Penicillium sp* foram temperatura, pH e umidade.

A taxa de inóculo havia sido definida anteriormente e comparada com outros trabalhos. Desta forma foi utilizada uma concentração da ordem de 10^8 esporos/g de substrato seco (GERMANO, *et al.* 1998).

Um planejamento fatorial 3^3 (três fatores e três níveis) foi elaborado conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Apresentação dos ensaios para otimização das diferentes variáveis (temperatura, pH e umidades) com suas respectivas atividades enzimáticas

FATORES:					
Ensaio	pH	Temperatura	Umidade	AT U/ml	pH final
1	5,0	24,0	50	24,50	6,89
2	5,0	24,0	55	28,00	6,90
3	5,0	24,0	60	23,00	7,20
4	5,0	28,0	50	50,40	6,50
5	5,0	28,0	55	52,50	6,65
6	5,0	28,0	60	36,50	7,80
7	5,0	32,0	50	17,00	6,30
8	5,0	32,0	55	15,00	6,30
9	5,0	32,0	60	10,00	7,20
10	7,0	24,0	50	15,00	6,35
11	7,0	24,0	55	17,00	6,70
12	7,0	24,0	60	14,00	7,10
13	7,0	28,0	50	50,00	7,11
14	7,0	28,0	55	41,00	7,25
15	7,0	28,0	60	32,00	7,38
16	7,0	32,0	50	16,00	6,99
17	7,0	32,0	55	12,00	7,02
18	7,0	32,0	60	09,00	7,10
19	9,0	24,0	50	16,00	6,77
20	9,0	24,0	55	18,00	7,01
21	9,0	24,0	60	10,00	6,85
22	9,0	28,0	50	30,00	6,83
23	9,0	28,0	55	22,00	7,03
24	9,0	28,0	60	20,00	7,10
25	9,0	32,0	50	09,00	7,11
26	9,0	32,0	55	10,00	7,42
27	9,0	32,0	60	07,00	7,01

Os dados estatísticos revelam que o coeficiente de regressão (R^2) obtido no experimento foi de 0,91837, ou seja, 91 %.

Segundo HAALAND (1989), os valores acima de 0,90 são considerados muito bons. Desta forma o experimento apresentou resultados com uma correlação satisfatória.

Os parâmetros estudados apresentaram nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido, ou seja, menores que 5%, desta forma, o pH ($p = 0,00025$), a temperatura ($p = 0,00000$) e a umidade ($p = 0,015727$) foram significativos.

A temperatura de fermentação é um fator que influencia o desenvolvimento da FES (MALATHI e CHAKRABORTY, 1991). A temperatura ótima para a produção de enzima foi de 28°C, sendo que 32°C já se observa uma limitação no crescimento do fungo.

Na figura 7 podemos observar a projeção da superfície resposta que demonstra o efeito da temperatura em função do pH em relação a atividade da proteolítica do fungo *Penicillium* sp.

O teor de umidade do substrato é outro fator importante a ser considerado na FES, pois ele afeta tanto o crescimento de microorganismos como a produção de enzimas (NARAHARA *et al.*, 1982).

Os teores de umidade para FES se encontram na faixa de 30-85%. Acima deste nível é produzida uma aglomeração do substrato que dificulta a troca de gases necessários ao metabolismo dos fungos e favorecendo a contaminação bacteriana. Abaixo de 30% a difusão de nutrientes e o crescimento microbiano são muito reduzidos (PRIOR *et al.*, 1992).

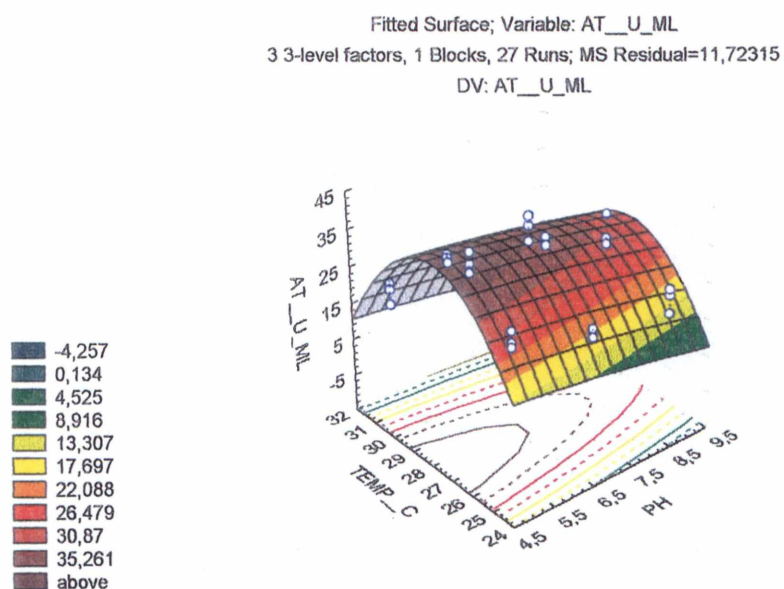
A Figura 8 de superfície resposta mostra o efeito de diferentes teores de umidades em relação ao pH. Foi alcançada a resposta máxima para obtenção da melhor atividade enzimática em uma zona experimental ótima correspondente a baixos valores de pH e umidade.

No planejamento experimental realizado, verificou-se uma ampla faixa do fator pH (Figura 7), e umidade (Figura 8) neste caso será necessário um novo planejamento experimental para tentar determinar as condições ideais na produção enzimática.

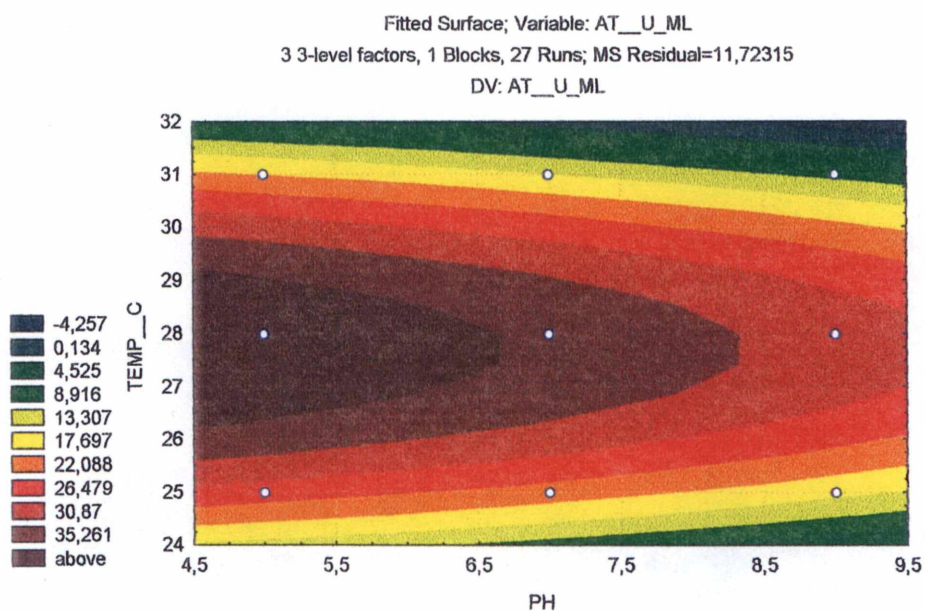
Verifica-se na Tabela 4 que o pH final da fermentação variou em cada experimento realizado. A forma mais provável da variação de pH esta relacionada com a secreção e/ou assimilação de ácidos orgânicos (acético, láctico, cítrico, glutâmico, etc.). A utilização da fonte de nitrogênio presente no meio também conduz a trocas de pH do mesmo. A incorporação de sais de amônio por parte do microorganismo leva a diminuição do pH do meio de cultivo. Por outro lado, se a fonte de nitrogênio são nitratos, os mesmos serão reduzidos intracelularmente utilizando prótons do meio externo e incrementando o pH do cultivo (PRIOR *et al.*, 1992).

A utilização de uréia e de proteínas como fonte de nitrogênio está associada a uma desaminação prévia, as aminas são reduzidas a amônio utilizando prótons do meio o qual leva a um aumento do pH da fermentação (PRIOR *et al.*, 1992).

Verificou-se que o pH da solução de fermentação variou entre 6,8 e 7,2, sugerindo desta forma, que a enzima obtida durante o processo de fermentação possa ser uma protease neutra.



A



B

Figura 7. Superfície de resposta (A) representando a influência dos fatores estudados, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, sobre a produção de protease; (B) Projeção de superfície de resposta.

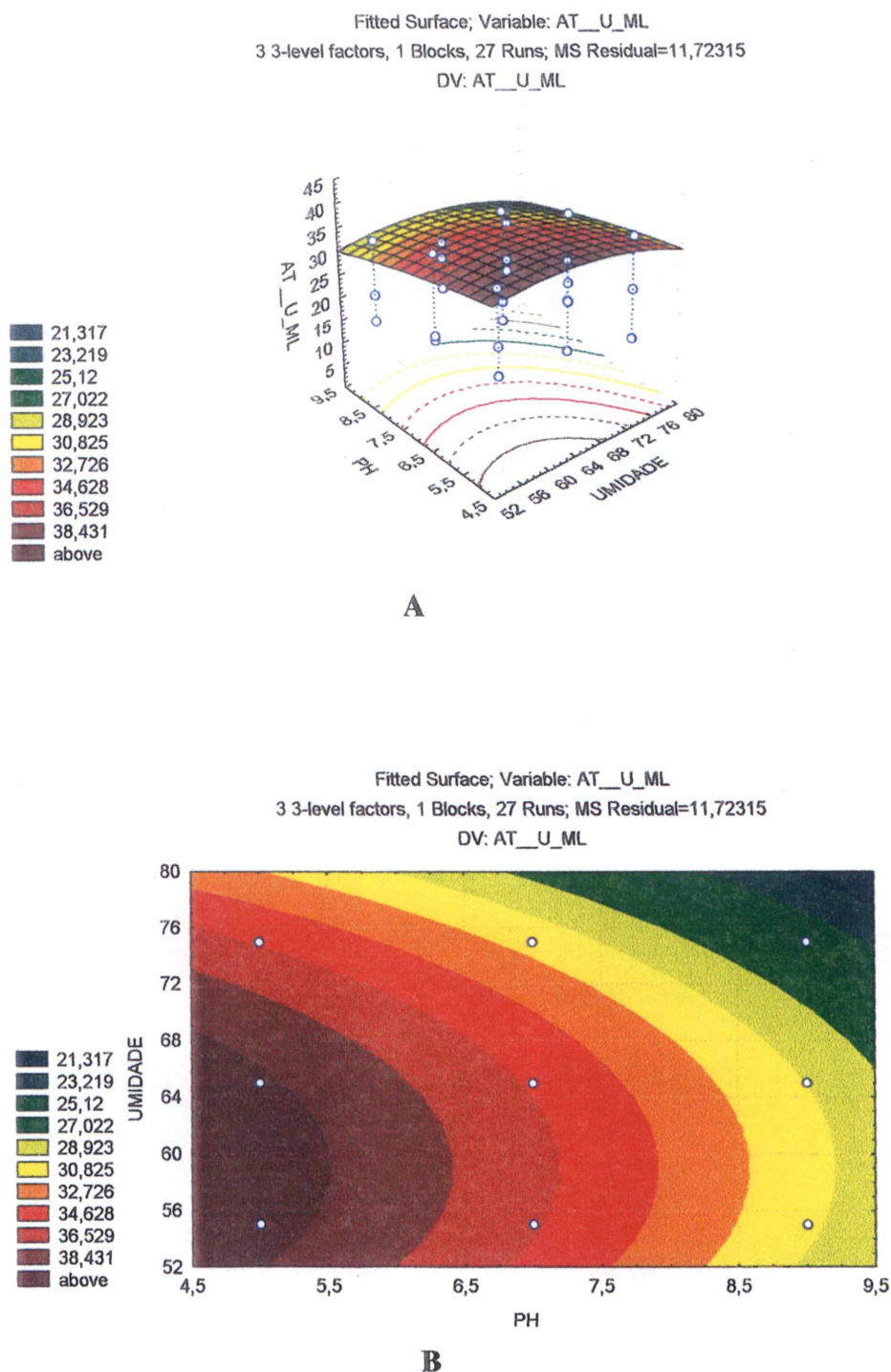


Figura 8. Superfície de resposta (A) representando a influência dos fatores estudados, pH e umidade (%), sobre a produção de protease; (B) Projeção de superfície de resposta.

5.5.2 Planejamento experimental 2

Foi realizado para encontrar uma faixa mais próxima do pH e umidade ótimos visando maximizar a produção da enzima. A temperatura foi mantida constante em 28 °C em todos os experimentos realizados.

Observando a Figura 9, verificou-se que se alcançou um modelo centralizado, isto é, o nível ótimo da produção de enzimas proteolíticas no meio de cultivo, ou seja; as condições ideais são : temperatura 28 °C, pH do meio 5,0 e umidade de 55 %. O coeficiente de regressão obtido (R^2) foi de 0,97346 , o nível de significância ($p < 0,05$) para os fatores estudados foram de 0,001529 para a umidade e 0,005818 para o pH, ou seja os fatores foram significativos no experimento. Comparando-se que estes os valores de atividade enzimática obtida nesta última planificação observa-se que estes foram 34 % maiores, em relação a primeira fermentação realizada sem a otimização (Tabela 3).

Os estudos realizados por WANG *et al.* (1974) citado por MITRA *et al.* (1996), onde os organismos empregados para a fermentação foram *Rhizopus oligoporus*, *Mucor dispersus* e *Actinomucor elegans* utilizando como substrato sólido a farinha de trigo, trigo e soja, mostraram que a melhor produção foi na farinha de trigo. As condições ótimas para *R. oligoporus* foram 50% de umidade e 25°C por 3 a 4 dias; para *M. dispersus* 50 a 63% de umidade e 25°C por 4 a 5 dias, e para *A. elegans*, 50 a 63% de umidade a 20°C por 3 dias.

Malathi e Chakraborty (1991) citados por MITRA *et al.* (1996) produziram uma protease alcalina de *Aspergillus flavus*, utilizando como substrato sólido a farinha de trigo. As condições ótimas para a máxima produção obtida foram a temperatura de 32°C, 63% de umidade, por 48 horas de fermentação.

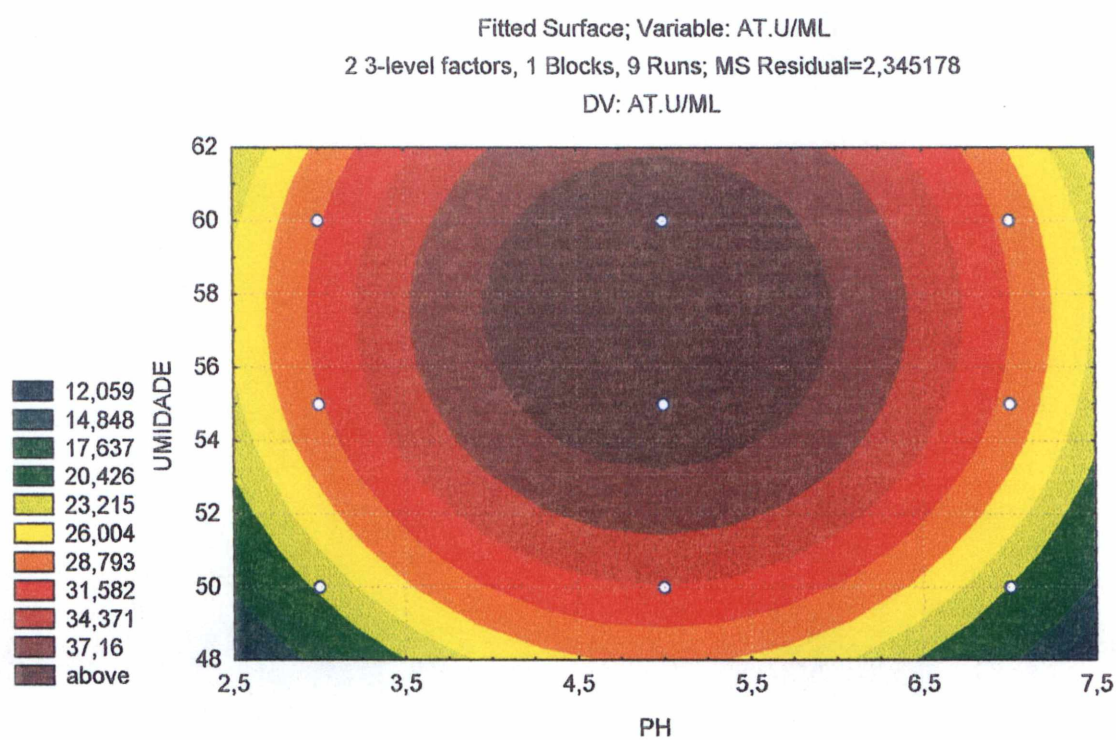


Figura 9. Projeção da superfície de resposta dos fatores estudados (pH e umidade), à temperatura de 28 °C, no Planejamento Experimental 3.

5.6 Cinética da produção de proteases por fermentação no estado sólido

A partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais 1 e 2 otimizou-se as variáveis (pH, temperatura e umidade) e um novo estudo foi realizado visando determinar o tempo ideal para a produção máxima de proteases pelo fungo *Penicillium* sp.

Verificou-se que o melhor tempo para a produção de protease ocorreu após 48 horas de fermentação, o qual pode ser observado na Figura 14. Na figura 10 se pode observar o aspecto dos frascos Erlenmeyers utilizados na fermentação no estado sólido para a produção de proteases.



Figura 10. Crescimento do fungo *Penicillium* sp, no substrato-suporte (farelo de soja) após 48 h de fermentação.

5.6.1 Determinação da biomassa obtida nos processos de FES.

A biomassa formada nos processos de FES é determinada através de diferentes técnicas. As mais utilizadas são a dosagem de proteína total, concentração de DNA ou glicosamina. Todas essas metodologias utilizam previamente hidrólises ácidas ou alcalinas a altas temperaturas (AIDOO *et al.*, 1982; DESGRANGES *et al.*, 1991). Essas hidrólises provocam uma decomposição de enzimas, biomoléculas e outros metabólitos presentes no substrato fermentado.

Em função dos problemas acima relacionados, muitos resultados de determinações da biomassa em FES são inexatos. Dentro desse contexto procuramos desenvolver uma metodologia mais precisa para a dosagem da biomassa em FES. Essa técnica se baseia na desacetilação da quitina presente no micélio fúngico. A quitina é convertida em quitosana através do rompimento das ligações glicosídicas para a formação de monômeros de glicosamina que é finalmente dosada por espectrofotometria.

Os experimentos foram realizados conforme descrito item 5.3, porém foi encontrado dificuldades na determinação da glicosamina no material fermentado. Isso ocorreu em razão de que foi obtido uma coloração escura durante o processo de hidrólise, o qual dificultou a leitura por espectrofotometria. Esse problema foi resolvido através da extração do biopolímero quitosana (item 4.5.1). O biopolímero (quitosana) obtido foi confirmado pela análise em Infra-Vermelho (I.V) e pela solubilidade em ácido acético a 5 %.

O espectro de I.V mostrado na figura 11 apresenta bandas na região de 1650 a 1665 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C=O da amida e 1575 a 1610 cm^{-1} , à deformação axial do grupo NH_2 no plano (SILVERSTEIN, *et al.* 1993). A banda em 1665 cm^{-1} indica a presença de grupos acetamidas.

A quitosana, poli- β -D-Glicosamina, é o principal derivado da quitina, que pode ser obtido através da desacetilação, sendo que a diferença entre elas é a quantidade de grupos N-acetil (PETER, 1995).

O biopolímero foi submetido a hidrólise para ser determinado o teor de unidades monoméricas de D-glicosamina. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a análise de carboidratos presentes no micélio de *Penicilium* sp.

Os dados apresentados mostram que os teores de glicosamina foram inferiores ao peso total obtido para quitosana, neste caso, pode-se sugerir a não hidrólise total da quitosana no processo químico ou a dificuldade da transformação quitina – quitosana durante a extração. Este último fator pode ser verificado no I.V (Figura 11), devido a presença da banda 1665 cm^{-1} indicando ainda a presença de grupos acetamida da quitina.

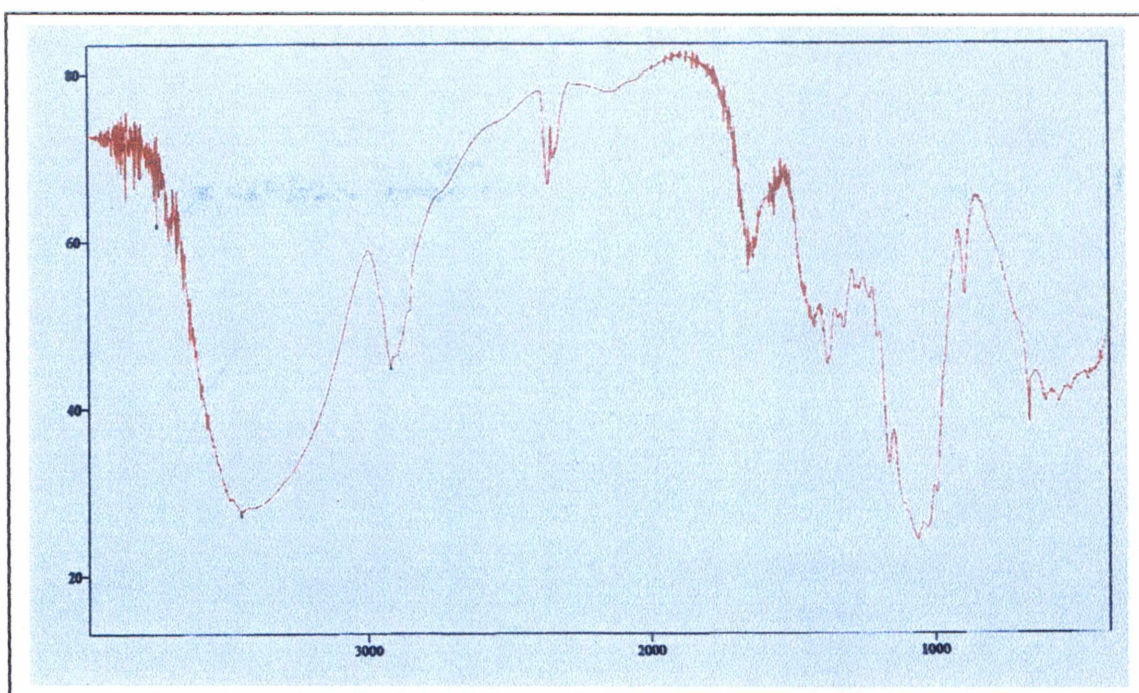


Figura 11. Espectro de Infra Vermelho do biopolímero Quitosana.

Tabela 5. Análise química de carboidratos presentes no micélio do *Penicillium sp.* em FES

Tempo de fermentação (h)	Atividade enzimática (U/mL)	Peso (g)* quitosana	Glicosamina (g)**
15	4,4	n.d	n.d
26	8,6	0,0085	0,0081
32	18,9	0,0138	0,0126
42	38,0	0,0236	0,0212
48	43,0	0,0258	0,0220
67	38,0	0,0253	0,0218
72	29,0	0,0252	0,0219

* Determinado através da extração método descrito no item 4.5.1

** Determinada a quantidade através do método descrito no item 4.5.3

n.d =Não determinado

A partir dos resultados obtidos pode-se plotar os dados em um gráfico (Figura 12) onde verifica-se a formação da glicosamina em função do tempo de fermentação.

ARIMA *et al* (1967), correlacionou a presença de glicosamina em micélio de diferentes espécies de *Rhizopus sp*, encontrando-se um fator de 0,1145g de glicosamina/ g de micélio.

Paralelamente procedeu-se na determinação da biomassa de *Penicillium sp* , em fermentação em meio líquido tendo por objetivo correlacionar o teor de glicosamina presente na massa micelial em função do tempo (item 4.5.4).

A Figura 13, mostra o valor da biomassa obtida por fermentação em meio líquido. Na mesma figura observa-se que a maior atividade proteolítica foi obtida após 48 horas de fermentação, observando-se uma queda dessa atividade após 60 horas.

A massa micelial obtida após 48 h de cultura, foi submetida a análise do teor de glicosamina. Foi encontrando um valor de 0,1089 g de glicosamina/g de micélio seco (peso seco). Esse valor foi utilizado como fator de conversão para o teor de glicosamina (tabela 5) dosados na FES. O valor deste fator esta de acordo com o encontrado por ARIMA *et al* (1967) que trabalhou com o fungo *Rhizopus*.

Na Figura 14 está representado o valor da biomassa, em FES, a qual foi calculada pelo fator de conversão (0,1089 g glicosamina/g de biomassa) determinado em

fermentação líquida, bem como à produção de enzimas proteolíticas em função do tempo.

Podemos observar uma fase longa de adaptação do fungo ao substrato (fase lag 24 horas). A seguir ocorre um crescimento celular importante associado a produção de enzimas (fase exponencial entre 24 e 48 horas) e finalmente uma fase estacionária de 48 a 70 horas, onde não foi observado incremento na atividade enzimática.

Não foi possível determinar a biomassa nas primeiras horas de fermentação, devido a sensibilidade do método em acompanhar teores muito reduzidos de glicosamina. Foi possível detectar a presença da atividade enzimática após 15 horas de fermentação. A não produção de proteases nas primeiras horas de fermentação, pode ser explicada pelo tempo necessário para germinação dos esporos e formação da massa micelial. Podemos também verificar que a produção da enzima proteolítica foi superior em fermentação no estado sólido quando comparada com a fermentação em meio líquido. O valor máximo produzido foi 2150 U total para a FES e 115 U total para a fermentação submersa. Isso representa uma produção de enzima 18,7 vezes mais elevada quando utilizada a FES.

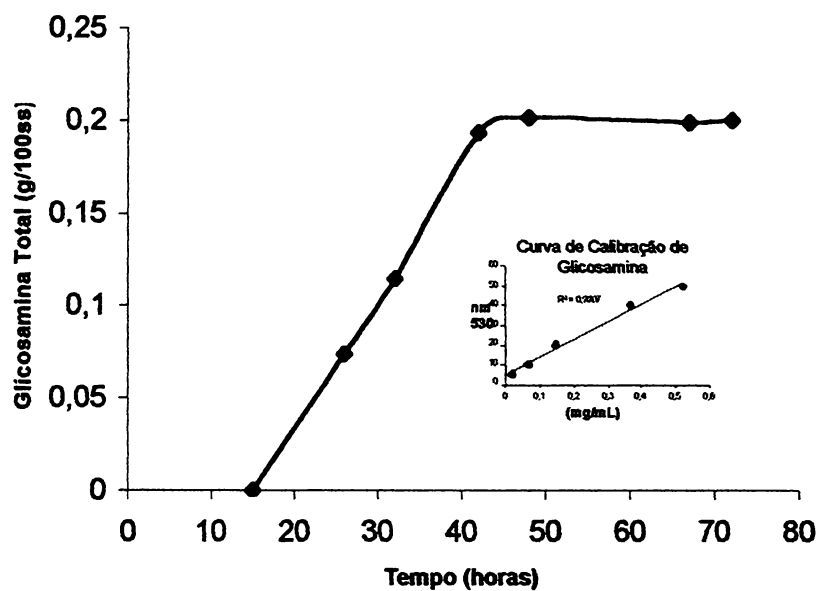


Figura 12. Teor de glicosamina durante a fermentação em estado sólido.

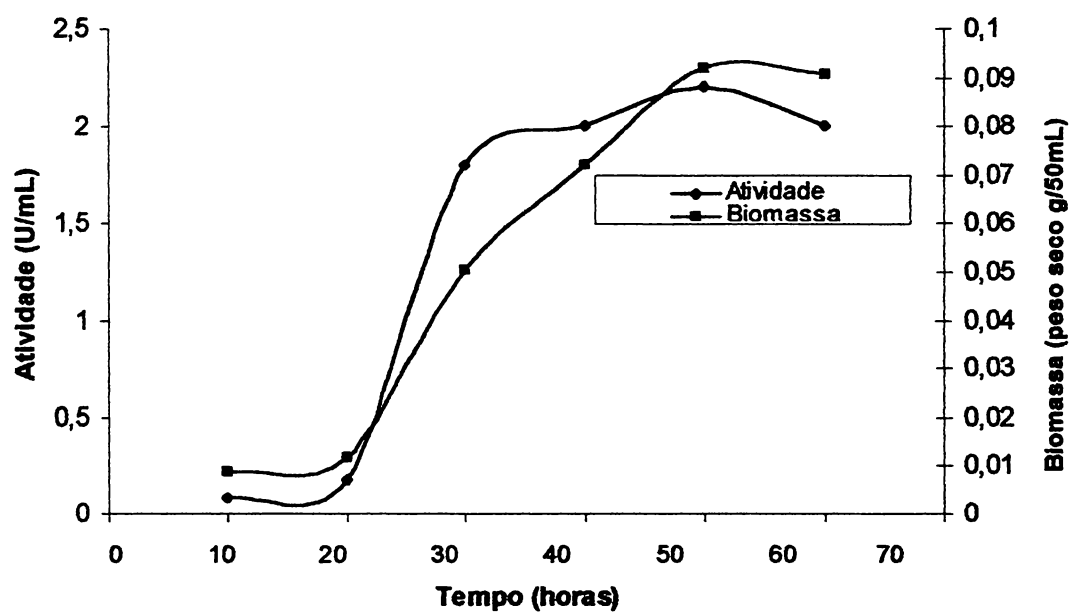


Figura 13. Determinação da biomassa em fermentação em meio líquido

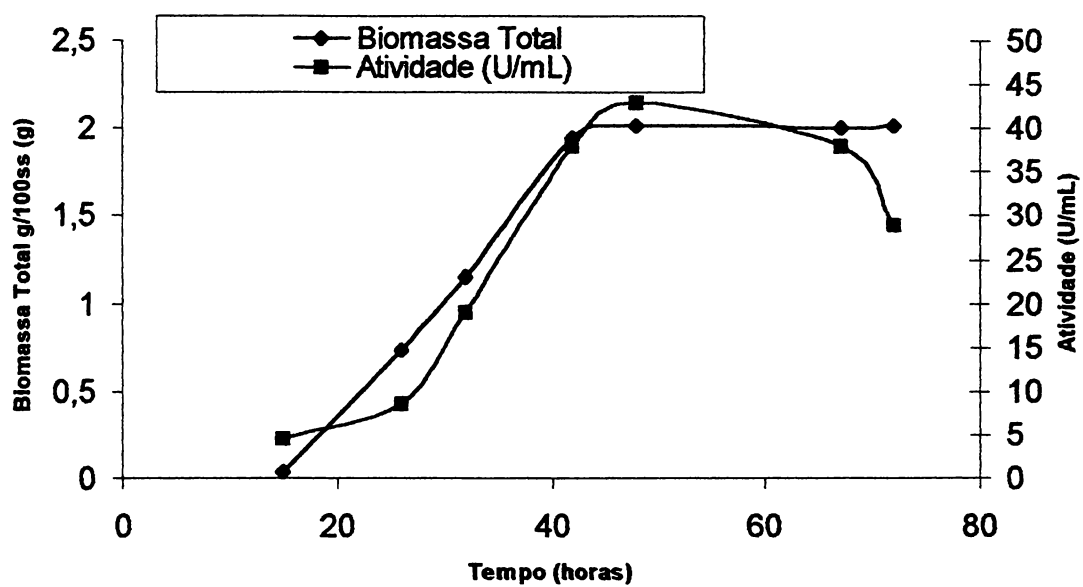


Figura 14. Curva de biomassa produzida em fermentação em estado sólido.

5.7 Microscopia eletrônica do crescimento do *Penicillium* sp em farelo de soja.

Com a finalidade de avaliar o crescimento microscópico do *Pennicilium* sp. em farelo de soja foi realizado um experimento em frascos Erlenmeyers, contendo 10 g de farelo de soja. As amostras fermentadas em diferentes tempos de cultura (12, 24, 36, 48 e 72 h) e fixadas em solução de glutaraldeído a 3% foram mantidas em geladeira. O resultado do experimento, pode ser visualizado nas figuras abaixo.

A Figura 15 representa as primeiras 12 horas de cultura. Podemos verificar que ainda não ocorreu a germinação dos esporos sobre os grânulos do farelo de soja. Os estudos microscópicos estão de acordo a cinética realizada anteriormente para estimação da biomassa pela dosagem da glicosamina (Fig. 12 e 14).

Na Figura 16 , após 24 horas de cultura pode-se observar o aparecimento de hifas de *Penicilium* sp na superfície do farelo de soja, nesta fase não ocorreu ainda a formação de conídios, organismos reprodutivos típicos dos fungos filamentosos.

Após 48 horas de cultura podemos verificar um crescimento expressivo do fungo pela formação de uma massa micelial importante. Essa massa micelial sobre o suporte-substrato está diretamente relaciona com a atividade proteolítica máxima observada na Figura 17.

Decorridas 72 horas de cultura, podemos observar que o fungo já está produzindo esporos , fase esta caracterizada pela baixa atividade enzimática encontrada (Figura 18). A formação de esporos tem início devido à limitação de um ou mais fatores de crescimento presentes no meio de cultivo ou então pela formação de compostos tóxicos oriundos do processo de metabolismo do fungo.

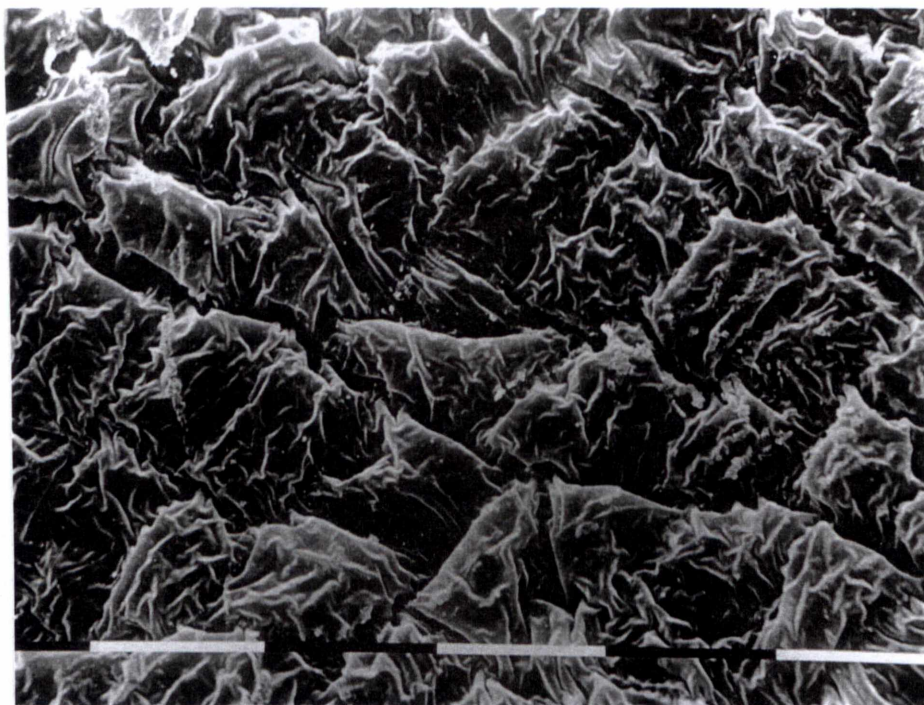


Figura 15. Microscopia eletrônica da superfície do substrato-suporte (farelo de soja), no tempo de fermentação de 12 horas (2100 $\times$)



Figura 16. Crescimento do fungo *Penicillium* sp, no tempo de fermentação de 24 horas (2100 $\times$).

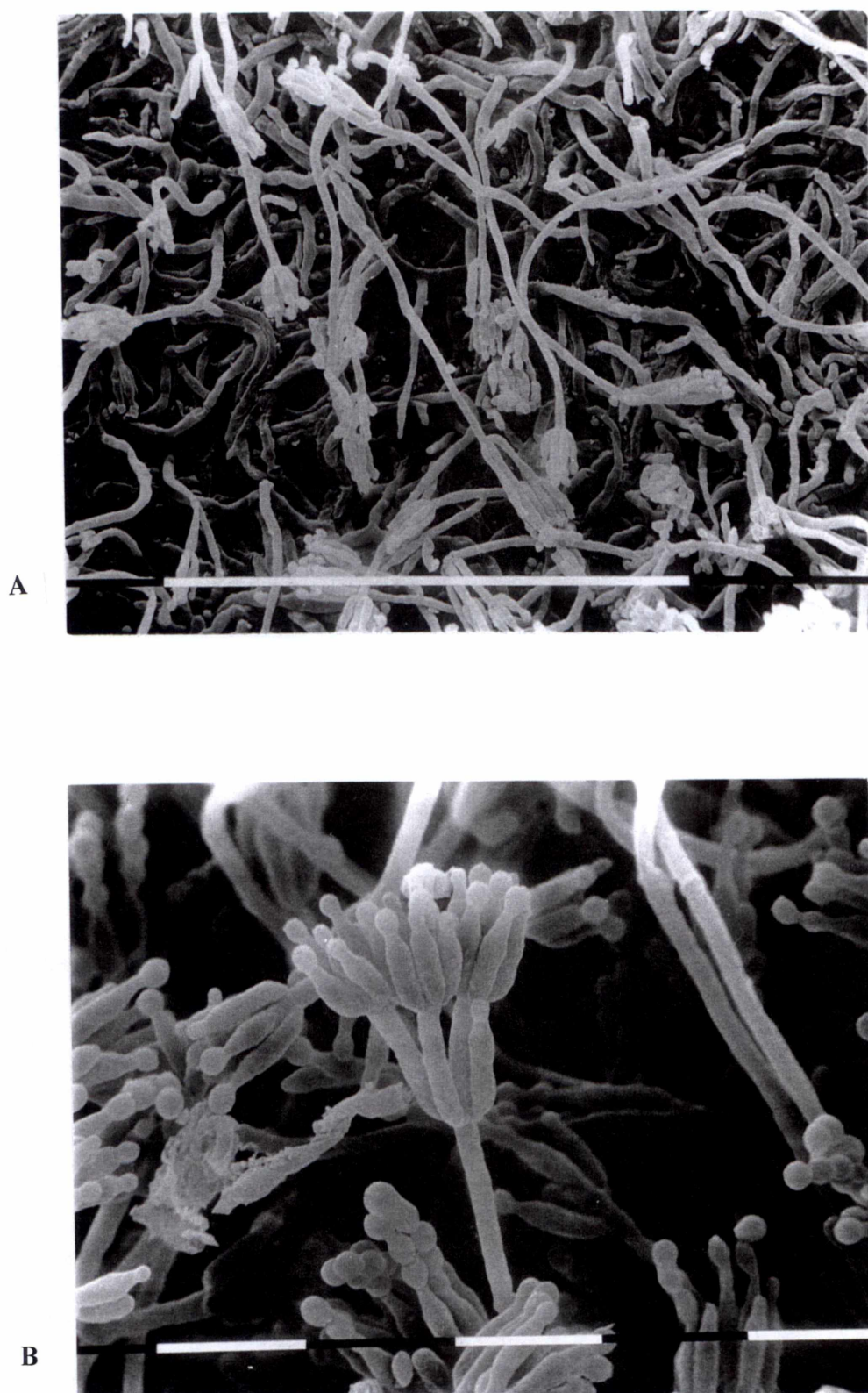


Figura 17. Crescimento do fungo *Penicillium* sp, no tempo de fermentação de 48 horas.
A (745 x): crescimento miceliano; B (2100 x): conídios em forma de pincel de *Penicillium* sp.

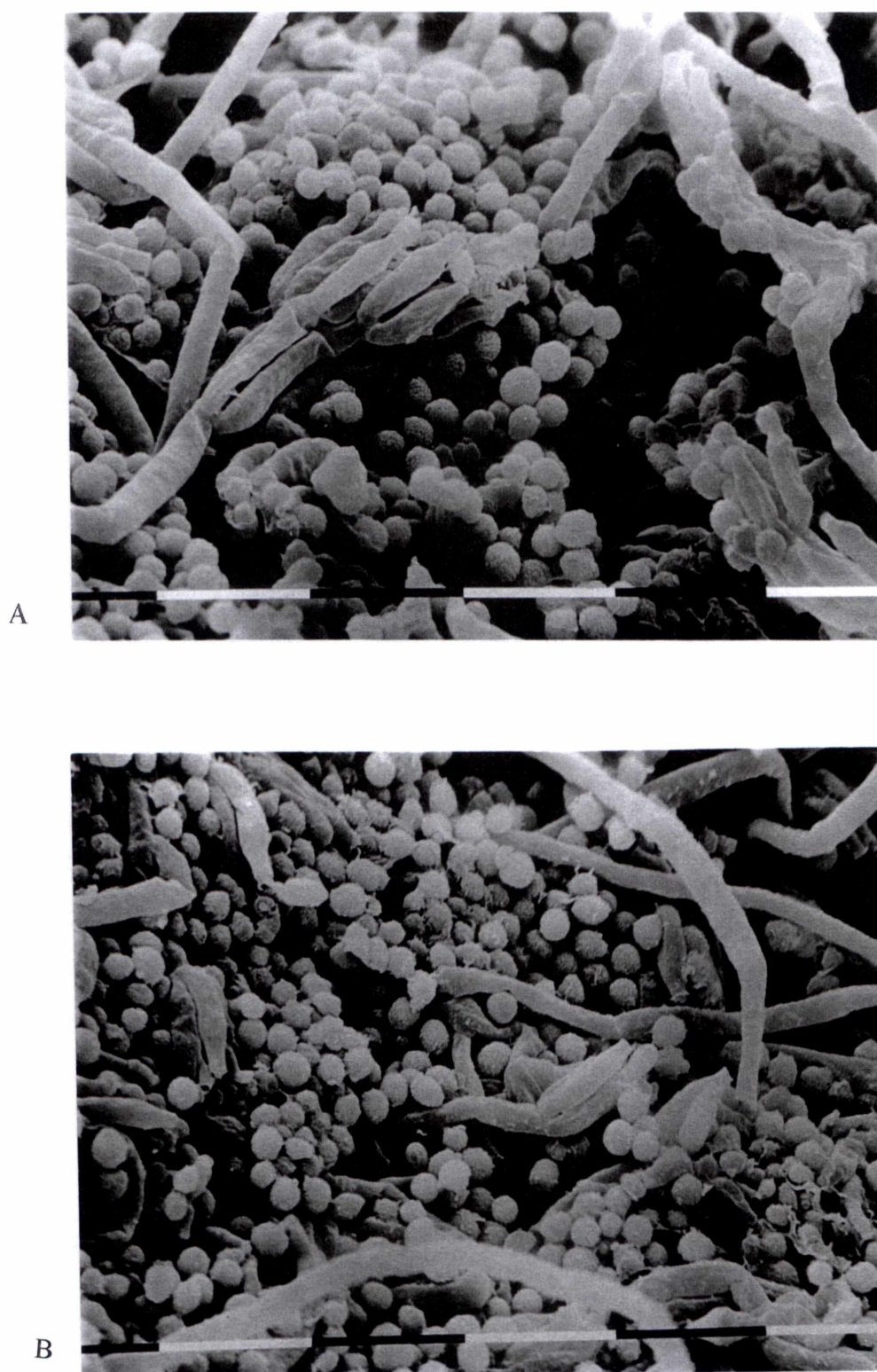


Figura 18. Crescimento do fungo *Penicillium* sp, no tempo 72 horas. A e B (2100 $\times$): presença de esporos e micélios de *Penicillium* sp.

5.8 Otimização da fermentação em bioreator tipo coluna

5.8.1 Planejamento experimental 3 . Efeito da umidade e aeração.

Foi estudado o efeito da aeração na produção de enzimas proteolíticas de *Penicillium sp* por FES, tendo como variáveis o conteúdo inicial de umidade e taxa de aeração . Os parâmetros foram otimizados em biorreator do tipo coluna.

O efeito desses parâmetros foram determinados no substrato-suporte (farelo de soja) em condições otimizadas anteriormente, utilizando temperatura de 28 °C e solução tampão citrato fosfato pH 5,0 (0,2 M).

Foi utilizado um planejamento experimental 3^{2-0} com uma replicata, cujos níveis de fatores estudados se encontram na Tabela 6.

Tabela 6. Níveis de fatores estudados no planejamento experimental 3

Fatores	Valores		
	-1	0	+1
Umidade (%)	45	50	55
Aeração (mL/min)	60	80	100

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da produção enzimática , avaliadas quanto a atividade enzimática (U/mL) e as respectivas taxas de aeração e umidade utilizadas no experimento.

Tabela 7. Influência da umidade e aeração na produção de enzimas proteolíticas

Ensaio	Replicata	Aeração	Umidade	AE. U/mL
1	1	60	45	40,00
2	1	60	50	45,00
3	1	60	55	49,00
4	1	80	45	36,00
5	1	80	50	35,00
6	1	80	55	42,50
7	1	100	45	32,00
8	1	100	50	29,00
9	1	100	55	34,00
10	2	60	45	38,00
11	2	60	50	47,00
12	2	60	55	51,00
13	2	80	45	39,00
14	2	80	50	40,00
15	2	80	55	45,00
16	2	100	45	30,00
17	2	100	50	27,00
18	2	100	55	30,00

AE = Atividade enzimática

O modelo estatístico aplicado na análise , das duas respostas, apresentou fator de correlação R^2 de 87 %, e os fatores estudados: umidade ($p= 0,007400$) e taxa de aeração ($0,000031$) foram significativos.

No diagrama de Pareto, Figura 19, verifica-se uma influência negativa na produção de enzimas a altas taxas de aeração. A mesma figura indica que o aumento no teor de umidade poderá exercer um efeito positivo sobre a produção da enzima.

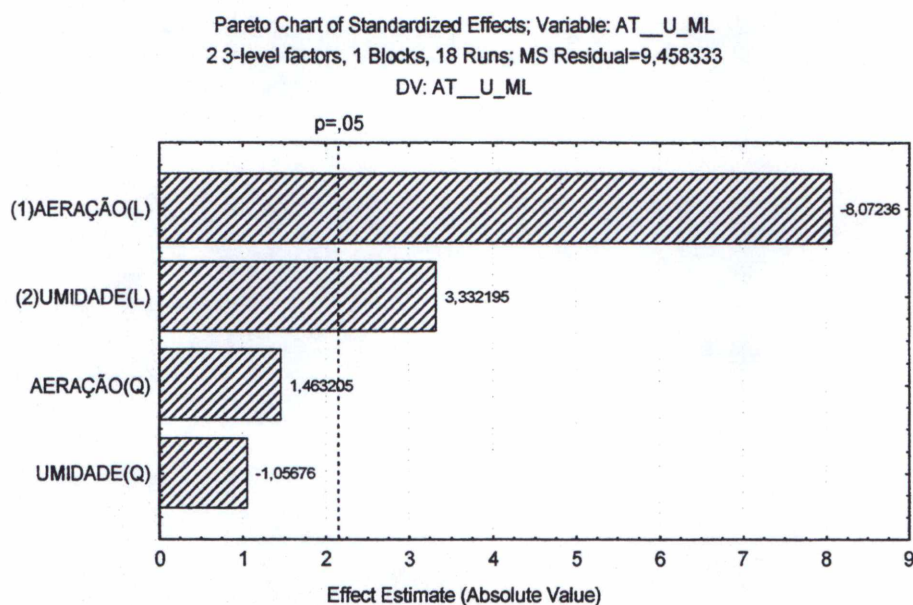


Figura 19. Efeito da aeração e umidade na produção de enzimas proteolíticas

4.1.2 Planejamento experimental 4

No planejamento experimental de número 4, foram avaliados novamente os parâmetros : umidade e aeração, uma vez que estes revelaram-se altamente significativos na otimização anterior.

Utilizando as mesmas condições ótimas de temperatura e pH, optou-se pela utilização de um planejamento central, 2^{3-0} , com dois pontos centrais.

O resultado é demonstrado na Figura 20, onde se observa um modelo centralizado, isto é o nível ótimo (aeração 65 ml/min/coluna e umidade inicial de 55%) na produção de enzima aparecendo inteiro no centro da figura. Os dados estatísticos revelam um fator de correlação de 91 %. Nessa otimização atingiu-se uma produção máxima de enzima de 49 U/mL.

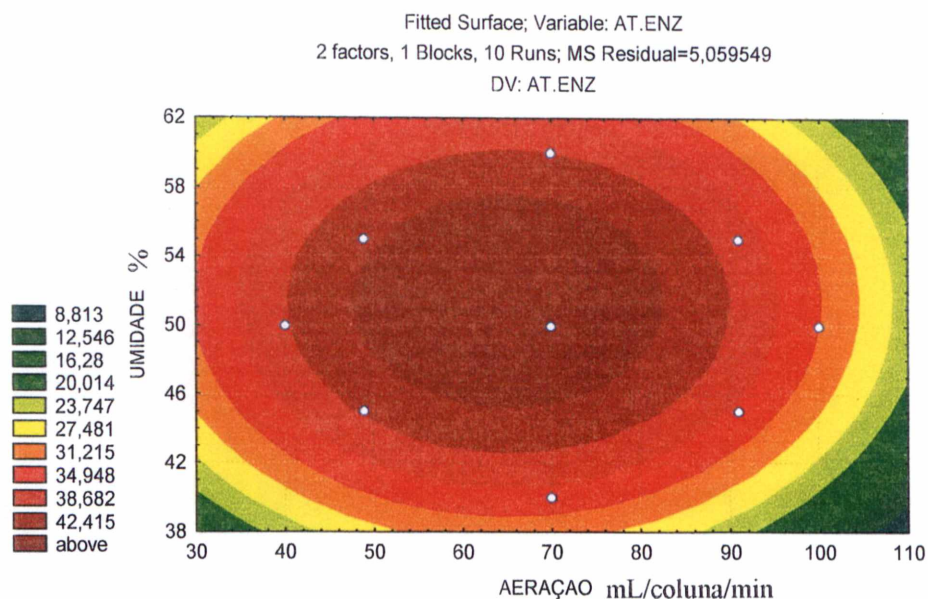


Figura 20. Planejamento Experimental 4: Efeito da aeração (mL/min/columa) e umidade (%) na produção de proteases de *Penicillium* sp.

A umidade ótima neste planejamento foi praticamente igual à obtida na fermentação em Erlenmeyers, ou seja em torno de 50-55 %, discordando da hipótese estatística anterior (Figura 19), de que umidades superiores influenciariam em uma maior atividade enzimática. A taxa de aeração está compreendida em valores intermediários, ou seja entre 60 e 70 mL/min.

Os resultados apresentados pela otimização em coluna, revelaram que a produção de enzimas foi superior em relação à obtida na fermentação em frascos Erlenmeyer, por sua vez, este aumento não significou um fator relevante na produção de enzimas, apresentando neste estudo, um incremento de apenas 1 %.

VANDENBERGHE, 2000, em seus estudos de produção de ácido cítrico em FES, verificou: que taxas de aeração diferenciadas no processo fermentativo, particularmente em atmosfera rica em CO₂, dificultava a liberação de conidiósporo de *A. niger*, resultando num aumento significativo da síntese de ácido cítrico.

Neste caso, necessitaríamos realizar estudos mais aprofundados do efeito da aeração no crescimento do fungo *Penicillium sp.* e produção de proteases.

5.9 Análise Respirométrica

Na cinética da fermentação, utilizando condições otimizadas (pH 5,0, temperatura de 28 °C, taxa de inoculação de 10⁸ esporos/g de substrato, taxa de aeração 65 mL/min e 55 % umidade inicial) foram avaliados através da análise respirométrica a evolução na produção de enzimas.

Foi realizado um balanço de massa com a finalidade de estimar a taxa de consumo de oxigênio (OUR) e a evolução da produção de CO₂ em termos de fluxo volumétrico (L/h). Se o fluxo de entrada de ar no bioreator (F_E) e de saída (F_S) era de 0,14 L/h/g de matéria seca. O seguinte balanço pode ser estabelecido :

$$V_{O_2S} = (\% O_2 s / 100) F_S$$

$$V_{CO_2S} = (\% CO_2 s / 100) F_S$$

$$V_{N_2S} = ((100 - \% O_2 s - \% CO_2 s) / 100) F_S$$

A partir do balanço de O₂ e N₂ obtêm-se:

$$V_{O_2Cons} = (20,9/100) F_E - (\% O_2 s / 100) F_S$$

$$V_{N_2E} = V_{N_2S}$$

Relacionando as diversas equações acima para o fluxo de ar de entrada e saída no bioreator tipo coluna temos :

$$F_E = (100 - \% O_2 - \% CO_2) F_S / 79.1 \quad (3)$$

Para estimar a taxa de consumo de oxigênio (TCO ou “OUR”) e o CO₂ produzido em unidades de fluxo de massa (mmoles/h), foi considerado que o ar como gás ideal, os respectivos fluxos volumétricos ($V_{O_2\text{cons.}}$ e $V_{CO_2\text{prod.}}$) foram corrigidos para temperatura de 28 °C. A Figura 21 representa as taxas da taxa de consumo de oxigênio e a produção de CO₂ durante a fermentação no estado sólido do farelo de soja pelo fungo *Penicillium* sp.

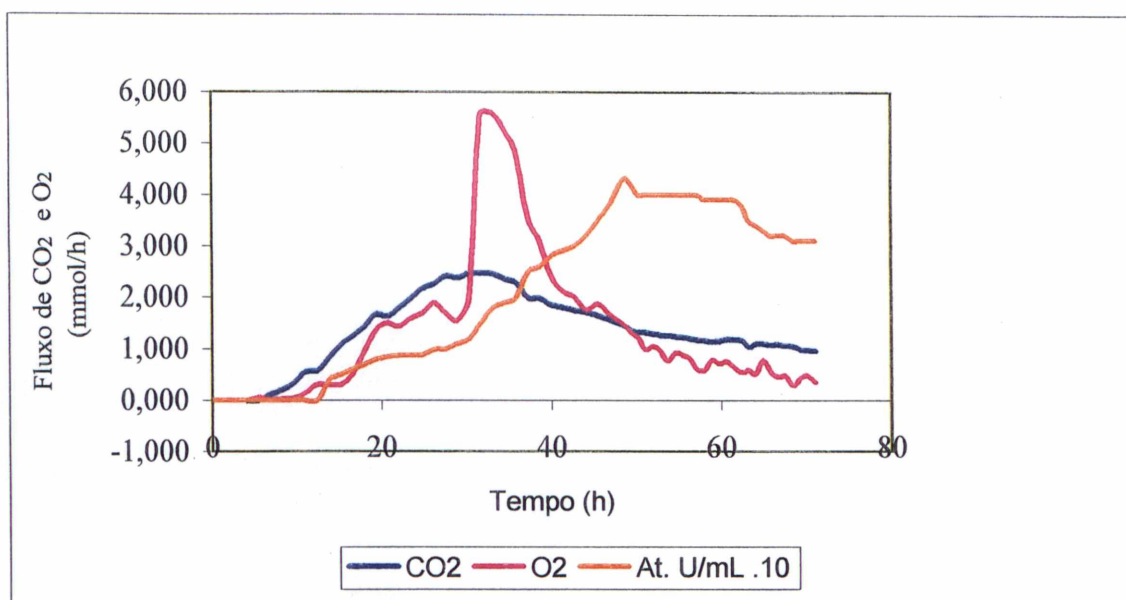


Figura 21. Evolução da taxa de consumo de oxigênio, produção de CO₂ e protease sintetizada em U/mL.

Na Figura 21, verifica-se que a produção máxima de enzimas (relacionada com a atividade proteolítica), ocorreu após 48 horas de fermentação, onde observa-se uma redução no consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. Nesta etapa, o fungo atingiu um valor máximo de crescimento miceliano, desta forma a competição por nutrientes favorecem a síntese de proteases. O crescimento fúngico atingiu uma fase estacionária entre 48 e 60 horas. A partir de 60 horas de fermentação observamos uma queda significativa da atividade proteolítica, caracterizado provavelmente em consequência do início da esporulação.

O coeficiente respirométrico (QR) foi calculado em função do CO_2 produzido e O_2 consumido durante todo processo fermentativo.

Podemos observar na Figura 22, que o processo apresenta características de um sistema parcialmente aeróbico nas primeiras 35 horas, com um quociente de respirométrico (QR) aceitável, da ordem de 0,5. Após 40 horas o sistema passou a aeróbico pois observou-se um aumento do QR para 0,8 ocasionado por uma elevação na produção de CO_2 , mantendo-se este valor até 50 horas de fermentação. Após este tempo observou um redução considerável no consumo de O_2 em relação a produção de CO_2 ocasionado uma elevação considerável do QR. Essa redução na taxa de respiração pode estar relacionado com a redução do crescimento do fungo após o desenvolvimento completo do micélio e início da esporulação.

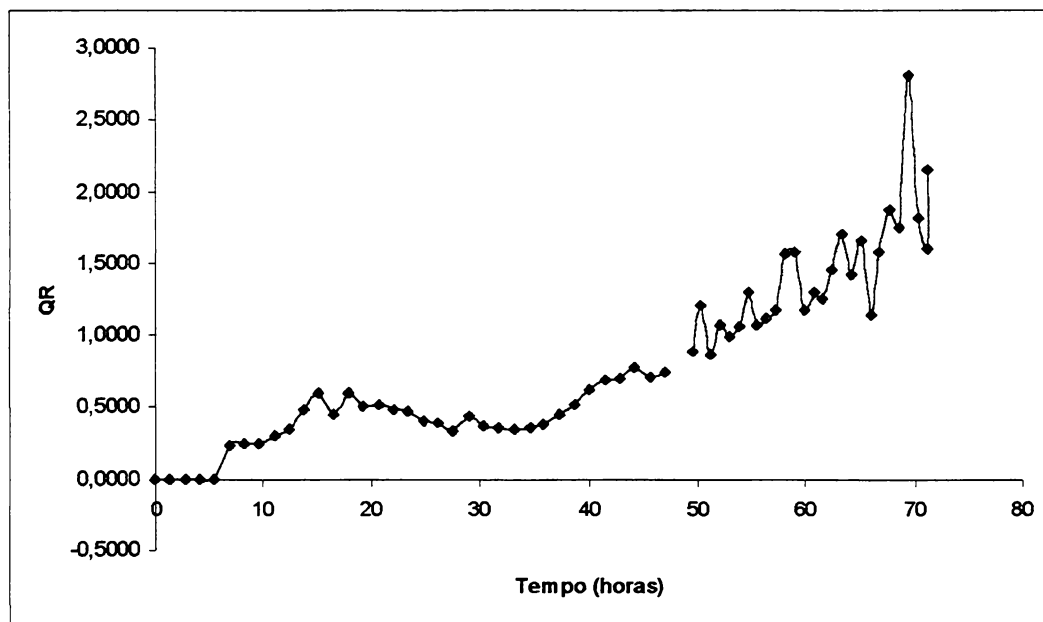


Figura 22. Evolução do coeficiente respirométrico (QR) durante a FES do farelo de soja por *Penicillium* sp.

A partir dos valores calculados para a taxa de consumo de oxigênio (OUR) e produção de CO₂, foi realizada uma estimativa dos parâmetros biotecnológicos do processo com base na equação proposta por SATO e YOSHIKAWA, (1985).

$$X_n = \left(Y_{x/o} \Delta t \left(\frac{1}{2} \left(\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right) + \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right) + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{n-1} X_i \right) / \left(1 + \frac{a}{2} \right) \quad (4)$$

onde:

$$a = m(Y_{x/o})\Delta t$$

O procedimento para estimar o conteúdo de biomassa em um momento particular (Δ_n) consiste em realizar uma triagem e uma estimativa de erro, assumindo valores para o rendimento de biomassa baseado no consumo de oxigênio ($Y_{x/o}$) e para o coeficiente de manutenção (m), por um programa denominado FERSOL, (RODRIGUEZ LEON *et al.*, 1988). Foram considerados, neste caso, valores de biomassa determinados analiticamente nos tempos de 24, 48 e 72 h com os valores preditos pela equação usando os seguintes dados : % O₂ Fs, % CO₂ Fs, OUR e CO₂ produzido.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos da fermentação no estado sólido para produção de proteases por *Penicillium* sp. O coeficiente de rendimento foi calculado com base no oxigênio consumido ($Y_{x/o}$) cujo resultado foi a um valor de 1,96 g biomassa por g O₂ consumido. O coeficiente de manutenção celular (m) máximo foi 0,0855 g O₂ consumido por grama e por hora de biomassa entre 50 e 70h de fermentação. A maior velocidade específica de crescimento (μ) foi de 0.173 h⁻¹.

O coeficiente de rendimento ($Y_{x/o}$) é aceitável e o coeficiente de manutenção (m) é alto, talvez devido a síntese das enzimas proteolíticas ou outras enzimas, mas é interessante observar que o coeficiente de manutenção mantém-se praticamente constante nas primeiras 50 horas de fermentação. Desta forma explica-se que durante o crescimento exponencial a energia empregada pelo microorganismo foi utilizada para a síntese de metabólitos, sugerindo que o padrão de síntese enzimática pareceu ser mais indutivo.

O comportamento do sistema após 50 horas pode ser considerado com uma variação, sendo que o resultado apresentado possa estar relacionado com a fase de esporulação do fungo, como foi observado nos estudos de microscopia eletrônica.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos e biomassa estimada à partir da “OUR” durante a fermentação no estado sólido do farelo de soja por *Penicillium* sp.

Intervalo de tempo	($Y_{x/o}$) g biomassa/g O_2 cons.	Biomassa determinada (g)	μ (h^{-1})	m	Coef. reg. (R^2)
0-24	1,959	0,86	0,173	0,0209	0,98
24-50	1,967	2,18	0,0390	0,0390	0,94
50-70	1,869	2,08	0,043	0,0855	0,95

μ (h^{-1})= velocidade específica de crescimento

m = coeficiente de manutenção celular (g O_2 /g biomassa/ h)

$Y_{x/o}$ = coeficiente de rendimento

5.10 Estudos da caracterização enzimática do extrato bruto de *Penicillium* sp

O extrato bruto obtido a partir da FES após 48 h de fermentação em condições ótimas e extraídas com solução de NaCl a 1%. Esse extrato foi analisado quanto às suas características cinéticas e de estabilidade.

5.10.1 Efeito da temperatura e pH

O efeito da atividade proteolítica em diferentes temperaturas e pHs estão apresentados nas Figuras 23 e 24, onde pode ser observado que a atividade máxima foi obtida na temperatura de 45°C e pH 6,5 (tampão fosfato 0,2M).

Para otimizar as variáveis físico-químicas da atividade enzimática foi realizado um plano fatorial 3^2 (2 fatores e 3 níveis), três pontos centrais, utilizando tampão fosfato, por ter apresentado em experimentos anteriores as mais altas atividades. Os valores da atividade foram expressos em mL (U/mL) e estão apresentados na Tabela 9. O coeficiente de regressão obtido (R^2) foi de 0,94864, o que pode ser considerado um bom resultado. Os níveis de significância ($p < 0,05$), apresentados para a variável temperatura foi ($p = 0,0000$) e para o pH ($0,0000$). Esses valores foram significativos, bem como a interação entre os dois fatores ($p = 0,001480$). Os resultados demonstrados nas Figura 25, comprovam que a atividade enzimática da protease de *Penicillium* sp. foi maior na temperatura de 45° C e pH 6,5 em tampão fosfato de sódio 0,2 M. Podemos portanto considerar esses valores como ótimos para temperatura e pH. Este pH ótimo de 6,5 mostra a afinidade da enzima por um meio neutro. De acordo com os resultados obtidos por DiSANTO *et al.*, (1992), que estudaram uma serina protease de *Mucor racemosus* e são semelhantes aos nossos para a atividade enzimática da protease. KUNDU e MANNA (1975) também caracterizaram uma protease extracelular de *Aspergillus oryzae* e encontraram o pH ótimo de 6,5 para a atividade proteolítica.

Estes resultados podem ser comparados com os obtidos por KANG *et al.*, (1995), em pesquisas realizada com uma protease de *Sreptomyces abdoflavus* . Neste caso a temperatura ótima foi de 40°C. KALISZ (1988), encontrou em suas determinações, a temperatura de 30°C como sendo ótima para proteases produzidas por *Aspergillus niger*.

Estudos com proteases de *Actinomycetos*, realizados por TSUJIBO *et al.*, (1990) obtiveram um pH ótimo entre 10-12, demonstrando tratar-se de proteases alcalinas.

Segundo BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1987), que caracterizaram uma serina protease secretada pelo fungo *Beauveria bassiana*, a temperatura ótima para a atividade enzimática se situava entre 37°C e 42°C e o pH ótimo em 8,5. GUPTA *et al.*, (1999) trabalhando com proteases de *Bacillus* sp. demonstraram que se tratava de proteases alcalinas, devido ao pH ótimo desta enzimas se encontrarem na faixa alcalina. Também GIMENEZ *et al.*, (2000) estudando uma protease extracelular de *Natrialba magadii* encontrou uma temperatura ótima de 60°C e um pH ótimo entre 8-10 para a atividade enzimática desta protease, sendo esta, uma protease alcalina.

Em suas pesquisas, DATTA (1992), caracterizou uma protease de *Phanerochaete chrysosporium* e determinou o pH ótimo como sendo de 4,0 para a atividade enzimática, mostrando ser uma protease ácida, o mesmo ocorreu com OSAKU (1996), que encontrou em seu estudo uma protease de *Thelephora terrestris*. a temperatura ótima para atividade enzimática foi de 40°C e o pH 4,8, sendo também classificada como protease ácida. Com base em nossos estudos, bem como o que está reportado na literatura podemos considerar que a enzima obtida de *Penicillium* sp. pode ser classificada como uma protease de natureza neutra.

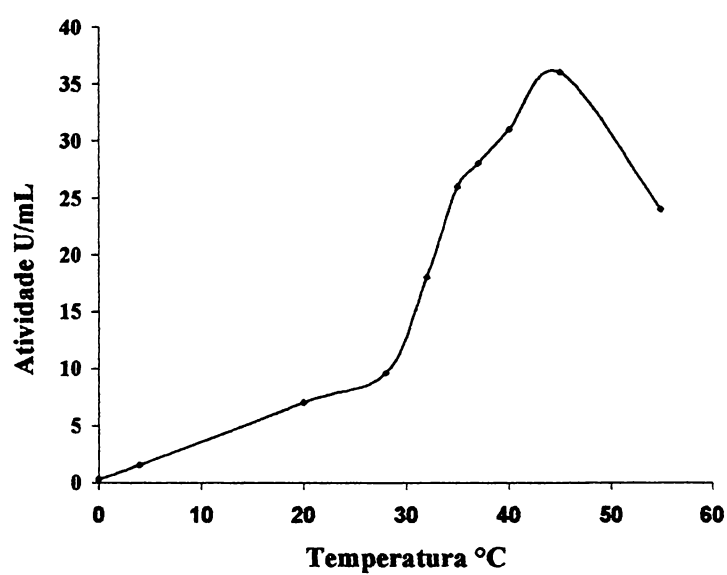


Figura 23. Efeito da temperatura sobre a atividade proteásica

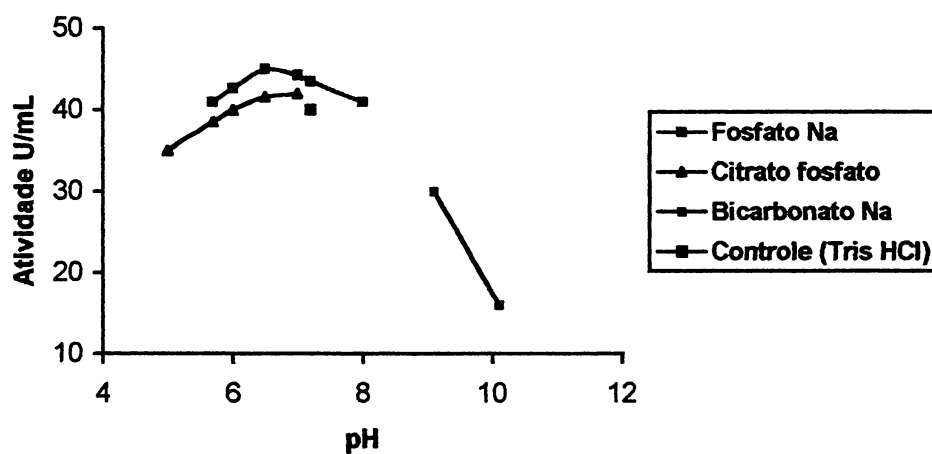
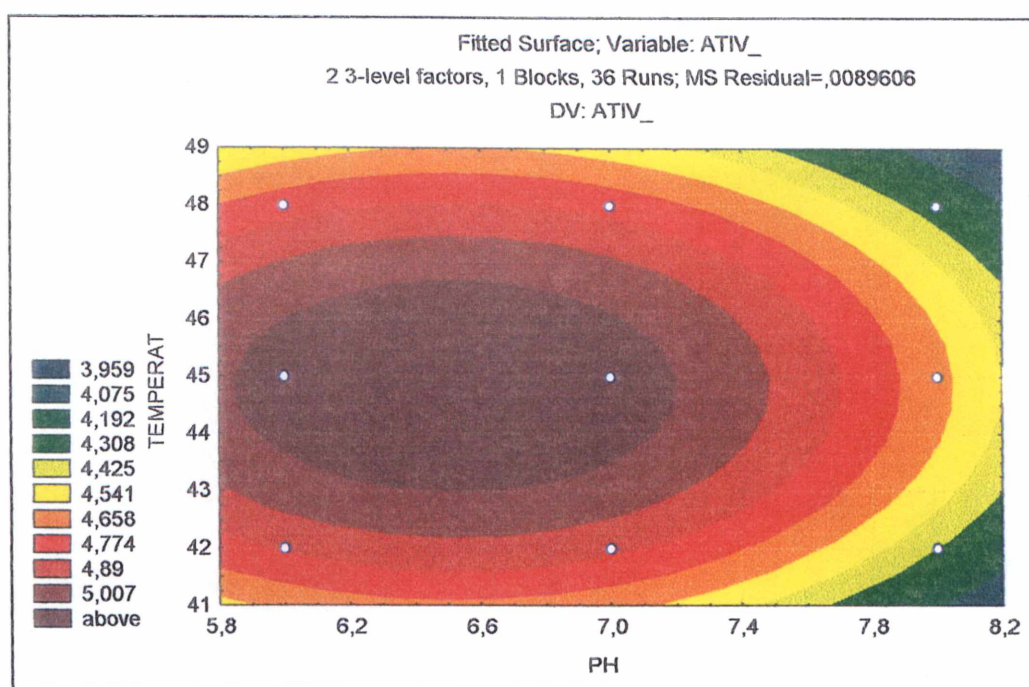


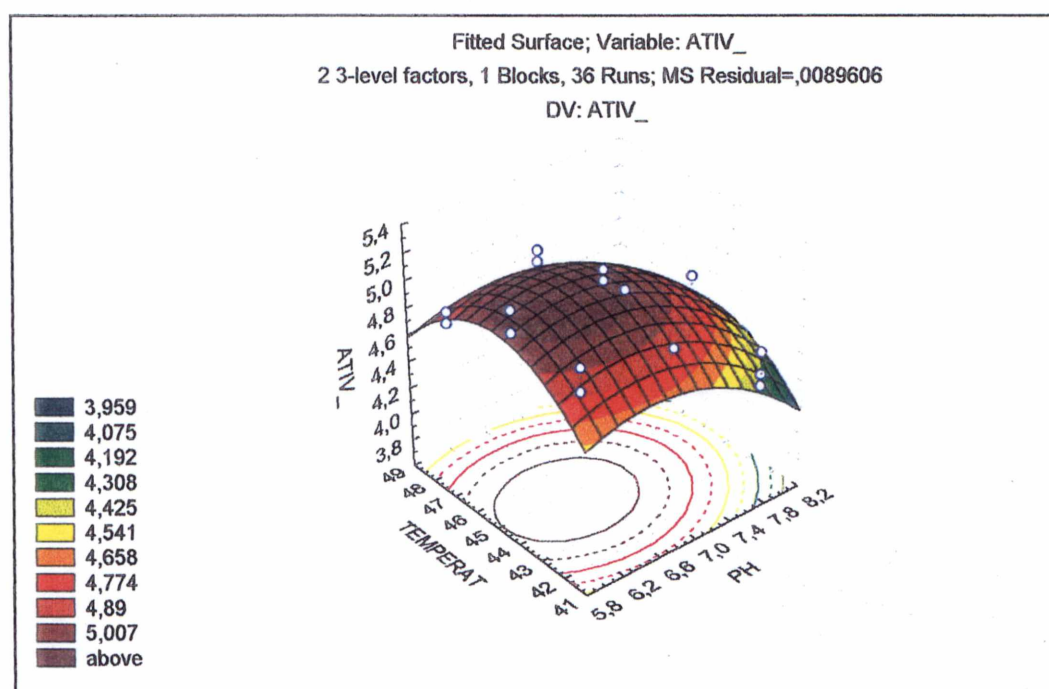
Figura 24. Efeito do pH sobre a atividade proteásica

Tabela 9: Planejamento experimental para a otimização das variáveis físico-químicas (pH e temperatura) relacionada com a atividade enzimática

Replicata	Blocos		pH	Temperatura	Atividade (U/ml)
1	1	1	7,0	48,0	49,0
2	1	1	8,0	45,0	47,0
3	1	1	6,0	42,0	50,0
4	1	2	6,0	45,0	49,0
5	1	2	8,0	48,0	42,0
6	1	2	7,0	42,0	48,0
7	1	3	8,0	42,0	44,0
8	1	3	6,0	48,0	47,0
9	1	3	7,0	45,0	51,0
10 (C)	1	1	7,0	45,0	51,0
11 (C)	1	2	7,0	45,0	51,0
12 (C)	1	3	7,0	45,0	51,0
13	2	1	7,0	48,0	48,0
14	2	1	8,0	45,0	47,0
15	2	1	6,0	42,0	48,0
16	2	2	6,0	45,0	51,0
17	2	2	8,0	48,0	42,0
18	2	2	7,0	42,0	48,0
19	2	3	8,0	42,0	42,0
20	2	3	6,0	48,0	46,0
21	2	3	7,0	45,0	50,0
22 (C)	2	1	7,0	45,0	51,0
23 (C)	2	2	7,0	45,0	50,0
24 (C)	2	3	7,0	45,0	50,0
25	3	1	7,0	48,0	48,0
26	3	1	8,0	45,0	47,0
27	3	1	6,0	42,0	48,0
28	3	2	6,0	45,0	51,0
29	3	2	8,0	48,0	42,0
30	3	2	7,0	42,0	48,0
31	3	3	8,0	42,0	41,0
32	3	3	6,0	48,0	47,0
33	3	3	7,0	45,0	50,0
34 (C)	3	1	7,0	45,0	50,0
35 (C)	3	2	7,0	45,0	50,0
36 (C)	3	3	7,0	45,0	49,0



A



B

Figura 25. Projeção da superfície de resposta (A) e superfície de resposta (B), dos fatores estudados , pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), sobre a atividade proteolítica (U/mL.10)

5.11 Estabilidade da protease extracelular frente ao pH e temperatura

A Figura 26 demonstra que a termoestabilidade do extrato enzimático bruto da protease extracelular de *Penicillium* sp, varia entre 35°C-70°C. Os resultados obtidos ao longo de 60 minutos mostram que as proteases mantêm-se estáveis em temperaturas da ordem de 35°C, restando assim cerca de 80 % de sua atividade por 60 minutos. Porém, não apresenta boa termoestabilidade em temperaturas acima de 50°C mantendo apenas 20% de sua atividade após um tempo de 20 minutos. Em temperaturas inferiores à 30 °C, a enzima se mantém com aproximadamente 100 % de sua atividade, por um período de 2 horas. Em geladeira (4 °C) o extrato bruto manteve-se praticamente estável, durante um tempo de 30 dias. Estudos feitos por BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1987), com uma protease do fungo *Beauveria bassiana*, observaram que esta protease se manteve estável por 40 minutos a 27°C, mas foi inativada em temperaturas mais altas, reteve cerca de 40% de sua atividade após 30 minutos a 40°C, a temperatura de 60°C a protease foi rapidamente inativada em 5 minutos. Contudo uma protease ácida de *Aspergillus niger* conservou 60% de sua atividade a 80°C (SINGH *et al.*, 1994).

OSAKU (1996), em seu trabalho de caracterização de uma protease de *Thelephora terrestris*, observou que em temperatura acima de 45°C a atividade enzimática caiu, houve uma perda de 53% da atividade nos primeiros 10 minutos a 50°C.

A curva de estabilidade ao pH está indicada na Figura 27. A protease apresenta boa estabilidade nos diferentes valores de pH testados, demonstrando melhor estabilidade em tampão fosfato. A menor retenção de atividade obtida foi de 50% com tampão citrato 0,1M e pH 5,8. TSUJIBO *et al.*, (1990) e BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1988), encontraram resultados similares com as enzimas secretadas pelo fungo por eles pesquisado.

Em estudos de proteases feitos por TSUJIBO *et al.*, (1990) a protease demonstrou estabilidade ao pH em uma faixa de 4 - 8 no tampão fosfato. OSAKU (1996), em seu estudo observou uma boa estabilidade na faixa pH 4,6 a 5,6.

Com base resultados da atividade na temperatura e pH ótimos da protease extraída, pode-se sugerir uma afinidade por meios neutros e também dizer que a termoestabilidade encontra-se próximo de sua faixa de temperatura ótima.

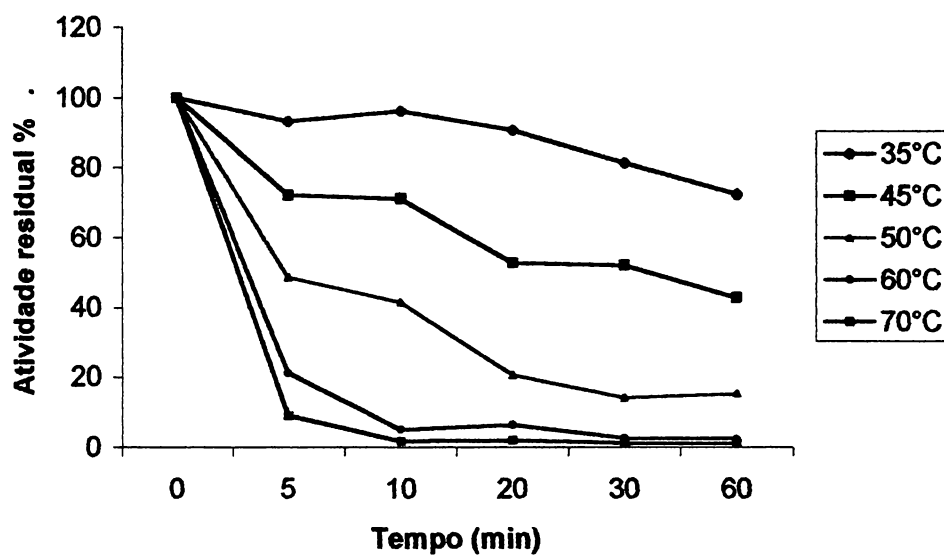


Figura 26. Termoestabilidade da protease entre 35 e 70°C

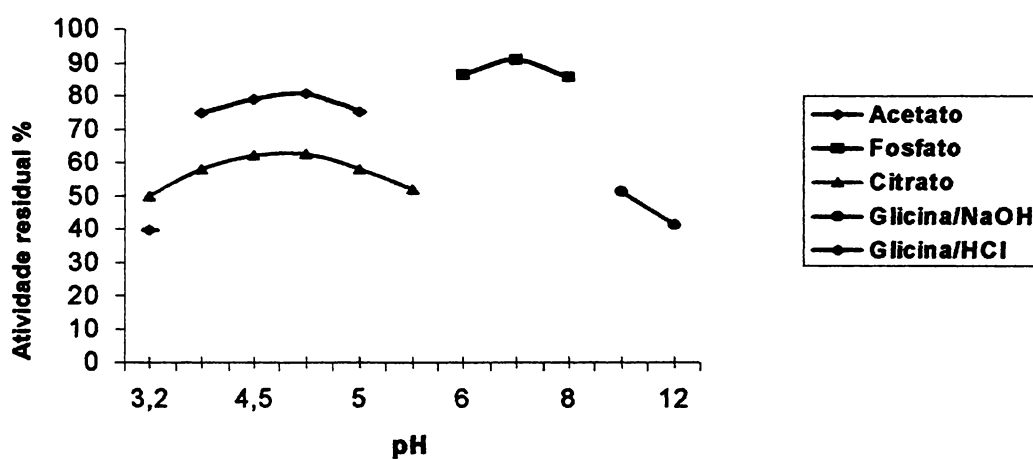


Figura 27. Curva de estabilidade ao pH entre 3,2 e 12.

5.12 Atividade enzimática frente a diferentes substratos

Os dados apresentados na Tabela 10 mostram que o substrato azocaseína, uma proteína globular, nas condições de ensaio é hidrolisado preferencialmente pela atividade proteolítica da protease de *Penicillium* sp., a azoalbumina também foi degradada, mas a atividade maior foi obtida com o uso de azocaseína. A protease em presença do azocoll, uma proteína fibrosa derivada do colágeno, não apresentou atividade enzimática relevante, pois esta não é facilmente digerida, não sendo portanto um bom substrato.

Tabela 10. Atividade proteolítica de *Penicillium* sp. frente a diferentes substratos

Substrato (10mg)	Atividade (U/mL)
Azocaseína	50
Azoalbumina	41
Azocoll	1,05

*Condições de ensaio: temperatura 45°C e pH=6,5

5.13 Inibidores da atividade proteolítica

Vários inibidores da atividade proteolítica foram testados para estabelecer a identidade da protease: PMSF, que inibe a serina protease; EDTA, que é um quelante de metais; EGTA, que tem especificidade pelo cálcio; E-64, que é um inibidor de cisteína proteases; pepstatina, um inibidor de proteases ácidas; PCMB, um composto mercurial, que reage com os grupos tióis livres.

Na Tabela 11 observa-se o efeito dos diferentes inibidores na atividade da protease estudada. Pelos resultados obtidos verificou-se que 93% da protease foi inibida pela ação do PMSF, um inibidor específico de serina proteases. O perfil de inibição da atividade proteolítica de *Penicillium* sp. mostrou que essa atividade não foi inibida por pepstatina. Estes dados sugerem que o ácido aspártico não se encontra no sítio ativo da enzima, e que esta atividade não é de uma

protease ácida. A atividade foi inibida em 37% por PCMB, este resultado sugere que as pontes dissulfeto podem estar envolvidas no processo de estabilização da enzima, como foi observado por KRARUP *et al.*, (1994).

A enzima proteolítica do fungo *Penicillium* sp. também foi inibida em cerca de 23% por EDTA e em 20% por EGTA, supondo que a protease depende do cálcio e outros íons para exercer sua atividade. A atividade foi inibida em 16% por E-64 o qual segundo HASNAIN *et al.*, (1994) é um inibidor específico de cisteína proteases, o que sugere que pode haver resíduos de cisteína no sítio ativo da enzima.

Os percentuais de inibição da protease alcalina de *actinomiceto* estudada por TSUJIBO *et al.*, (1990) e da protease de *B. bassiana* estudada por BIDOCHKA e KHACHATOURIANS (1987), foram similares aos detectados neste estudo. Estes percentuais conferiram a estas proteases a classificação de serina protease. CARMONA *et al.*, (1995) também relataram que a protease do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi irreversivelmente inibida por PMSF, sugerindo que esta protease seria uma serina protease. Em seu trabalho OSAKU (1996), relatou que as serinas proteases são inibidas por PMSF e levemente inibidas pelo EDTA.

Tabela 11. Efeitos de inibidores na atividade enzimática

Inibidores	Concentração	Inibição (%)
Controle	---	---
Pepstatina	1,3 mM	1,6
PCMB	5 mM	37
PMSF	3 mM	93
EGTA	5 mM	20
EDTA	5 mM	23
E-64	1 mM	16

A partir destes resultados podemos classificar a protease de *Penicillium* sp. como sendo uma serina protease pois foi inibida em 93% por PMSF, um inibidor específico de serina protease (BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1987; COLE *et al.*, 1993 ; CARMONA *et al.*, 1995 ;

DiSANTO *et al.*, 1992 ;HASNAIN *et al.*,(1991). Os resultados encontrados para a inibição permitem levantar a hipótese de que não se trata apenas de uma enzima proteolítica específica, mas sim de uma família de proteases.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o potencial de uso da enzima obtida para aplicação industrial, uma vez que a maioria das proteases usadas na fabricação de detergentes são serinas proteases.

5.14 Ensaio com cátions para a ativação da protease

A Tabela 12 demonstra o efeito de íons metálicos na atividade da protease estudada. Os dados relacionados evidenciaram que a atividade enzimática é reduzida na presença dos íons Co^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , enquanto que na presença do Ca^{+2} e Na^{+} houve um fraco aumento, sugerindo o efeito destes íons sobre a atividade enzimática de cálcio. Segundo MANONMANI (1973) os níveis de cálcio (1mM) aumentaram a catálise enzimática da protease do *Trichoderma Koningii* em 1,7 vezes, demonstrando ser uma enzima dependente de cálcio. Estes dados confirmam que certos íons metálicos interferem na atividade de certas enzimas ativando-as ou inativando-as (SAMPATH *et al.*, 1997).

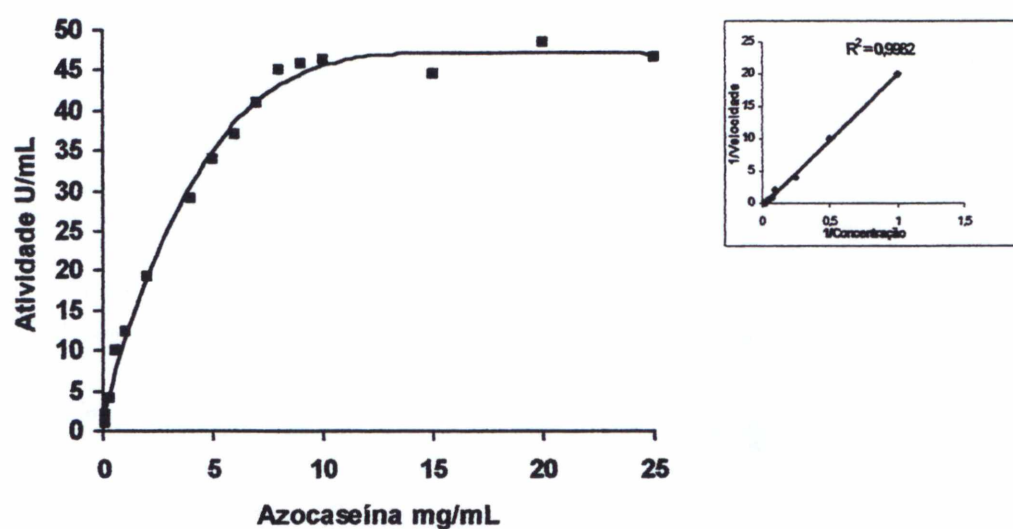
OSAKU (1996) no seu estudo com a protease de *Thelephora terrestris* evidenciou que o íon Ca^{+2} não ativou a enzima, no entanto a enzima foi ativada em 5,38% pelo Co^{+2} e 1,33% pelo Mg^{+2} . Conforme TSUJIBO *et al.*, (1990), a serina protease de *Actinomyces* por eles estudadas não sofreu inibição significativa por nenhum dos íons testados, mas apresentou uma relevante ativação pelos íons Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} . Desta forma sugere-se estudos futuros para otimização da atividade utilizando diferentes concentrações dos sais que ativaram a protease de *Penicillium sp.*, neste estudo.

Tabela 12. Efeitos dos íons metálicos na atividade enzimática

Atividade enzimática em presença de cátions		
Cátions	Concentração	Atividade U/mL
“controle”	0,1 mM	51,6
Mg ²⁺	0,1 mM	22,7 ± 0,007
Na ⁺	0,1 mM	53,0 ± 0,002
Ca ²⁺	0,1 mM	55,0 ± 0,001
Co ²⁺	0,1 mM	37,4 ± 0,001
Zn ²⁺	0,1 mM	2,2 ± 0,006

5.15 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Na Figura 28, observa-se o perfil da atividade frente a diferentes concentrações do substrato. O $K_{m\text{ app}}$ (K_m aparente) calculado pelo programa ENZIFIT (mat. e métodos 4.11), revelou um valor de $2,8 \pm 0,39$ mg/mL, utilizando como substrato a azocaseína.

**Figura 28.** Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.

5.16 Compatibilidade da protease com detergentes comerciais e estabilidade frente a agentes oxidantes e surfactantes

Estudos prévios foram realizados para verificar a possível aplicação desta enzima na produção de detergentes comerciais. Primeiramente se avaliou a compatibilidade das substâncias utilizadas na retirada de manchas (ação branqueadora) e tensoativos.

Nas Figuras 29 e 30 estão demonstrados os resultados da compatibilidade da ação de nossa protease com detergentes comerciais encontrado no mercado. A Figura 29 mostra que a protease reteve mais de 80% de sua atividade na presença do detergente em pó Omo Multi-Ação® em 30 minutos. Observa-se também na Figura 30, quando utilizou-se o detergente Omo Máquina® que a protease reteve cerca de 60 % de sua atividade após 60 minutos. Os resultados foram compatíveis aos de PHADATARE *et al.*, (1993), trabalhando com uma protease alcalina de *Conidiobolus coronatus* para verificar sua compatibilidade frente detergentes comercializados na Índia. Segundo dados de literatura especializada, proteases de fungos filamentosos são consideradas eficazes em função da atividade retida e da capacidade de degradar proteínas mesmo sendo utilizadas baixas concentrações em soluções de detergentes (PHADATARE *et al.*, 1993).

Estudos foram realizados igualmente para avaliar o efeito do agente oxidante (peróxido de hidrogênio) na atividade da protease no extrato bruto (Figura 31). Os resultados obtidos mostraram que a enzima possui boa estabilidade na solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 5 % , por uma hora, se mantendo com atividade em torno de 80 %, quanto a solução a 10 % , manteve-se com uma atividade de cerca de 40 %.

A estabilidade ao peróxido de hidrogênio é uma importante propriedade para a aplicação em indústria de detergentes, pois a estabilidade das enzimas frente a branqueadores , geralmente são inviabilizadas, pois as mesmas podem sofrer modificações estruturais em seu sítio catalítico, podendo torná-las inviáveis (GUPTA *et al.*, 1999).

A protease em questão apresentou boa estabilidade na solução de peróxido de hidrogênio, podendo exercer uma atividade mais pronunciada uma vez que o experimento foi realizado no extrato bruto, desta forma sujeita a presença de contaminantes no meio.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados do efeito do agente surfactante. Observou-se uma diminuição da retenção da atividade com o aumento do tempo de incubação. Os valores da atividade residual foram de 89 % para o Tween 20 e 78 % para o Tween 80 após 60 minutos de incubação. Também na Tabela 13, verifica-se um discreto aumento de atividade nos primeiros minutos de incubação com o surfactante Tween 20, segundo GUPTA *et al.*, (1999) componentes surfactantes estimularam a protease de *Bacillus* SB50, utilizando, por exemplo, surfactantes como: saponina, SDS, Tween, colato de sódio.

Em função do potencial desses resultados, sugerimos estudos mais aprofundados com a protease por nós isolada tendo em vista sua aplicação na indústria de sabões e detergentes.

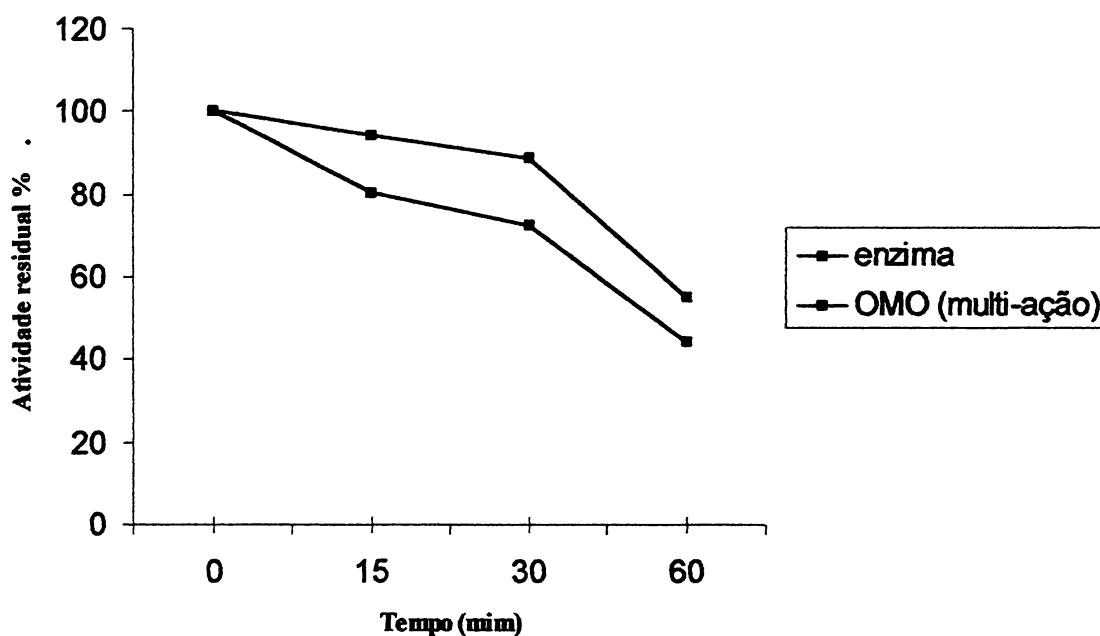


Figura 29. Compatibilidade da ação da protease de *Penicillium* sp em relação ao detergente comercial (OMO multi-ação®.)

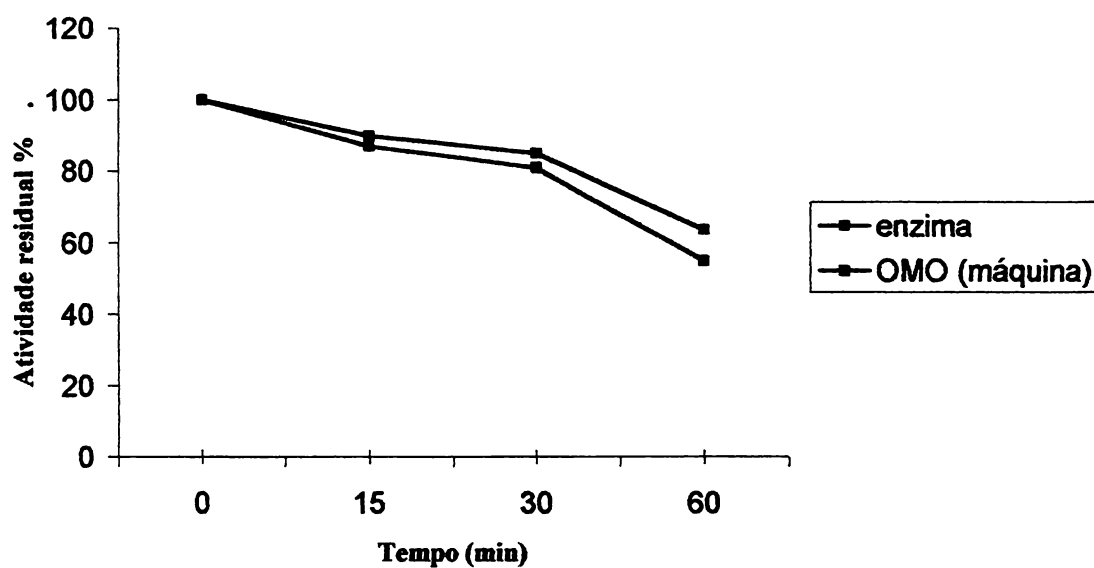


Figura 30. Compatibilidade da ação da protease de *Penicillium* sp em relação a do detergente comercial (OMO máquina®).

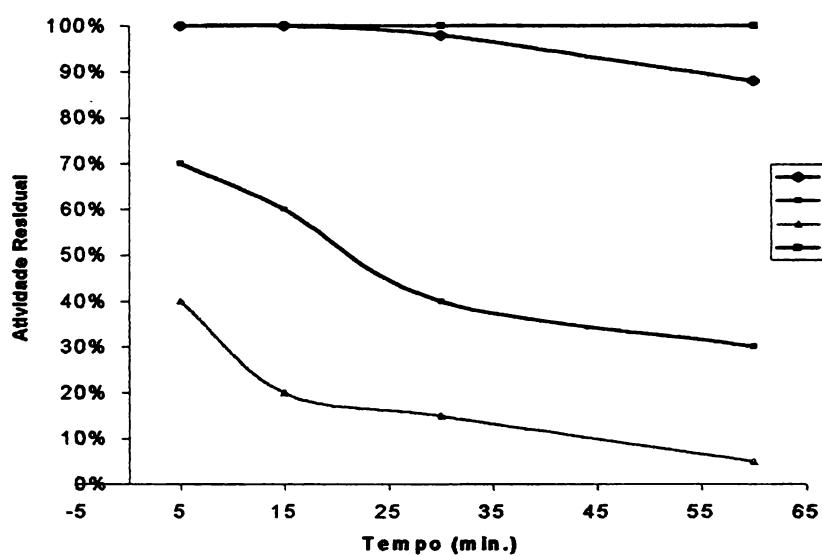


Figura 31. Curva do efeito do agente oxidante (peróxido de hidrogênio) na atividade da protease de *Penicillium* sp.

Tabela 13 . Efeito de surfactantes na atividade enzimática da protease de *Penicillium* sp.

Agente surfactante	Atividade Residual (%)		
	10 min	30min	60 min
Tween 20 (v/v)	104	100	89
Tween 80 (v/v)	100	98	78

5.17 Estudos preliminares de purificação da protease produzida por FES

Os extratos enzimáticos obtidos após 48 horas de fermentação foram analisados com vistas aos estudos prévios de purificação. A metodologia experimental foi realizada como no item 4.13.

5.17.1 Fracionamento com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto obtido, apresentou uma coloração escura, isto pode Ter sido devido à presença de substâncias fenólicas presentes no substrato utilizado (farelo de soja) ou às reações químicas ocorridas entre os constituintes presentes no farelo de soja, durante o processo de esterilização. Segundo DATTA (1991), compostos coloridos podem interferir na análise e rendimento nos experimentos de purificação. Em experimento de purificação da protease obtida de *Phanaerochaete cryosporium* por FES, utilizando como substrato polpa de madeira, verificou-se que estes interferentes poderiam ser retirados através de um sistema de ultrafiltração.

O tratamento acima, evita danos às colunas cromatográficas utilizadas no processo de purificação, uma vez que tais substâncias podem ficar agregadas às mesmas.

Em nosso estudo optou-se por purificar previamente o extrato bruto com sulfato de amônio, com fracionamento em pequenos cortes (“short cuts”) de 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 % . O fracionamento foi realizado por adição de maiores percentuais (“wide cuts”), de 50, 60, 70, 80 e 100 % de saturação do sal. Não se conseguiu um bom rendimento em atividade, possivelmente pela presença de interferentes no meio bem como a provável desnaturação da enzima durante o processo. O farelo de soja contém uma porcentagem em proteínas solúveis em Na Cl a 1% , de 5,48 mg/mL (Tabela 14) e estas podem estar presentes ainda no meio extraído com a enzima , desta forma, no extrato bruto têm-se a presença das enzima, proteína da soja além de outros contaminantes.

A melhor solução para minimizar tal problema foi a precipitação direta com sulfato de amônio a 80 %. Neste caso, verificou-se que o “pellet” obtido apresentava baixa atividade enzimática bem como atividade específica (Atividade enzimática / mg de proteína). O sobrenadante por sua vez apresentou uma excelente atividade e então foi levado à precipitação

com 100 % de sulfato de amônio (saturação). O material obtido foi centrifugado e resuspenso em solução tampão fosfato pH 7,0 (0,05 M).

Neste experimento não se levou em consideração o rendimento total, devido as limitações já relacionadas anteriormente.

O material obtido foi congelado, liofilizado e armazenado em geladeira, o qual foi designado de extrato parcialmente purificado, por apresentar maior atividade específica.

Tabela 14. Purificação parcial da protease de *Penicillium* sp. no extrato bruto através do fracionamento com sulfato de amônio.

Fração	Proteína Total (mg)	Ativ. Total (U)	Ativ. Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento %
EB	107	2450	22,89	1	100
EBC	274	0	0	0	0
0-80	63	1310	20,79	0,9	58,87
80-100 (EPP)	28	1550	55,35	2,4	26

EB= Extrato bruto enzimático

EBC= Extrato Bruto controle (sem enzima)

5.17.2 Perfil Protéico em eletroforese do extrato parcialmente purificado

Para verificação do perfil protéico em eletroforese, foi utilizado o extrato parcialmente purificado (EPP) com o sulfato de amônio. As amostras de 20 µg e 30 µg foram diluídas no tampão de análise na concentração final de 20 µL e 30 µL (item 4.16) . A mesma foi aplicada no gel e submetida à análise. Em paralelo procedeu-se à análise do extrato bruto (EB), seguindo o mesmo procedimento técnico e concentração de proteínas utilizadas para a amostra do EPP.

A eletroforese , corada com Coomassie Blue, pode ser visualizada na Figura 32. Podemos verificar que o perfil da eletroforese no EPP apresentou uma série de bandas protéicas sendo que,

algumas bandas presentes no gel, apresentavam-se mais intensas. Na mesma Figura 32 podemos também observar o perfil de eletroforese em EB. Neste caso verificamos um maior número de bandas, bem como a presença de bandas no gel as quais se encontram de forma mais intensa no perfil apresentado pelo EPP.

Podemos concluir que, comparando o EB e o EPP, o processo de fracionamento com sulfato de amônio não eliminou totalmente as proteínas contaminantes, mas selecionou duas porções protéicas em maior intensidade, como pode ser visualizado nas bandas presentes na eletroforese deste estudo. O precipitado obtido apresentava-se com aspecto mais claro, em relação à cor apresentada pelo extrato bruto, mas o processo de fracionamento com sulfato de amônio não eliminou totalmente os compostos coloridos.

5.17.3 Análise da atividade proteolítica em eletroforese

Com a finalidade de verificar a presença de bandas, em eletroforese, com atividade proteolítica, realizou-se a análise eletroforética não desnaturante. Foi utilizada a concentração de 20 e 30 µg de proteínas para ambas as amostras EPP e EB.

A Figura 33 mostra o perfil da hidrólise para ambas as amostras na qual verifica-se a presença de uma banda de hidrólise mais intensa no EPP. Neste caso não foi possível diferenciar bandas diferentes ou uma única banda, dificultando a análise de uma área específicas de hidrólise da gelatina em gel. Ao compararmos esse resultado com a eletroforese do estudo da Figura 32 verifica-se a proximidade de duas bandas mais intensas no EPP, desta forma sugere-se que possa ter ocorrido a hidrólise no gel de gelatina por estas bandas protéicas, as quais poderiam, possivelmente possuírem atividade proteolítica (Figura 33) e que devido a proximidade entre as mesmas, ocorreu a formação de um único halo de hidrólise. Quanto ao EB, verificou-se uma baixa atividade proteolítica, apresentando, desta forma, um perfil eletroforético para atividade com menor intensidade.

Podemos então sugerir que as bandas encontradas na Figura 32, as quais são mais intensas no EPP, possam ser responsáveis pela atividade proteolítica, e que não se trata apenas de uma única protease isolada neste estudo.

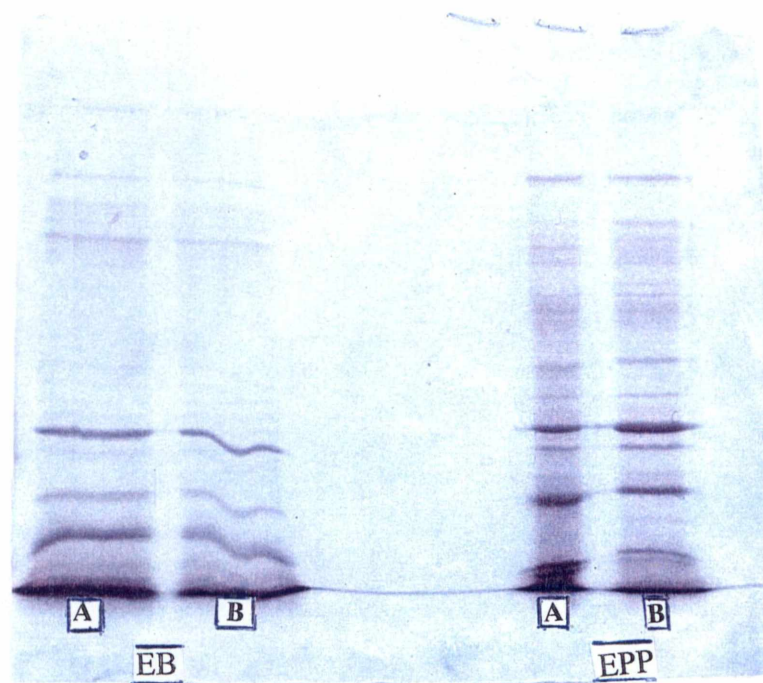


Figura 32. Eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato bruto (EB) e extrato parcialmente purificado (EPP). Coloração Coomassie Blue. A (20 μ g) e B (30 μ g).

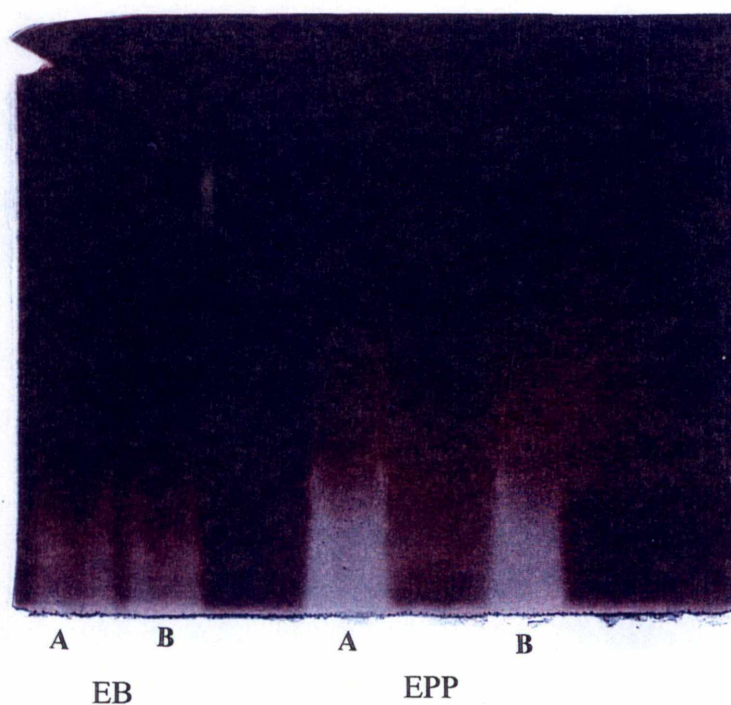


Figura 33 . Eletroforese de atividade proteolítica em gel contendo gelatina do Extrato Bruto (EB) e Extrato Parcialmente Purificado (EPP) sendo A (20 μ g) e B (30 μ g)

5.17.4 Cromatografia em DEAE-Sepharose.

O extrato bruto parcialmente purificado, obtido pelo fracionamento com sulfato de amônio, foi submetido à cromatografia em DEAE-Sepharose.

A finalidade deste experimento foi separar as proteínas contaminantes bem como diminuir a coloração ainda presente no extrato parcialmente purificado (EPP). Os resultados obtidos estão representados na Figura 34.

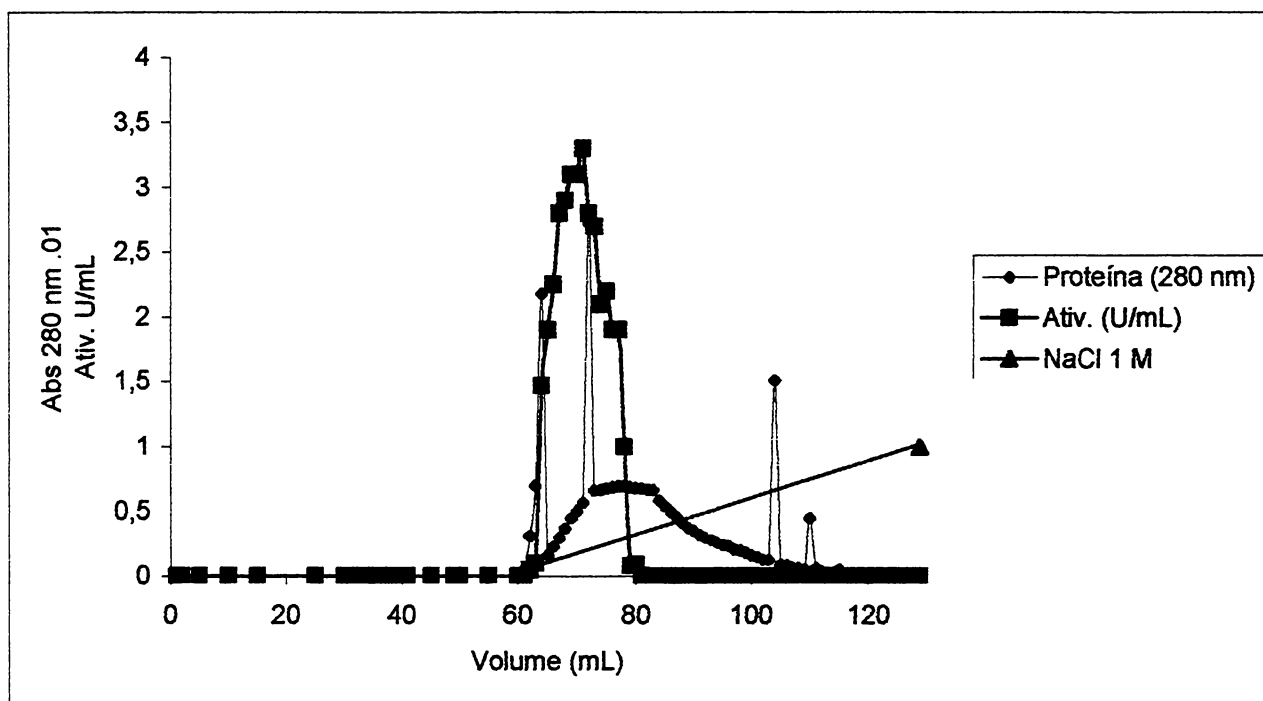


Figura 34 Perfil de eluição do extrato parcialmente purificado (EPP) em cromatografia de troca iônica (DEAE-sepharose). Eluição de proteínas acompanhadas a 280 nm.

Analisando a Figura 34, percebe-se que obteve-se uma região de atividade proteolítica, praticamente com o início do gradiente de NaCl. A eluição destes picos de atividade, ocorreu no início do gradiente de NaCl, indicado no gráfico pela seta, valores muito próximos em torno 0,3 M de NaCl como força iônica para as respectivas eluições.

Pode-se observar que os picos de atividade enzimática ocorreram em numa região onde houve absorção a 280 nm, bem como outros picos que eluíram separadamente e que absorveram no mesmo comprimento de onda, o comprimento de onda a 280 nm, foi monitorado em relação à presença de proteína. Foram escolhidas 6 amostras eluídas da coluna, sendo que estas apresentaram atividade enzimática, no volume compreendido entre 67 a 72 mL, designadas pelas letras A-F, as quais foram submetidas ao ensaio de eletroforese em SDS.

Na Figura 35, observa-se um perfil de eletroforese, corada com nitrato de prata, idêntico as amostras eluídas com maior atividade, mostrando, no gel, a presença de duas bandas, não sendo possível a visualização de outras, talvez devido a diluição da amostra.

O perfil eletroforético representado pela Figura 35, apresenta duas bandas protéicas com massas moleculares diferentes quando comparadas a um padrão de massas moleculares, sendo a primeira banda compreendida entre um valor superior a 14,4 kDa e inferior a 20 kDa, a segunda banda esta compreendida entre 30 e 43 kDa.

Como o perfil eletroforético foi o mesmo para ambas as amostra eluídas, 4 frações foram unidas e 2 mantiveram-se separadas como controle. Todas as amostras foram submetidas a eletroforese de atividade em gel não desnaturante contendo gelatina.

O perfil da eletroforese de atividade pode ser visualizado na Figura 36, onde observa-se uma extensa área de hidrólise nas amostras analisadas, e neste caso a hipótese feita no item 5.17.3, poderia ter fundamento ou seja, de que as duas bandas protéicas exerceriam a atividade de hidrólise em gel e que desta forma apresentariam um perfil de hidrólise em gelatina com maior intensidade, formando um halo mais intenso e que não foi possível diferenciá-las devido a proximidade das mesmas.

Retornando à análise do perfil de eluição em DEAE-Sepharose, quanto à presença de dois picos de atividade da protease, verifica-se que foram eluídas praticamente com a mesma força iônica, como já citado. Desta forma sugere-se pelos resultados obtidos, a presença de enzimas

fracamente acídicas. Para avaliar melhor estes resultados, foi realizado a determinação do ponto isoelétrico, utilizando um gel preparado (PhastGel –IEF-3-9, Pharmacia®) contendo padrões internos de pH 3, 7 e 9. Verifica-se na Figura 37, que as amostras aplicadas apresentam uma única banda no gel de isoeletrofocalização, mostrando um valor aproximando de 6,8. O valor apresentado sugere a presença de proteases fracamente acídicas. O ponto isoelétrico das serina proteases, variam e podem estar, geralmente compreendidas entre pH 4 e 6 (RAO *et al.*, 1998).

Estudos realizados por IMPOOLSULP, *et al.* (1981) citado por MITRA, *et al.* (1996) verificaram o isolamento de duas diferentes proteases extracelular de *Aspergillus flavus*, em FES, utilizando como substrato Koji-soja. A produção de duas enzimas proteolíticas, uma neutra e outra alcalina, por *Ustilago maydis*, foi verificado por HELLMICH, *et al.* (1988).

Nesta etapa do trabalho verificou-se que o processo realizado na tentativa de eliminar alguns contaminantes no extrato bruto de *Penicillium sp.*, permitiram o conhecimento de alguns dados do complexo proteolítico como por exemplo a massa molecular das bandas presentes no ensaio de eletroforese bem como a hipótese no isolamento de enzimas proteolíticas extracelulares com pontos isoelétricos idênticos.

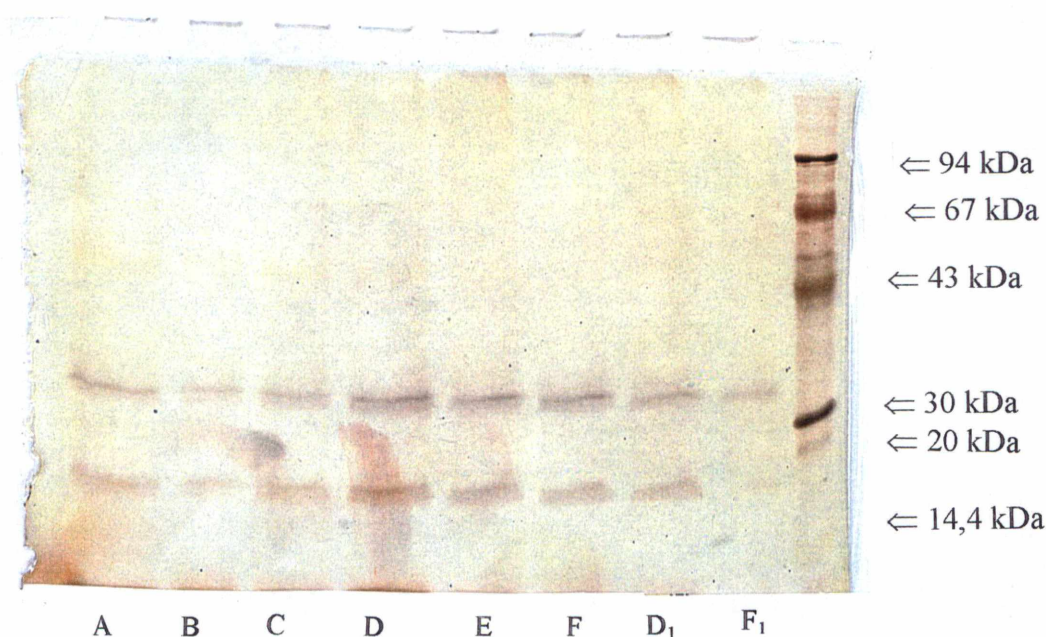


Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida, das frações com atividade proteolíticas (A-F) no volume de eluição de 67-72 mL obtidas através da cromatografia em DEAE-Sepharose. Coloração de nitrato de prata. A-F= 30 µL; D₁ e F₁ = amostras D e F (20 µL) e P= padrão de massa molecular:

Fosforilase b= 94 kDa

BSA= 67 kDa

Ovoalbumina=43 kDa

Anidrase carbônica= 30 kDa

Tripsina= 20 kDa

Lactoalbumina= 14,4 kDa.

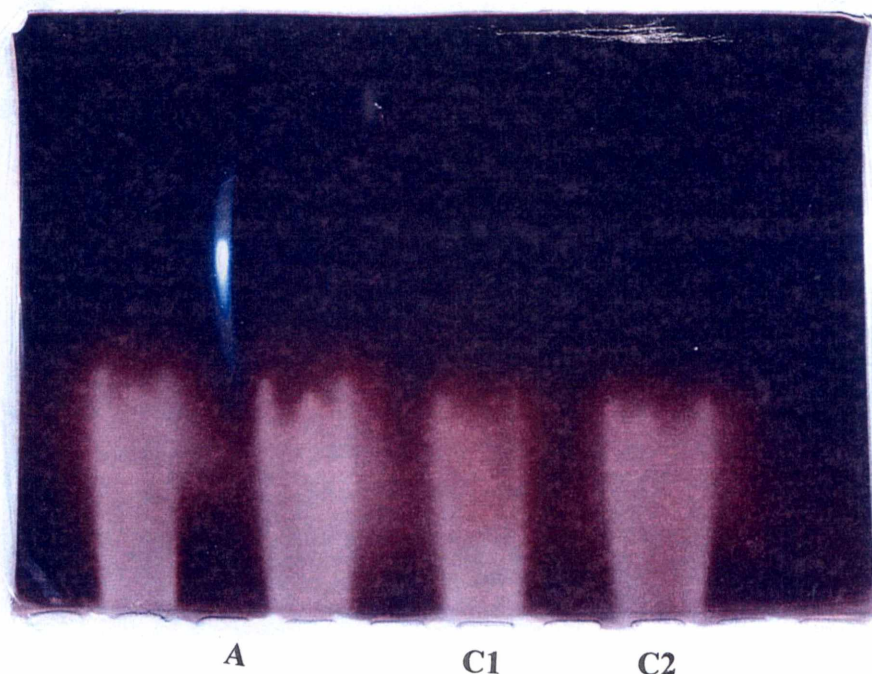


Figura 36. Eletroforese de atividade proteolítica em gel contendo gelatina, das frações com maior atividade. (A) amostras unidas, (C1) e (C2) controle 1 e 2 – amostras isoladas.

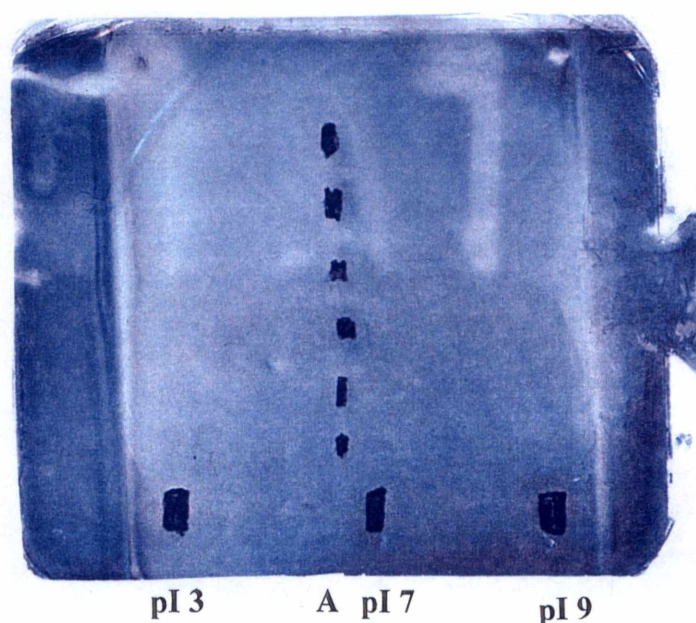


Figura 37. Isoeletrofocalização das frações com maior atividade proteolítica obtidas em cromatografia em DEAE-Sephrose. Padrões com pI 3, 7 e 9. (A) amostra

5.17.5 Cromatografia de exclusão molecular em FPLC.

A cromatografia de exclusão molecular foi utilizada com a finalidade de verificar o peso molecular da enzima, comparando com os resultados obtidos em eletroforese. O experimento também foi utilizado na tentativa de separar proteínas, as quais apresentaram-se de forma mais intensa no gel corado com nitrato de prata (Figura 35).

As frações eluídas da coluna de troca iônica, foram unidas, liofilizadas, resuspensas em tampão fosfato 50 mM com 150 mM de NaCl, e analisadas em FPLC

O aparelho, anteriormente, havia sido calibrado com proteínas padrões de diferentes massas moleculares. Através do volume de eluição dos respectivos padrões pode-se calcular o K_{av} para cada amostra, desta forma construiu-se uma curva de calibração com os valores de K_{av} para os respectivos pesos moleculares conhecidos e que estão representados na Figura 38.

O resultado do perfil de eluição para a amostra revelou a presença de picos de proteínas (Figura 39), sendo dois picos mais intensos e próximos.

Através do volume de eluição das duas amostras em função do tempo de corrida de análise até o ápice dos respectivos picos, pode-se desta forma calcular o K_{av} para ambas as amostras. O primeiro pico apresentou um valor de K_{av} de 0,36 e sua massa molecular calculada, utilizando a curva de calibração (Figura 38), foi de 38 kDa, para o segundo pico (K_{av} = 0,47) valor de massa molecular foi de 16 kDa, os dados de massa molecular conferem com os resultados estimados em gel de eletroforese (Figura 35).

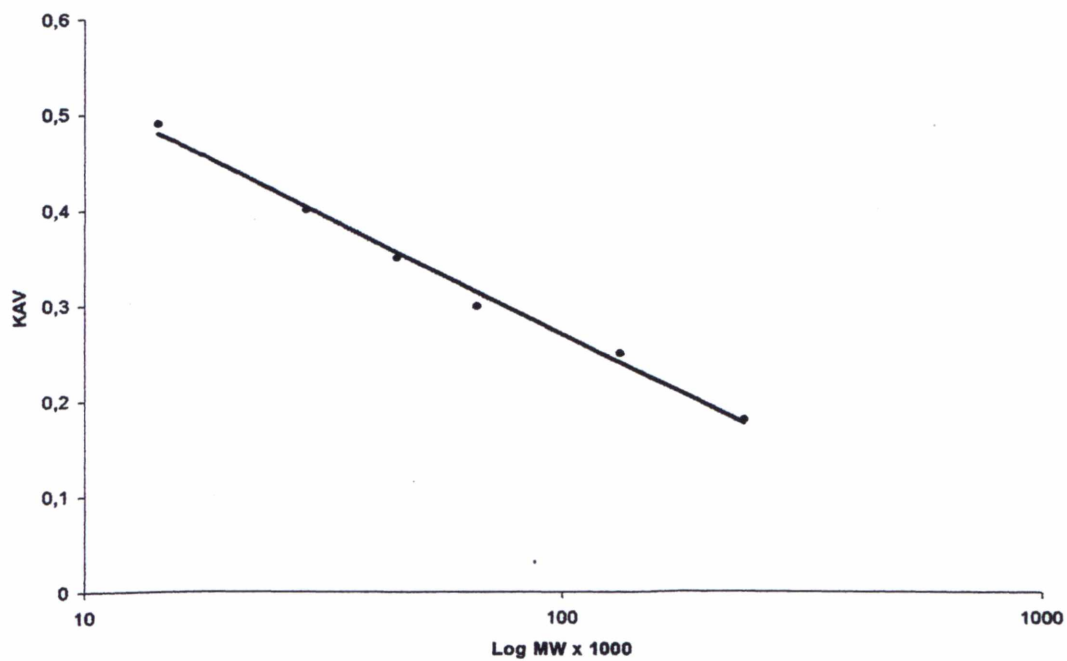


Figura 38. Curva de calibração dos padrões de massa molecular (kda).

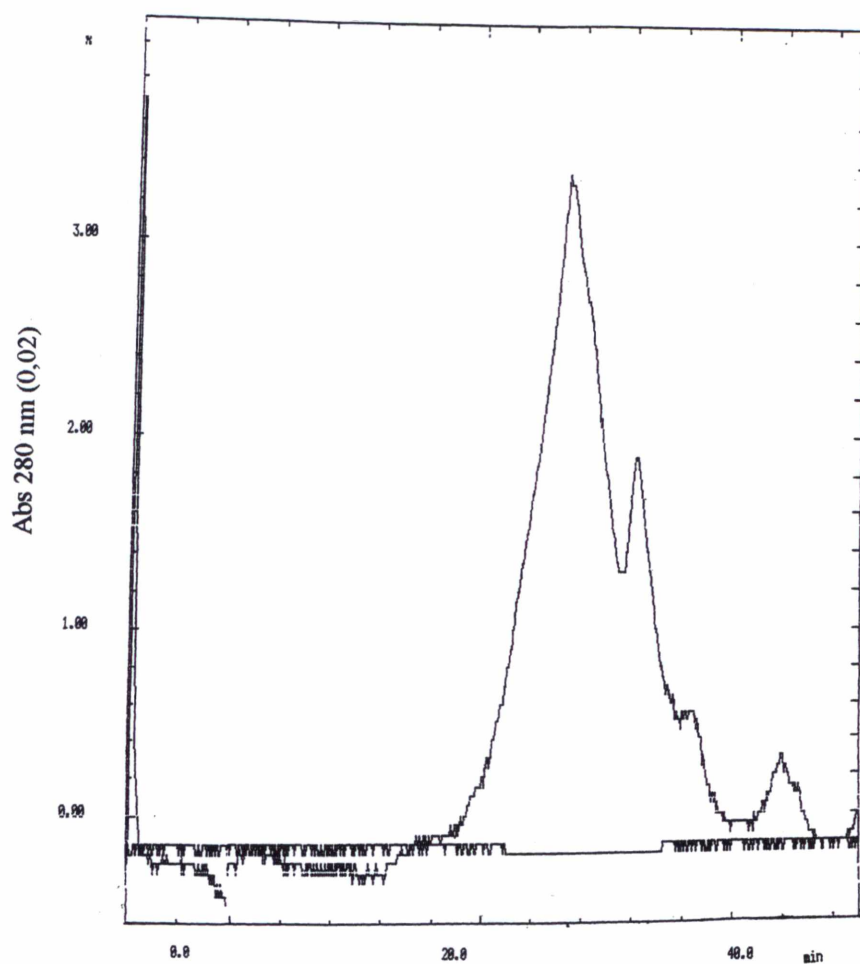


Figura 39. Perfil de eluição das amostras cromatografadas em DEAE-Sepharose, submetidas a cromatografia em gel de exclusão molecular por FPLC.

Os respectivos eluatos foram coletados na tentativa de obtê-los separadamente, o volume de 2 mL foi coletado para ambas as amostras e então submetidos à análise da atividade proteolítica em azocaseína bem como ao ensaio triagem com o inibidor PMSF (inibidor de serina protease). Os resultados podem ser observados na Tabela 15.

Sugere-se pelos resultados apresentados o isolamento de duas proteases com atividades proteolíticas distintas, apresentando diferentes massa moleculares, 16 e 38 Kda. O estudo da triagem com o inibidor PMSF revelaram ser proteases serínicas.

Os resultados de massa molecular encontrados neste estudo, estão de acordo com os obtidos por outros autores (IZOTOVA, *et al.*, 1996; RAO *et al.*, 1998), para serina proteases.

Tabela 15. Determinação do peso molecular das frações obtidas em gel permeação por FPLC de proteases de *Pencillium* sp.

Massa Molecular (kda)	Atividade (U/mL)	Inibição PMSF (3 mM) %
38	2,1	93
16	1,0	91

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para melhorar os conhecimentos sobre a morfologia e fisiologia do fungo *Penicillium sp*, bem como sobre a produção, extração e purificação de proteases obtidas a partir de sub-produtos agroindustriais por fermentação no estado sólido.

Numa primeira fase de nosso estudo, foi possível isolar o fungo *Penicillium sp*, do farelo de soja e identificá-lo pelo método de microcultivo, sendo que o mesmo revelou ser um bom produtor de enzimas proteolíticas extracelulares.

A otimização em frascos Erlenmeyer, para obtenção de enzimas, demonstrou ser possível obter alta produtividade de protease com umidade do substrato de 55 %. A maior atividade proteolítica (43 U/mL) foi obtida após 48 horas de fermentação.

A biomassa foi estimada isolando o biopolímero quitosana do micélio fúngico, com posterior hidrólise para correlacionar os dados do teor de glicosamina presente na FES. O método desenvolvido apresentou bons resultados na determinação indireta da biomassa através da glicosamina.

Através dos estudos de microscopia eletrônica foi possível acompanhar as diferentes fases do crescimento do fungo no farelo de soja.

O processo de otimização da fermentação em bioreator tipo coluna permitiu a obtenção de valores ótimos para a umidade inicial do substrato-suporte (55 %) e a para taxa de aeração (65 mL/min/coluna).

Nos estudos de respirometria foi possível determinar os parâmetros cinéticos da fermentação em condições otimizadas. A maior velocidade específica de crescimento ($\mu = 0.173 \text{ h}^{-1}$) ocorreu nas primeiras 24 horas de fermentação. O Coeficiente de rendimento máximo ($Y_{x/o}$) entre a biomassa produzida e o oxigênio ocorreu entre 24 e 50 horas. A taxa de manutenção mais elevada (m) ocorreu entre 50-70 horas. O coeficiente respirométrico $QR = 0,5$ é aceitável para o intervalo de tempo de 10-35 h, o que caracteriza um sistema aeróbio. Após 40 h ocorreu um aumento do QR para 0,8 e mantendo este valor até 50 horas de fermentação. Após este tempo observa-se um aumento expressivo do QR em razão do início do processo de esporulação.

A produção máxima de enzimas ocorreu após 48 horas de fermentação, sendo que nessas condições a concentração de biomassa era da ordem de 2,18 g/100g de substrato seco. Os resultados experimentais foram muito próximos do valor teórico da biomassa estimada (1,96 g/100g SS) pelo programa FERSOL.

A produção de enzimas, utilizando os parâmetros otimizados para aeração do bioreator foram superiores aos encontrados na fermentação em frascos de Erlenmeyers.

A atividade proteolítica extracelular apresentou um pH ótimo de 6,5, mostrando ter uma afinidade por meios neutros. A temperatura de 45 °C foi considerada para sua atividade enzimática.

A protease apresentou boa termoestabilidade a temperaturas de 35 °C, retendo cerca de 80% de sua atividade após 60 minutos, sendo que à temperatura de 45 °C apresentou 60 % de retenção de sua atividade enzimática, no mesmo tempo de análise.

No estudo de estabilidade ao pH, a enzima manteve-se estável em uma ampla faixa de pH, apresentando melhor estabilidade em pHs neutros e alcalinos.

A protease hidrolisou os substratos azocaseína e azoalbumina, obtendo uma melhor especificidade com o substrato azocaseína.

Os íons metálicos interferiram na atividade proteolítica, tendo reduzida sua atividade com os íons Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} ; e aumentado sua atividade com os íons Na^{+} e Ca^{+2} .

A protease apresentou um valor de K_m (aparente) de $2,8 \pm 0,39$ mg/mL.

Nos estudos de compatibilidade com detergentes observamos uma maior compatibilidade com o detergente em pó OMO Multi-Ação[®], sendo que a enzima manteve cerca de 90% de sua atividade após 30 minutos de contato em solução, enquanto no OMO-Máquina[®] reteve 80% de sua atividade no mesmo período de tempo.

A estabilidade frente a agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio, foi de 80% e 40 %, durante um período de incubação de 60 minutos em concentrações de 5% e 10 % de peróxido. No estudo frente aos agentes surfactantes (Tween 20 e 80), a enzima apresentou-se estável nos primeiros minutos de incubação, diminuindo essa estabilidade com o passar do tempo.

A protease apresentou características de serina protease, pela inibição com PMSF inibindo a atividade em 93%.

A precipitação com sulfato de amônio não eliminou totalmente as proteínas contaminantes, mas selecionou uma fração (extrato parcialmente purificado) com atividade proteolítica.

O gel de atividade em gelatina revelou ser maior para o extrato parcialmente purificado em comparação com o extrato bruto enzimático.

O estudos preliminares de purificação realizados permitiram sugerir a presença de duas proteases com ponto isoeletrico semelhantes e próximo da neutralidade (pH 6,8).

O gel de eletroforese e o estudo de cromatografia por exclusão molecular revelaram a massa molecular para as proteases como sendo de 16 e 38 kDa.

Os estudos de triagem de inibição com PMSF, sugerem que as proteases isoladas por exclusão molecular possam ser serinas proteases.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos são bastante originais e encorajadores, pois abrem novas perspectivas para a valorização de sub-produtos agroindustriais na produção de metabólitos de interesse comercial. Acreditamos também que estudos complementares relacionados com a purificação da enzima bruta deverão ser realizados. Lembramos que a técnica de ultrafiltração na tentativa de eliminar compostos coloridos além de outras técnicas de purificação poderão ser avaliados com o intuito de melhorar o rendimento de extração, bem como a comprovação dos resultados sugeridos neste trabalho e nos estudos preliminares de purificação.

Para a aplicação da enzima produzida, seria recomendável aprofundar os experimentos relacionados com a formulação e compatibilidade da enzima purificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÇÃO das enzimas. Novo Nordesk [s.l.], set. 1995.

ABIOVE- [http:// www. abiove.com.br](http://www.abiove.com.br)

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid substrate fermentations Advances in applied microbiology. v. 28, p.201-237. 1982.

ANDREWS, P. Estimation of molecular size and molecular weight of biological compounds by gel-filtration. Methods Biochem. Anal., v.18, p. 1-53, 1970.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. Bioresource Technology, n. 64, p. 175-183. 1998.

ARGOS, P. A sensitive procedure to compare amino acid sequences. Journal Molecular Biological. n. 193, v. 2, p. 385-396. 1987

ARIMA, K.; UOZUMI, T. A new method for estimation of the mycelial weight in koji. Agr. Biol Chem. v.31, n.1, p.119-123, 1967.

BALCH, J. F.; BALCH, P. A. Receitas para a cura através de nutrientes. 3.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1995.

BARRET, F. F. Enzyme uses in the melling and backing industries. In: REED G. Enzymes in food processing. New York: Academic. Press. Inc..., 1975, p.301-330.

BATTAGLINO, R. A.; HUERGO, M.; PILOSO, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl microbial and biotechnol. v.35, p.292-296, 1991.

BEYNON, R. J. and BOND, J. S. Proteolytic enzymes: a practical approach. Press Oxford University Press. 1989.

BHOSALE, S. H. RAO, M. B., DESHPANDE, V. V. and SRINIVASAN, M. C. Thermostability of high activity alkaline protease from *Conidobolus coranatus* (NCL 86.8.20). Enzyme Microbiology Technologia, v. 17 p.136-139, 1995.

BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Exp. Mycol. Orlando, v. 12, p. 161-168, 1988.

BIODCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. Washington, n.7, v.53, p.1679-1684, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-254, 1976.

BROW, C. M.; CAMPBELL, I.; PRIEST, F. G. *Introducción a la biotecnología*. Zaragoza: Acribia, 1989.

BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Biotecnología básica*. Zaragoza: Acribia, 1991.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. *Proc. Biochem.* p.152-157, 1980.

CARMONA, A.K.; et al. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem. J.*, London, v. 309, p. 209-314, 1995.

CARRIZALES, V. Producción de enzimas extracelulares en cultivo en medio sólido, In: Huitron, C. *Biotecnología de enzimas*. México: U.A.M. p. 71-85, 1986.

CARRIZALES, V.; JAFFE, W. Solid state fermentation: An appropriate biotechnology for developing countries. *Interciência* v.11, p.1-5, 1986.

COIMBRA, J. R., TOMES, J. and KULA, M. R. Purification and some properties of an extracellular protease (Cardolysin) from an extreme thermophile. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 705, p. 293-305, 1994.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 113, p. 189-196, 1993.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. v.1, 5.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994.

COWAN, D, SMOLENSKI, K. A. DANIEL, R. M. and MORGAN, h. w. An extreme a strain of the *Archaeobacterium desulfurococcus* growing at 88 degrees C. *Journal of Biochemistry*. n. 1 247, v. 1, p. 121-133. 1987

CRUEGER, W. and CRUEGER. A. *Biotecnología manual de microbiología industrial*. Zaragoza: Acribia, 1989.

DATTA, A ., Purification and characterization of a novel protease from solid substrate cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.267, n.2, p.728-732,1992.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M. and DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V.35, p.200-205, 1991.

DE VICENTE, J.I.; DE ARRIAGA, D.; DEL VALLE, P.; SOLER, J. Purification and characterization of an extracellular aspartate protease from *Phycomyces blakesleeanus*. Fungal Gen. Biol., Orlando, v. 20, p. 115-124, 1996.

Di SANTO, M.E.; LI, Q.; LOGAN, D. A. Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidases from *Mucor racemosus*. J. Bacteriol., Washington, v.174, n.2, p.447455,1992.

EL-RAHEEM, A., EL-SHANSHOURY, R., EL-SAYED, SAMMOUR, R.H. and EL-SHOUNY. Purification and partial characterization of two extracellular alkaline proteases from *Streptomyces corchorusii* ST36. Canadian Journal Microbiology. v. 41, p. 99-104, 1995.

FARLEY, P. C., IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxil proteinase. J. Gen. Microbiol. Reading, v.138, p.2539-2544,1992

FASTREZ, J. and FERSHT, A. R. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. Biochemistry. v. 12, p. 2025-2034. 1973.

FISCHER, E. P.; THOMSON, K.S. Serine proteínase and their inhibitor in *Phycomyces blakesleeanus*. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 50-56, 1979.

FOX, J. W., SHANNON, D. and BJARNASON, J. B. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. Enzymes in biomass conversion. ACS Symp. Ser. v. 460, p. 62-79,1991.

GACESA, P. and HUBBLE, J. Tecnología de las enzimas. Zaragoza: Acribia, 1990.

GERMANO, S., LIMA, V.M.G., SOCCOL,C.R., PONTAROLO,R., FONTANA,J.D. and KRIEGER,N. Advances in Biotechnology: Proteases production by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation. New Delhi: EPD, v.1, p.59-66, 1998.

GERVAIS, P.; MOLIN, P.; GRAJEK, W.; BENSOUSSAN, M. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnol. Bioeng. v.31, p.457-463, 1988.

GHILDYAL, N. P.; LONSANE, B.K.; SCREEKANTIAH, K.R. and MURTHY, V.S. Economics of submerged and solid state fermentations for the production of amyloglucosidase. J. Food Sci. Technol. v.22, p.171-176, 1985.

GIMENEZ, M. I.; STUDDERT, C. A.; SANCHEZ, J. J.; DE CASTRO, R. E. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. Extremophiles, v. 4, n. 3, p. 181-188, Jun. 2000.

GODFREY, T., WEST, S. Industrial enzymology 2 ed., p. 3 Macmillan Publishers Inc., New York, N. Y. 1996.

GRAJEK, W.; GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viridate* Ts in solid state fermentation. Enzyme microb technol. v.9, p.657-662, 1987.

GREEN, A.A . & HUGHENS, W.L. Protein fraction on the basis of solubility in aqueous solutions of salt and organic solvents. In: COLOWICK, S., KAPLAN, N. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, v.1, p. 67-90, 1955.

GRIPON, J.C.; AUBERGER, B.; LENOIR, J. Metalloproteases from *Penicillium caseicolum* and *P. roqueforti*: comparison of specificity and chemical characterization. Int. J. Biochem., Exeter, v. 12, p. 451-455, 1980.

GRONINGER, H. S. JR; EKLUND, M.W. Characteristics of a proteinase of a *Trichosporon* species isolated form dungeness crab meat. Appl. Microbiol., Washington, v. 14, n. 1, p. 110-114, 1966.

GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; AURIA, R.; BENET, J. C.; REVAH, S. A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. The chemical engineering journal, v.60, p.189-198, 1995.

GUPTA, R., GUPTA, K., SAXENA, R.K. and KHAN. S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus sp.* Biotechnology Letters, v. 21, p. 135-138. 1999.

HAALAND, P. D. Experimental design in biotechnology. New York: Marcel Dekker Inc., 1989.

HAGERMAN, A. N., BLAU, D. M., McLAURE, A.L. Sensitive methods of screening of protease and pectinase. Analytical Biochemistry, v. 151, 334-342, 1985.

HARTLEY. B. S. Proteolytic enzymes. Annu. Ver. Biochemistry .v. 29, p.45-72. 1960.

HASSE, G. O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades. Porto Alegre: L & PM, 1996.

HASNAIN, S.; ADELI, K.; STORER, A. Purification and characterization of an extracellular thiol containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus*. Biochem. Cell Biol. Ottawa, v. 70, p. 117-122, 1992.

HELLMICH,S., SCHAUL,K. Production of Extracelular Alkaline and Neutral Proteases of *Ustilago maydis*. Experimental Mycology, v.12, p.223-232, 1988.

HERRMANN, G., SCHWARZ,A ., WANDREY, C., KULA, M.-R., KNAUO,G., DRAUZ,K.H. and BERNDT, H. Scale -Up of Enzymatic Peptide Synthesis in an Enzyme Membrane Reactor. Biotechnol. Appl. Biochem, v.13, p. 346-353, 1991.

HESELTIME, C. W. Solid Fermentation - An Overview. International biodeterioration. v.23 p.79-89, 1987.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. Enzyme nomenclature. Orlando: Academy Press. Inc, 1992.

IZOTOVA, L. S., STRONGI, A. Y., CHEKULAWA, L.N., STERKIN, V.E., OSTOSLAVSKAYA, V.L., LYUBLINKAYA, L.A., TIMOKHIMA, E. A. and STEPANOV, V.N. Purifications and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. Journal of Bacteriology, v. 155, p. 826-830. 1983.

KALISZ, H. M. Microbial proteinases. Advantages Biochemistry Engineering Biotechnology, v. 36, p. 1-65. 1988.

KANG, G.; KIM, I.S.; RHO, Y.T. and LEE, K.J. Production dynamics of extracellular proteases accompanying morphological different action. Microbiology, v. 141, p. 3095-3103, 1995.

KHAN, M. T.; ROUFOGALIS, B.D. Understanding the role of proteinases through a ubiquitous enzyme complex, the multicatalytic proteinase (MCP). Biochem. Edu., Oxford, v.22,n.3,p.114-120,1994.

KOMINAMI, E., HOFFSCHULTE, H. and HOLZER, H. Purification and properties of proteinase B from Yeast. Biochimica and Biophysica Acta, v. 661, p. 124-135. 1981.

KRARUP, T.; OLSON, L.W.; HANSEN,H.P.H. Some characteristics of extracellular proteases produced by members of the Chytridiales of the Spizellomycetales (Chytridiomycetes).Can. J. Microbiol., Ottawa, v.40, p.106-112,1994.

KUNDU, A.K.; MANNA, S. Purification and characterization of extracellular proteinase of *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol.,Washington,v.30, n.4, p.507-513,1975.

KUN-HEE OH, SEONG, C.S., LEE,S.W., KWON, O.S.PARK, Y.S. Isolation of a psychrotrophic of its extracellular protease. FEMS Microbiology Letters. v. 174, p. 173-178, 1999.

LACAZ, C. S. *et al.* Micologia médica. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LEE, J.D., *et al.* Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. Infect. Immun.v.63,p.3796-3803,1995.

LEIGHTON, T.J., DOI, R.H., WARREN, R.A. and KELLN,R.A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal Molecular Biology, v.76, p.103-122,1973.

LICHENSTEIN, H. Isolation and characterization of a novel protease from *Streptomyces lividans*.U.S. patent. p.724-721,1993.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. São Paulo: Edgar Blucher, vol 1, 1975.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme microbial technol.* v.7, p.258-265, 1985.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P. Exoenzymes. In: DOELLE, D. A.; ROLZ, C. E. Solid substrate cultivation. H.W. Elsevier Science Publishers, 1992.

LOWTER, W. T. MAJER, and DUHN, B. M. Engineering the substrate specificity of rhizopuspepsin: the role of Asp77 of fungal aspartic proteinases in facilitating the cleavage of oligopeptide substrates with lysine in Pl. *Protein Sci.* v. 4 , p. 689-702,1995.

MACHADO, C.M.M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agorindústria do café. Curitiba, 2000. Dissertação Mestrado em Tecnologia Química - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiol.* p.712-716, Mar. 1991.

MANONMANI, H. K. e JOSEPH R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma citrinum*. *Enzyme Microbial Technology* ,v. 76, p. 103-122, 1973.

MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YU, H.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and imunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect. Immun.*, Washington, v. 62, n. 6, p. 2149-2157, 1994.

MILLER, M., JASKÓLSKI, A.; RAO, M.; LEIS, J.; WLODWER, A. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature.* v. 337,p. 576-579,1989.

MIMS, A. C. Microbiologia médica. São Paulo: Manole, 1995.

MITRA, P.; CHANDRA, A. L. Solid fermentations. New Delhi: A. Pandey, 1994.

MITRA, P.; CHAKRAVERTY, R. and CHANDRA, A.L. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation. *Journal of scientific and Industrial Research*, v.55, p. 439-442, May-June, 1996.

MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B. and SANGLARD, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* sp. *Mol. Microbiol.* v. 13, p. 357-368, 1994.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENDERDY, R. P. Principles of solid-substrate fermentation. In: The filamentous fungi. London, v.4, p.177-144, 1983.

MORAES, R. G. Parasitologia e micologia humana. 3.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988.

MUDGETT, R. E. Solid-State fermentation. In: DEMAIN, A.L. SOLOMON, H.A. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1986.

MURO, T., TOMINAGA, Y. and OKADA, S. Purification and some properties of a protease from *Streptomyces cellulosa*. Agricultural and Biological Chemistry, v. 48, p. 1223-1230. 1984.

NAKADAI, T.; NASUNO, S.; IGUCHI, N. Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. Agric. Biol. Chem., Tokyo, v. 37, n. 12, p. 2695-2701, 1973.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R. and TAGUCHI, H. Control of water content in a Solid State Culture of *Aspergillus oryzae*. J. Fermen. Technol 60 4, p.311-319, 1982.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. Science. v. 224, p.350-357,1996.

NISHIO, N.; TAI, K.; NAGAI, S. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. v.8, p.263-270, 1979.

NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE, N. M. Caracterização da dose mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo., São Paulo, v.35, p.527-533, nov-dez, 1993.

NORMAS analíticas do instituto Adolfo Lutz. Secretaria do Estado de São Paulo, 1985, p.523.

NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic micro organisms. Microbiol. Rev., Washington, v.46, p.308-340,1982.

OAKLEY, B., KIRSCH, O. and MORRIS, N. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide. Anal. Biochem. v 105, 361-363, 1980.

OSAKU, C. A. Atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris*. Curitiba, 1996. Tese (Mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas- Universidade Federal do Paraná.

PANDEY, A. Recent Process Development in Solid-State. Fermentation Process biochemistry , p.109-117, 1992.

PAREDES-LÓPEZ, O.; GWYNETH, I. H. Food biotechnonology review: traditional solid state fermentation of plant raw material-application, nutritional significance, and future prospect. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v.27, n.3, p.159-187, 1988.

PAVLUKOVA, E. B.; BELOZERSKY, M.A; DUNAEVSKY, Y.E. Extracellular Proteolytic Enzymes of Filamentous Fungi. Biochemistry, v.63, n.8, p.899-928,1998.

PEARL, L. H. The catalytic mechanism of aspartic proteinases. FEBS Lett., n. 214, p. 8-12, 1987.

PENALOZA, W.; MOLINA, M. R.; BRENES, R. G.; BRESSANI, R. Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. Appl. Environ. Microbiol. v.49, p.388-393, 1985.

PERLMANN, G. E.; LORAND, L. Proteolytic enzymes. Methods Enzymol. n. 19, p. 732-735. 1990.

PETER, M. A. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan J. M. S. Pure Appl. Chem., p.629-640, 1995.

PHADATARE, S. V., SRINIVASAN M. C., and DESHPANDE, V. V. Evidence for controlled autoproteolysis of alkaline protease: a mechanism for physiological regulation of conidial discharge in *Conidiobolus coronatus*. European Journal Biochemistry. v. 205, p. 679-686. 1992.

PHADATARE, S. V., SRINIVASAN M. C., and DESHPANDE, V. V. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.820): enzyme production and compatibility with commerecial detergents. Enzyme Microbiology Technology, v. 15, p. 16-72. 1993.

POLGAR, L. Common feature of the four types of protease mechanisms. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. v. 371, p. 327-331, 1999.

POLDERMANS, B. Proteolytic enzymes, In W. Gerhartz (ed.), Proteolytic enzymes in industry: production and applications. VCH Publishers. Weinheim, Germany, p. 108-123. 1990.

PRIOR, B.; DU PREEZ, J. C.; REIN, P. W. Enviromental parameters In: DOELLE, D. A.; ROLZ, C. E. Solid substrate cultivation. H.W. Elsevier Science Publishers, 1992.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl Microbiol. Biotechnol. v.9, p.199-209, 1980.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATEE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews, v.62 n.3, p.597-635, 1998.

RAO, M. B. and DESHPANDE, V. V. Protease and their applications in biotechnology. In A. Varna (ed.), *Microbes: for health, wealth and sustainable environment*. Malhotra Publishing House, New Delhi, India. 1995.

RIBEIRO, M. C. *et al.* Microbiologia prática. São Paulo: Atheneu, 1993.

RICHARDS, A. O., GILL, I.S. and VULFSON, E. N. Continuous Enzymatic Production of Oligopeptides: Synthesis of an Enkephalin Pentapeptide in a Multistage Bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.*, vol.15, p. 928-935, 1993.

RODRIGUEZ LEÓN, J.A. A mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation. *Acta Biotechnology*. V. 8, p. 307-310, 1988.

RODRIGUEZ LEÓN, J.A. A, STERTZ, S.C., SOCCOL, C.R. and RAIMBAULT, M. Kinetics of the solid state fermentation of raw Cassava flour by *Rhizopus formosa* 28422. Proceeding of the International Training Course on Solid State Fermentation -FMS 97, Curitiba, outubro 1997.

ROUSSOS, S.; AQUIHUALT, M. A.; BRIZUELA, M. A. OLMOS, A.; RODRIGUEZ, W.; VINIEGRA, G. Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid substrate fermentation. *Micol Neotrop. Apl.* v.2 p.3-17, 1989.

SAMPATH, P., SUBRAMANIAN, C. and CHANDRAKASAN, G. Extracellular proteases from *Streptomyces* spp. G157: purification and characterization. *Biotechnology Applied Biochemistry*. v. 26, p. 85-90, 1997.

SATO, K., YOSHIKAWA, K. Growth and growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid state ethanol fermentation, *Journal Fermented Technology*, n.66, 667-673, 1985.

SAUL, D. J., et al. Sequence of the gene encoding a highly thermostable neutral proteinase from *Bacillus* sp. strain EA1: expression in *Escherichia coli* and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1308, p. 74-80, 1996.

SEKINE, H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus oryzae*: some physicochemical properties and amino acid composition. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, n.8, v.37, p.1945-1952, 1998.

SCRIBAN, R. *Biotechnology*. São Paulo: Manole, 1985.

SHAH, N. K.; RAMAMURTHY, V.; KORTHARI, R. M. Comparative profiles of fungal α -amylase production by submerged and surface fermentation. *Biotechnology letters*. v.13, n.5, p.361-364, 1991.

SHARON, J. R.; SUGRUE, A. and THOMPSON, J. A. Industrial Application of cloned neutral protease gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* v. 24, p. 311-318, 1986.

SILVERSTEIN, R.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1993.

SIDORENKOV, I.N. *et al.* Cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus*- thermostable metalloprotease gene in *Bacillus subtilis*. Mol. Biol. v.29,p.507-511,1995.

SINGH, A.; GHOSH, V.K.; GHOSH, P. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v. 18, p. 177-180, 1994.

SLOMA, A. *et al.* Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol,v.172, p.1024-1029,1990.

SOCOL, C.R. Developpement de Bioprocedes pour la valorisation post-recolte de produits et sous-produits agricoles tropicaux. Provence, 2001. Mémoire en vue de l'Habilitation à Diriger des reserches (HDR) à l'Université de Provence.

SOCOL, C. R.; KRIEGER, N. Brazilian experiments for the valorization of agro-industrial waster by solid state fermentation. Advances in biotechnology. v.8, p.25-40, 1998.

SOCOL, C. R. Aplicaciones agroindustriales de los procesos de fermentaciones em medios solidos. In: Fronteras en biotecnología y bioingeniería. Sociedade Mexicana de Biotecnología y Biengeneria, 1996.

SOCOL, C. R. Aplicações de fermentação no estado sólido na valorização de resíduos agroindústrias. Flash Agricultura, v.4, n.2, p.3-4, 1995.

SOCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Potential of solid state fermentation for production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. App. Microbiol. Biotechmol., v.41, p.286-290, 1994.

TAKEUCHI, M. K., *et al.*. Molecular cloning and sequence analysis of a gene encoding an aspartic proteinase from *Aspergillus oryzae*. Adv. Exp. Med. Bio., v. 362, p. 577-580, 1995.

THOMAS, P. G.; RUSSEL, A. J.; FERSHT, A. R. Tailoring the pH dependence of enzyme catalysis using protein engineering. Nature, n. 28, p. 375-376. 1985.

TSUSHIMA, H.; MINE, H.; KAWAKAMI, Y.; HYODOH, H.; UEKI, A. *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. Microbiology, Reading, v.140, p. 167-171, 1994.

TREVAN, M. D., *et al.* Biotecnología: princípios biológicos. Zaragoza; Acribia, 1990.

TSUCHIYA, K., ARAI, T., SEKI, K. and KIMURA, T. Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium sp.* Agricultural and Biological Chemistry v. 51, p. 2959. 1987.

TSUJIBO, H., MIYAMOTO, K., HASEGAWA, T. and INAMORI, Y. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomycete. *Journal of Applied Bacteriology*, n. 69, v. 4, p. 520-529. 1990.

TSUJITA, Y., ENDO, A. Intracellular localization of two molecular forms of membrane acid protease in *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem., Tokyo*, n. 1, v. 88, p. 113-120, 1980.

TURKIEWICZ, M., GROMEK, E., KALINOWSKA, H. and LIELINSKA, M. Biosynthesis and properties of an extracellular metalloprotease from the Antarctic marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 53-60, 1999.

USHA, R.; SINGH, M. Protease of germinating winged-bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds: purification and characterization of an acidic protease. *Biochem. J., London*, v. 313, p. 423-429, 1996.

VANDENBERGHE, L.P.S. Développement d'un Bioprocédé pour la production D'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l' Agro-Industrie du Manioc. Compiègne, 2000. These Docteur Génie des Procédés Industriels. Université de Technologie de Compiègne, France.

VANDERSLICE, P., CRAIK, C.S.; NADEL, J.A.; CAUGHEY, G.H. Molecular cloning of dog mast cell tryptase and a related protease: structural evidence of a unique mode of serine protease activation. *Biochemistry*, v. 28, p. 4148-4155, 1989.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza: Acribia, 1995.

WARD, O. P. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza: Acribia, 1991.

WISEMAN, A. Manual de biotecnología de las enzimas. Zaragoza: Acribia, 1991.

YOUNG, T.W.; WASESON, A.; GLOVER, D.J.; QUINCEY, R.V.; BUTLIN, M.J. and KAMEI, E.A. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequences and pH regulated transcription. *Microbiology*, v. 142, p. 2913-2921, 1996.

ZHU, H.; DANCİK, B.P.; HIGGINBOTHAM, K.O. Regulation of extracellular proteinase production in ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Mycologia, Bronx*, v. 86, n. 2, p. 227-234, 1994.