

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS DE CERVEJARIA

*SalahDin Mahmud Hasan¹
Jaqueline Pereira dos Santos²
Denise Aparecida Zempulski¹
Mônica Lady Fiorese¹
Simone Damasceno Gomes³
Sérgio Luiz de Lucena¹*

Resumo: Neste trabalho objetivou-se a otimização da extração de proteases fúngicas e a sua recuperação mediante precipitação com solvente orgânico (etanol). Para a extração foram utilizados planejamentos experimentais visando a otimização do processo por meio da avaliação da temperatura, pH, tempo de incubação e relação sólido:solvente. A atividade proteolítica máxima de 9,00 U/gms foi obtida em pH 11,8 mediante relação sólido:solvente 1:15 por 1h de incubação a 25°C. Os maiores valores de atividade enzimática no extrato final (clarificado) e de recuperação das proteases (92%) por precipitação com etanol foram observados em pH neutro (7,0).

Palavras-chave: extração, proteases fúngicas, fermentação em estado sólido, otimização.

Abstract: *This work aimed to optimize the extraction process of fungal proteases and its recovery by precipitation with an organic solvent (ethanol). For extraction, experimental designs were used for the process optimization where the parameters temperature, pH, incubation time and solid:solvent ratio were evaluated. The maximum protease activity (9.00 U/gdm) was obtained considering pH 11.8, 1:15 of solid:solvent ratio, for 1h of incubation at 25°C. The higher values of enzyme activity at the final (clarified) extract and the proteases recovery (92%) under precipitation with ethanol were observed at neutral pH (7.0).*

Keywords: *extraction, fungal proteases, solid state fermentation, optimization.*

¹ Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Rua da Faculdade, 645. Jardim Santa Maria. Toledo/ PR. CEP 85903-000. E-mail: salahdmh@gmail.com

² Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Rua da Faculdade, 645. Jardim Santa Maria. Toledo/PR. CEP 85903-000.

³ Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Rua Universitária, 2069. Jardim Universitário. Cascavel/PR. CEP 85819-210.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da industrialização de alimentos trouxe ao homem sérios desafios na tentativa de manter o equilíbrio ambiental. Tornou-se necessária a busca de novas tecnologias que minimizassem os impactos ambientais causados pela extração ou produção da matéria-prima, que na maioria das vezes têm efeitos poluidores devido ao volume de rejeitos que essas atividades provocam.

As pesquisas no ramo da biotecnologia têm sido de grande importância para o controle da poluição ambiental, objetivando aproveitar os resíduos industriais como substratos para o desenvolvimento de micro-organismos produtores dos mais diversos metabólitos ou produtos de interesse ecológico ou comercial, dentre eles as enzimas. Como exemplo dessas pesquisas pode-se citar a utilização dos resíduos da indústria cervejeira, como o “trub” (resíduo obtido na etapa de separação das proteínas precipitadas no “*whirlpool*” após a mostura) e o bagaço da cevada, os quais, devido às suas características físico-químicas e bioquímicas, podem ser usados como substratos sólidos para a fermentação com fungos, com a consequente produção de enzimas de alto valor agregado como as proteases. Normalmente, o bagaço da cevada é aproveitado como ingrediente na ração animal, enquanto que o “trub” é descartado.

As proteases, ou enzimas proteolíticas, representam cerca de 60% do mercado industrial de enzimas e possuem um amplo espectro de aplicação como na indústria de detergentes, farmacêutica, de couro, nas indústrias alimentícias e etc. (Thanapimmethaa et al, 2012).

O “trub” apresenta elevada concentração de proteínas e matéria solúvel como carboidratos, vitaminas, sais minerais, etc. e, em função disso, apresenta bom potencial para ser usado como substrato na produção de proteases

fúngicas por fermentação em estado sólido (FES).

O bagaço de cevada tem um teor proteico menor, porém suas características físicas como maior granulometria e elevado teor de fibras fazem com que o mesmo possa ser utilizado (em uma certa porcentagem) como auxiliar ou suporte para o trub, pois permitiria uma melhor aeração do meio fermentativo.

Diferentes linhagens de fungos têm sido selecionadas a partir de seu *habitat* natural com o objetivo de se obter novas proteases, com propriedades específicas. A maioria dos pesquisadores tem buscado alternativas mais eficazes do que a fermentação submersa (SmF) para a produção de enzimas e, neste aspecto, a fermentação em estado sólido (FES) tem apresentado algumas vantagens (Mukherjee et al, 2008).

Os processos de FES são geralmente mais simples e econômicos, e utilizam resíduos agroindustriais, tais como o farelo desengordurado de soja e farelos de trigo e arroz para a produção de enzimas, motivo pelo qual despertam interesse especial nos pesquisadores de países com abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, como o Brasil. As condições operacionais utilizadas na FES favorecem o crescimento de fungos filamentosos os quais na natureza crescem em substratos sólidos como pedaços de madeira, plantas, raízes e outras matérias orgânicas naturais (Mahanta et al, 2008; Zambare et al, 2011).

Portanto, as condições operacionais da FES podem estimular o micro-organismo a produzir enzimas com diferentes propriedades do que aquelas obtidas por SmF (Martins et al, 2011).

Segundo Castilho et al (2000), a eficiência de extração é um fator crítico determinante no balanço econômico da FES para a produção de enzimas. Os autores ressaltam a necessidade de estudos nessa área de modo a tornar a FES uma alternativa viável para a produção de enzimas. Citam a

temperatura e o tipo de solvente como importantes fatores a serem investigados na extração de solutos em sólidos, além do tempo de incubação.

Assim, tendo em vista a alta aplicabilidade das proteases e a quantidade limitada de referências que tratam do aproveitamento de resíduos de cervejaria para esse fim, o objetivo deste trabalho foi o estudo e a otimização do processo de extração de proteases fúngicas, obtidas de fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria (“*trub*” e bagaço de cevada), utilizando planejamentos fatoriais e o estudo da recuperação das proteases dos extratos brutos mediante precipitação com solvente orgânico (etanol).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para a produção e os ensaios de extração de protease foi utilizada amostra de *trub* fermentado seco. A fermentação em estado sólido do *trub* foi realizada utilizando como micro-organismo um fungo isolado do próprio substrato e identificado como *Aspergillus* sp., uma vez que o melhor valor observado de produtividade em termos de obtenção da protease foi para este fungo.

A amostra de *trub* fermentado seco continha, além das proteases, do *trub* e do micélio do fungo, outras substâncias como: bagaço da cevada (usado como auxiliar ou suporte), umidade e nutrientes (K_2HPO_4 , $NaNO_3$, URÉIA, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CuSO_4$) adicionados para o crescimento do fungo. Para a FES foram usados (em base seca) 29g de *trub*, 9g de bagaço e 2g de sais, para uma umidade inicial ajustada em 50%.

O *trub* e o bagaço de cevada foram coletados em uma indústria cervejaria local (Toledo-PR) em quantidade suficiente para a realização de todos os experimentos. Para a correção do pH das soluções no processo de extração foram utilizadas as seguintes

soluções tamponantes: tampão acetato (pH 4,5), tampão fosfato de sódio (pH 6,2; 6,5; 7,0 e 9,0), tampão glicina (pH 9,0) e tampão Ringer (pH 11,8, contendo Na_2HPO_4 e NaOH).

2.2 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

A avaliação das condições de extração foi feita por planejamento estatístico experimental do tipo “Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} ” (Barros Neto et al, 2010). Neste tipo de planejamento fatorial foram avaliados os efeitos de 4 variáveis sobre a resposta (atividade enzimática, AE), utilizando-se 2 níveis (-1 e +1) para cada variável, resultando em 8 ensaios acrescidos de triplicata no ponto central (nível 0) para a estimativa do erro experimental (Montgomery, 1997).

As 4 variáveis estudadas foram: temperatura (T), pH, relação sólido:solvente (R) e tempo de incubação (t), cujos níveis (valores codificados) e valores reais encontram-se na Tabela 1.

O programa computacional Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos a análise de variância (ANOVA). Os efeitos são descritos como a diferença entre a resposta média no nível superior (+1) e a resposta média no nível inferior (-1) de uma determinada variável. Para se determinar a influência de um efeito no sistema, compara-se a magnitude do valor deste efeito ao erro experimental.

A extração das proteases foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL a partir de uma amostra de *trub* fermentado considerando a relação sólido:solvente para realizar a adição da solução tamponante. Depois de adicionada a solução tamponante, a amostra foi colocada em um banho termostatizado com controle de temperatura, onde ficaram incubadas sob agitação.

A relação sólido:solvente, o pH (adição da solução tamponante), a temperatura e o tempo de incubação sob agitação foram utilizados conforme

especificado para cada ensaio no planejamento experimental. Ao final da extração, os extratos brutos foram filtrados em papel de filtro, com posterior centrifugação. As amostras de extrato bruto foram posteriormente armazenadas em tubos de ensaio e conservadas em geladeira.

2.3 RECUPERAÇÃO DAS PROTEASES

As proteases foram recuperadas a partir do extrato bruto usando o método de precipitação com solvente orgânico. No caso, foi adicionado gradualmente, ao extrato bruto centrifugado, etanol p.A. até uma concentração 70%.

A precipitação foi realizada em tubos de ensaio a 0°C, com o auxílio de um banho de gelo, sendo o etanol e o extrato bruto pré-resfriados em geladeira a 4°C. A adição lenta e gradual do etanol foi feita sobre o extrato bruto sob agitação branda e constante, sendo esta operação realizada em 1,5h.

Após a precipitação das proteases, os respectivos precipitados foram separados por centrifugação (5000g, por 30 min) onde, após o descarte do sobrenadante, foram ressolubilizados com o tampão apropriado, para subsequente análise imediata da atividade enzimática. A seguir, as amostras foram seladas e conservadas em geladeira a 4°C.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

A análise de atividade enzimática (AE) foi realizada conforme método adaptado de Germano et al (2003), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como substrato.

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em unidades por grama de matéria seca ou U/gms, onde U foi definido como a quantidade de enzima que produziu uma diferença de absorbância (em relação ao controle) durante 1h de incubação à 45°C para um grama de meio fermentado em base seca.

A umidade das amostras do meio fermentado foi determinada por método

gravimétrico baseado na perda de massa após secagem em estufa, à temperatura de 105°C, por 3h ou mais, até massa constante, medido em balança analítica após resfriamento das amostras em dessecador (AACC, 1983).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEASES

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos de atividade enzimática após a extração das proteases, utilizando-se o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . Os valores reais das variáveis utilizados nos ensaios encontram-se especificados na Tabela 1.

Na Tabela 2 podem ser observados os efeitos de cada variável sobre a resposta (AE), os efeitos das interações entre as variáveis, o erro puro associado a cada efeito, o valor da probabilidade (p) do efeito influenciar a resposta no intervalo de confiança de 95% e o coeficiente para cada variável a ser usada no modelo empírico. O intercepto é o termo independente usado no modelo.

A estatística “ t^2 ” representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado. Deste modo, pode-se afirmar que as variáveis pH e R influenciaram a AE e que o aumento do pH e de R promoveram o aumento na atividade enzimática (efeito positivo). Por outro lado, a interação conjugada dos fatores T e pH e dos fatores T e R promoveram a diminuição na atividade enzimática (efeito negativo).

A equação (1) é um modelo linear empírico, obtido mediante os coeficientes obtidos e pode ser usada para descrever de forma aproximada os resultados de AE em termos dos efeitos significativos do pH e R e das interações T e pH e T e R (com coeficiente de determinação R^2 de 98,1%).

$$AE = 2,784 + 0,936.pH + 0,516.R - 0,556.T.pH - 0,506.T.R \quad (1)$$

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta obtida para o processo considerando a AE como resposta, de acordo com a equação (1). Para avaliar se a equação (1) ajusta de forma satisfatória os resultados de AE com os valores codificados das variáveis, foi feita a análise de variância (ANOVA) do modelo (Tabela 3). Como o valor de $F_{\text{calculado}} = 22,26$ forneceu valor maior que

o $F_{\text{tabelado}} = 8,89$ para o modelo e $F_{\text{calculado}} = 1,16$ forneceu valor menor que o $F_{\text{tabelado}} = 18,51$ para a falta de ajuste, pode-se afirmar que o respectivo modelo matemático, descrito pela equação (1), é válido no intervalo de confiança de 95%, podendo ser usado para avaliar o resultado de AE em termos de pH, R, interação T e pH e T e R.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com as variáveis codificadas e reais e os resultados obtidos de atividade enzimática (AE).

Ensaio	T (°C)	pH	R	t	AE (U/gms)
1	-1 (25)	-1 (4,5)	-1 (1:5)	-1 (1)	0,84
2	1 (55)	-1 (4,5)	-1 (1:5)	1 (3)	2,36
3	-1 (25)	1 (9,0)	-1 (1:5)	1 (3)	2,56
4	1 (55)	1 (9,0)	-1 (1:5)	-1 (1)	3,07
5	-1 (25)	-1 (4,5)	1 (1:15)	1 (3)	1,62
6	1 (55)	-1 (4,5)	1 (1:15)	-1 (1)	2,33
7	-1 (25)	1 (9,0)	1 (1:15)	-1 (1)	5,87
8	1 (55)	1 (9,0)	1 (1:15)	1 (3)	3,14
9	0 (40)	0 (6,5)	0 (1:10)	0 (2)	3,24
10	0 (40)	0 (6,5)	0 (1:10)	0 (2)	2,63
11	0 (40)	0 (6,5)	0 (1:10)	0 (2)	2,97

Tabela 2: Estimativa dos efeitos sobre AE das proteases, para intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} ($R^2 = 0,9810$).

Variável	Efeito	Erro puro	t^2	p-valor	Coefficiente
T	0,0025	0,21614	0,01157	0,991821	0,001250
pH	1,8725	0,21614	8,66335	0,013063	0,936250
R	1,0325	0,21614	4,77699	0,041137	0,516250
t	-0,6075	0,21614	-2,81067	0,106704	-0,303750
T x pH	-1,1125	0,21614	-5,14712	0,035735	-0,556250
T x R	-1,0125	0,21614	-4,68446	0,042674	-0,506250
T x t	0,6575	0,21614	3,04200	0,093202	0,328750
Intercepto	2,7845	0,09216	30,21341	0,001094	2,784545

Os valores em negrito e itálico evidenciam as variáveis significativas no intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

Como foi observado que o aumento do valor do pH e do R influenciam positivamente a atividade enzimática, resolveu-se realizar novos ensaios com valores maiores de pH e R para avaliar o efeito deste aumento sobre a AE. A Tabela 4 mostra os níveis e os valores reais usados para as variáveis pH e R, para o novo planejamento.

Este novo planejamento, chamado de planejamento composto central consiste de um fatorial completo 2^k com replicatas no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável a uma distância $\pm\alpha$ do ponto central (planejamento estrela), conforme teoria descrita por Khuri & Cornell (1987).

As variáveis estudadas foram o pH e a relação sólido:solvente (R). Assim, o planejamento composto central, descrito na Tabela 5, tem um planejamento completo 2^2 representado pelos ensaios 1 a 4 (com níveis -1 e $+1$) para a estimativa da porção linear do modelo matemático quadrático, uma triplicata no ponto central (com nível 0)

representada pelos ensaios 5 a 7 (para a estimativa do erro experimental) e 4 ensaios para o planejamento estrela representados pelos níveis $\alpha = -1,414$ e $\alpha = +1,414$ para a estimativa da porção não linear do modelo empírico quadrático, de maior abrangência que o linear (Barros Neto et al, 2010).

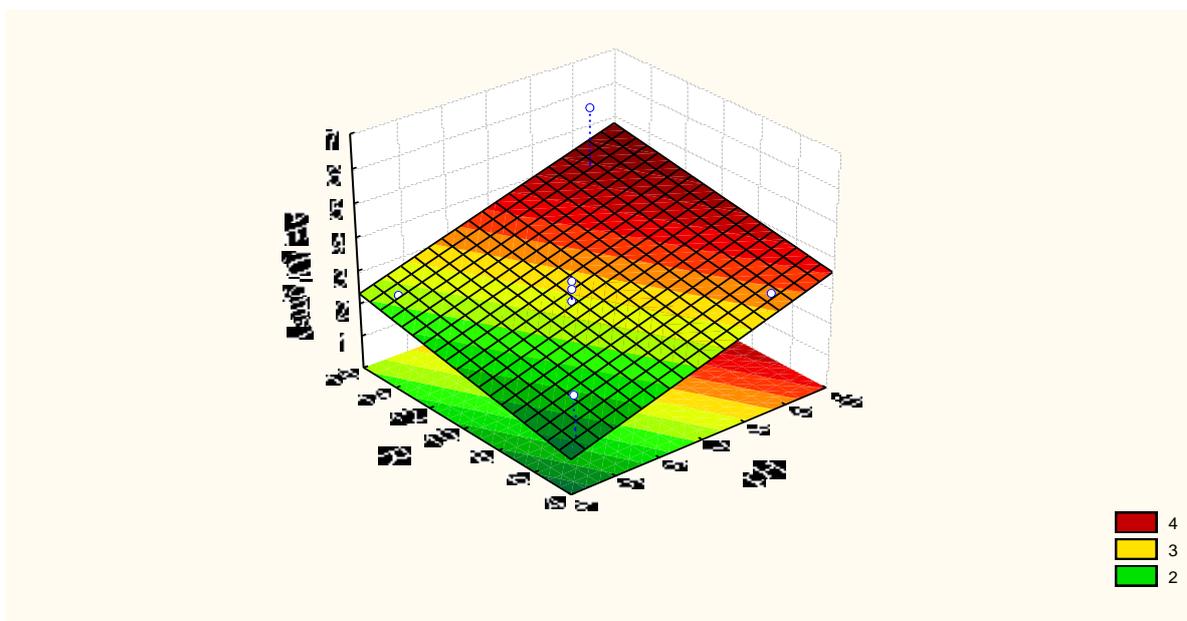


Figura 1: Superfície de resposta para a AE das proteases em função da relação sólido:solvente (R) e do pH, obtida para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Tabela 3: Análise de variância do modelo linear da AE, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Causa de variação	SQ	GL	MQ	F
Modelo	15,273	7	2,182	22,26
Erro Total	0,295	3	0,098	
Falta de Ajuste	0,108	1	0,108	1,16
Erro puro	0,187	2	0,093	
Total	15,568	10		

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = distribuição F; $F_{\text{tab. modelo}}(0,05; 7; 3) = 8,89$; $F_{\text{tab. falta de ajuste}}(0,05; 1; 2) = 18,51$

Como o melhor resultado de AE no planejamento fracionário 2^{4-1} (Tabela 1) foi obtido no ensaio 7 (AE = 5,87 U/gms), que corresponde ao pH no nível $+1$ (9,0), R no nível $+1$ (1:15), T no nível -1 (25°C) e t no nível -1 (1h), considerou-se no novo planejamento o ponto central, nível 0, como sendo pH = 9,0 e R = 1:15 (Tabela 4).

As demais variáveis (T e t), não significativas no planejamento ENGEVISTA, V. 16, n. 2, p.244-254, Junho 2014

fracionário 2^{4-1} , foram mantidas nos mesmos níveis do ensaio 7 do planejamento fracionário 2^{4-1} , ou seja, T=55°C e t = 1h. Observa-se na Tabela 5 que a maioria dos valores de AE foram mais elevados que aqueles obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (Tabela 1), indicando que os níveis das variáveis foram escolhidos corretamente. Os valores obtidos para os efeitos principais e de interação das variáveis pH

e R de ordem linear (L) e quadrática (Q) são apresentados na Tabela 6, para o intervalo de confiança de 95%. Observa-se que, além do intercepto, apenas a variável pH linear foi significativa no intervalo de confiança de 95%, ou seja, o aumento linear do pH influenciou positivamente o resultado de AE.

A Figura 2 apresenta a superfície de resposta obtida para o processo. Observa-se que a AE aumenta com o pH, porém diminui com R, de forma menos pronunciada uma vez que esta variável não se mostrou significativa no intervalo de 95% de confiança. Foi feita a análise

de variância (ANOVA) do modelo (Tabela 7). Como o valor de $F_{\text{calculado}} = 1,47$ resultou menor que o $F_{\text{tabelado}} = 5,05$ para o modelo, pode-se afirmar que o modelo matemático, descrito por uma equação quadrática, não é válido no intervalo de confiança de 95%, não podendo ser usado para avaliar o resultado de AE. Maiores valores de atividade enzimática (ensaios 2 e 10) foram obtidos com o aumento do pH, indicando que a protease em questão é do tipo alcalina, pois é mais ativa na faixa de pH alcalino.

Tabela 4: Especificação dos níveis das variáveis do planejamento composto central

Variável	Níveis				
	- 1,414	-1	0	+1	+ 1,414
pH	6,2	7,0	9,0	11,0	11,8
R	1:10,8	1:12	1:15	1:18	1:19,3

Tabela 5: Matriz do planejamento composto central com as variáveis codificadas e resultados obtidos de atividade enzimática (AE)

Ensaio	pH	R	AE (U/gms)
1	- 1 (7,0)	- 1 (1:12)	7,83
2	+ 1 (11,0)	- 1 (1:12)	8,76
3	- 1 (7,0)	+ 1 (1:18)	4,22
4	+ 1 (11,0)	+ 1 (1:18)	7,04
5	0 (9,0)	0 (1:15)	5,09
6	0 (9,0)	0 (1:15)	6,47
7	0 (9,0)	0 (1:15)	5,09
8	- 1,414 (6,2)	0 (1:15)	3,52
9	0 (9,0)	- 1,414 (1:10,8)	5,35
10	+ 1,414 (11,8)	0 (1:15)	9,00
11	0 (9,0)	+ 1,414 (1:19,3)	8,06

Tabela 6: Estimativa dos efeitos sobre AE, para intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento composto central ($R^2 = 0,886$).

Variável	Efeito	Erro puro	t^2	p-valor	Coefficiente
pH (L)	2,87	0,56	5,10	0,0363	1,43
pH (Q)	0,95	0,67	1,41	0,2922	0,47
R (L)	-0,37	0,56	-0,66	0,5746	-0,19
R (Q)	1,39	0,67	2,08	0,1729	0,69
pHxR	0,94	0,79	1,18	0,3574	0,47
Intercepto	5,55	0,46	12,06	0,0068	5,55

Em trabalho realizado anteriormente para caracterizar a enzima definiu-se que os melhores parâmetros selecionados para a determinação analítica da atividade enzimática da protease (caracterização cinética) obtida por fermentação em estado sólido de *Aspergillus* sp. Em *trub* foram: temperatura de 50°C, concentração de solução de BSA de 0,5% (substrato), tempo de incubação de 20min e utilização do tampão fosfato 0,2M (pH 7,0). Em relação ao pH observou-se que a enzima se mantinha estável numa ampla faixa

(pH 6 a 10). Estes valores da caracterização cinética da enzima estão próximos aos encontrados no estudo da extração, indicando que a enzima é mais ativa em pH alcalino e estável numa faixa mais extensa de pH (6 a 10).

Para efeito de comparação com a literatura, a Tabela 8 apresenta algumas referências onde se pode observar os valores de pH onde as proteases alcalinas são mais ativa e os valores de pH onde as enzimas são mais estáveis.

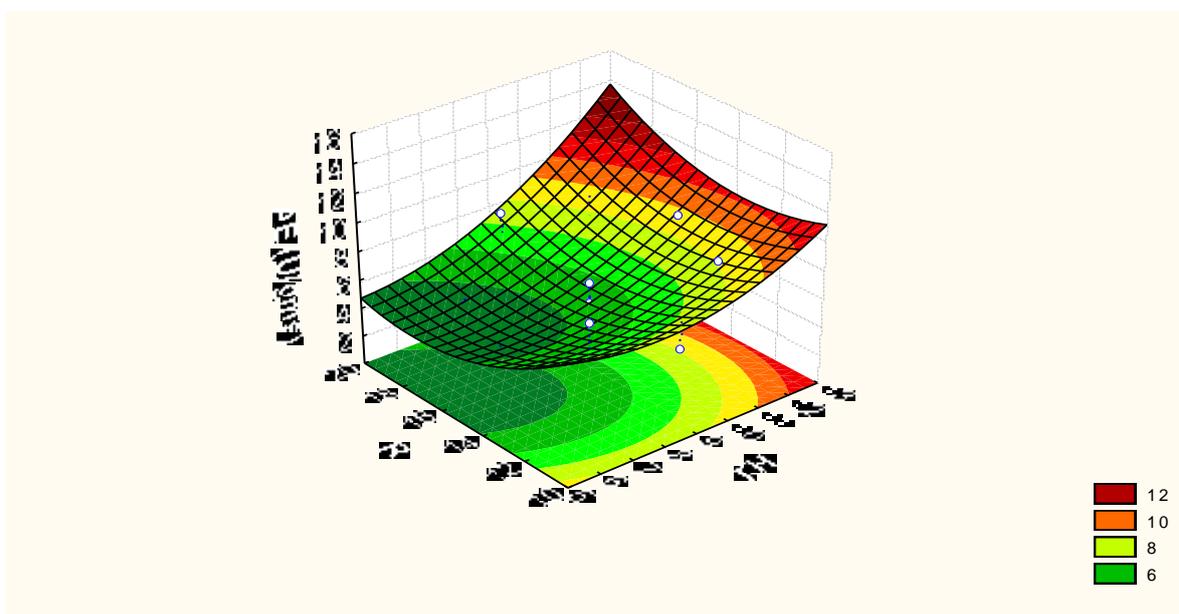


Figura 2: Superfície de resposta para a AE das proteases em função da relação sólido:solvente (R) e do pH, obtida para o planejamento composto central.

Tabela 7: Análise de variância do modelo quadrático da AE, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento composto central

Causa de variação	SQ	GL	MQ	F
Modelo	20,902	5	4,18	1,47
Erro Total	14,224	5	2,84	
Falta de Ajuste	12,955	3	4,32	
Erro puro	1,269	2	0,63	
Total	35,126	10		

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = distribuição F; Para o modelo: $F_{\text{tabelado}}: (0,95; 5; 5) = 5,05$

3.2 RECUPERAÇÃO DAS PROTEASES

Foram utilizadas amostras de extratos brutos com diferentes valores de pH para os ensaios de precipitação das

proteases com solvente orgânico (etanol com concentração final de 70%). A Tabela 9 mostra os resultados de atividade enzimática dos extratos brutos (em diferentes pHs) e dos respectivos extratos clarificados obtidos após a precipitação com etanol. Os valores de AE

dos extratos foram expressos em U/mL. Apesar do extrato bruto com pH 7,0 ter apresentado valor de atividade enzimática (2,5 U/mL) inferior aos dos demais ensaios, observou-se que a recuperação das proteases por precipitação com solvente orgânico (etanol 70%) foi melhor conduzida em pH neutro (7,0) onde, além de se obter maior valor de atividade enzimática no extrato final

(clarificado), observou-se consequentemente um maior valor de recuperação da protease (92,0%). Observa-se o maior valor de AE do extrato clarificado no pH 7,0, com consequente maior eficiência de recuperação neste pH. Assim, a extração pode ser efetuada em meio com tampão pH 7,0 (R = 1:12), com subsequente recuperação por precipitação com etanol.

Tabela 8: Valores de pH encontrados na literatura para as proteases alcalinas obtidas por FES de diferentes micro-organismos em diferentes substratos

Micro-organismo	Substrato usado na FES	pH mais estável	pH mais ativo	Tampão usado na extração	Referência
<i>Penicillium</i> sp.	farelo de trigo	-	9,0	borato (pH 9,0)	Agrawal et al (2003)
<i>Bacillus</i> sp.	farelo de trigo	-	10,0	carbonato (pH 10,0)	Uyar&Baysal (2003)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	água de leite desnatado	8,0 a 11,0	8,0 a 9,0	Tris-HCl (pH 8,0)	Dayanandan et al (2003)
<i>Penicillium</i> sp.	torta de soja desengordurada	6,0 a 9,0	6,5	citrato-fosfato (pH 6,5)	Germano et al (2003)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	farelo de trigo	6,0 a 10,0	8,0	diversos (pH 4,0 a 12,0)	Tunga et al (2003)
<i>Beauveria felina</i>	farelo de trigo	-	7,0	carbonato (pH 10,0)	Agrawal et al (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	casca de batata	8,0 a 9,0	8,0	fosfato (pH 8,0)	Mukherjee et al (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	semente de jatropha	6,0 a 7,5	6,0	fosfato (pH 7,0)	Mahanta et al (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	farelo de soja e triptona	7,0 a 9,0	8,0	tris-HCl (pH 8,0)	Zambare et al (2011)

Tabela 9: Atividade enzimática dos extratos brutos e dos extratos clarificados obtidos após a precipitação com etanol

pH do extrato bruto	AE (U/mL)		% recuperação
	Extrato bruto	Extrato clarificado	
4,2	3,6	2,2	61,1
5,0	3,1	2,2	71,0
7,0	2,5	2,3	92,0
9,0	3,6	1,8	50,0

4. CONCLUSÃO

Para a extração das proteases, os resultados obtidos nos planejamentos experimentais indicaram que a atividade

enzimática (AE) é influenciada positivamente pelo aumento do pH. Foi observado que a recuperação dessas enzimas por precipitação com etanol foi melhor conduzida em pH neutro (7,0)

onde, além de se obter maior valor de atividade enzimática no extrato final (clarificado), observou-se consequentemente um maior valor de recuperação da protease (92,0%).

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

AACC - American Association of Cereal Chemists. 1983. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. St. Paul-Minnesota, 8th ed., v.1-2.

AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE & T.; PATIL, S. 2003. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.*, p.1-6.

AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE & T.; PATIL, S. 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.*, v.40, p.1131-1136.

BARROS Neto, B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. 2010. *Como fazer experimentos - Aplicações na ciência e na indústria*. Porto Alegre: Editora Bookman, 4a.ed., 414p.

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A. & ALVES, T.L.M. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bior. Technol.*, v.71, p.45-50.

DAYANANDAN, A.; KANAGARAJ, J.; SOUNDERRAJ, L.; GOVINDARAJU,

R. & RAJKUMAR, G.S. 2003. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *J. Cleaner Prod.*, v.11, p.533-536.

GERMANO S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N. & SOCCOL, C.R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enz. Microbial Technol.*, n.32, p.246-251.

KHURI, A. & CORNELL, J.A. 1987. *Response surface: designs and analyses*. American Society for Quality Control.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bior. Technol.*, 99, p.1729-1735.

MARTINS, S. A.; SOLANGE, I.; MUSSATTO, A.; MARTÍNEZ-AVILA, G. B.; MONTAÑEZ-SAENZ, J. C.; CRISTÓBAL, N.; AGUILAR, B.; TEIXEIRA, J.A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotech. Adv.*, 29, p.365-373.

MONTGOMERY, D.C. 1997. *Design and analysis of experiments*. IE-Wiley Press, New York.

MUKHERJEE, A.K.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. Journal.*, 39, p.353-361.

THANAPIMMETHAA, A.; LUADSONGKRAMA, A.

TITAPIWATANAKUNC, B.; SRINOPHAKUN, P. 2012. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Ind. Crops Prod.*, 37, p.1-5.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B. & BANERJEE, R. 2003. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem.*, n.38, p.1553-1558.

UYAR, F. & BAYSAL, Z. 2003. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, p.1-6.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotech.*, 28-2, p.173-181.