



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO POTENCIAIS
SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE RENINA MICROBIANA
POR *Mucor miehei* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

GUILHERME GARCIA DA SILVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia
Aplicada)

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil
Abril de 2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO POTENCIAIS
SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE RENINA MICROBIANA
POR *Mucor miehei* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

GUILHERME GARCIA DA SILVEIRA

Orientador: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Co-orientador: Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS SIMÕES PIÃO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita
Filho", Campus de Rio Claro, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Microbiologia Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Abril de 2007

AGRADECIMENTOS

Sem a presença de Deus jamais conseguiria cumprir mais esta etapa

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero pela orientação, compreensão e dedicação nestes 6 anos de convívio, mesmo em momentos em que eu, talvez, não mereceria. Muito obrigado mesmo !

À minha família pelo apoio, tanto moral, quanto financeiro nos momentos difíceis. Sem este apoio um pós graduando dificilmente têm a paciência e ânimo necessário para continuar.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia. Todos vocês auxiliaram-me muito e sem o suporte deste Departamento jamais seria possível a realização deste trabalho.

Aos companheiros de Laboratório (os que ainda estão por aqui e os que já estão trilhando outros caminhos). O convívio com vocês neste tempo foi maior do que aquele com minha família e os outros amigos e isso exige-se um bocado de paciência, harmonia e ajuda. Muito obrigado: Paula Pinke, Mariana, Roberta, Siddhartha, Shurato, Márcia, Fabrício, Maria Paula, Gervásio, Fabiano, Daniel, Juliana (tomara que eu não tenha esquecido alguém!)

Ao DEMAC (Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computação) em nome do Prof. Dr. Antônio Carlos Simões Pião cujo auxílio foi de fundamental importância neste trabalho.

Agradeço a duas pessoas que me apoiaram muito enquanto eu estava em Araraquara: Tio Expedito e Tia Elza. Podem ter certeza de que tudo que vocês fizeram foi muito valorizado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro sem o qual seria impossível concluir este trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
ABSTRACT	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FABRICAÇÃO DO QUEIJO	2
1.2 FONTES E ESCASSEZ DO COALHO TRADICIONAL	5
1.3 FONTES MICROBIANAS DE ENZIMAS COAGULANTES	6
1.4 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO FUNGO <i>MUCOR MIEHEI</i>	9
1.5 TRABALHOS UTILIZANDO O ZIGOMICETO <i>MUCOR MIEHEI</i>	9
1.5.1 Produção de renina microbiana via Fermentação em Estado Sólido	10
1.5.2 Produção de renina microbiana via Fermentação Submersa	11
1.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	12
1.6.1 Substratos para Fermentação em Estado Sólido	15
1.7 SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE RENINA UTILIZANDO FES	16
1.7.1 Casca de café	17
1.7.2 Farelo de laranja	18
1.7.3 Farelo de trigo	20
1.7.4 Farelo de arroz	23
1.7.5 Farelo de aveia	25
1.7.6 Bagaço de Cana	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 MICRORGANISMO	29
2.2 ESTOQUE E MANUTENÇÃO	30
2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	30
2.4 SUBSTRATOS	30
2.5 SUPLEMENTAÇÃO	31
2.6 EXTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	31
2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 FERMENTAÇÕES INICIAIS COM FARELO DE TRIGO	33
3.2 FERMENTAÇÕES COM FARELO DE LARANJA	36
3.3 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO FARELO DE LARANJA E FARELO DE TRIGO EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES	36
3.4 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO FARELO DE LARANJA E FARELO DE TRIGO EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES E CASEÍNA	38
3.5 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO CASCA DE CAFÉ E BAGAÇO DE CANA	39
3.6 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO FARELO DE TRIGO E AVEIA: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS INTERAÇÕES ENTRE TEMPO, MISTURA DE FARELOS E UMIDADE	40
3.6.1 Mistura de meios de cultivo	42
3.6.2 Tempo de cultivo	43
3.6.3 Umidade	44
3.6.4 Análise das interações significativas	45
3.7 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO FARELOS DE TRIGO E ARROZ SEM SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA: ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE TEMPO, MISTURA DE FARELOS E UMIDADE	48
3.7.1 Mistura de meios de cultivo	51
3.7.2 Umidade	52
3.7.3 Tempo de Cultivo	53
3.7.4 Análise das interações significativas	54
3.8 FERMENTAÇÕES UTILIZANDO FARELOS DE TRIGO E ARROZ COM SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA: ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE TEMPO, MISTURA DE FARELOS E UMIDADE	57

3.8.1 Mistura de meios de cultivo.....	59
3.8.2 Umidade	60
3.8.3 Tempo de Cultivo.....	61
3.8.4 Análise das interações significativas.....	62
4. CONCLUSÕES	69
5. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representação esquemática de uma micela de caseína e coagulação da caseína segundo a teoria do colóide protetor. (SPREER, 1975).....	3
Figura 2: Estrutura tridimensional da protease de <i>Mucor miehei</i> . Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov	8
Figura 3: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de laranja.....	18
Figura 4: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de trigo.....	21
Figura 5: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de arroz.....	23
Figura 6: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de aveia.....	25
Figura 7: Fotografia mostrando o aspecto do bagaço de cana.....	27
Figura 8: Fotomicroscopia de <i>Mucor miehei</i> cultivado em farelo de trigo.(Fonte: Guilherme Garcia da Silveira).....	29
Figura 9: Comparação das atividades enzimáticas obtidas nas fermentações em estado sólido utilizando-se caseína (0,5-10 gramas) ou HCl nas concentrações 0,2 e 0,4 N.....	34
Figura 10: Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas nas fermentações a 35°C utilizando-se quantidades de 8/2, 6/4, 4/6 e 2/8 gramas de farelo de trigo e laranja, respectivamente.....	37
Figura 11: Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas nas fermentações a 35°C utilizando-se quantidades de 8/2, 6/4, 4/6 e 2/8 gramas de farelo de trigo e laranja, respectivamente e adição de 2 gramas de caseína...	38
Figura 12: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tipo de meio de cultivo.....	43
Figura 13: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tempo de cultivo.....	44
Figura 14: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração a umidade.....	45
Figura 15: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o	46

meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	
Figura 16: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	46
Figura 17: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	47
Figura 18: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	48
Figura 19: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tipo de meio de cultivo.....	51
Figura 20: Box Plot das atividades enzimáticas de acordo com a quantidade de água utilizada.....	52
Figura 21: Plotagem das médias das atividades enzimáticas durante 72 horas de cultivo.....	54
Figura 22: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	54
Figura 23: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	55
Figura 24: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	56
Figura 25: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	57
Figura 26: Box Plot das atividades enzimáticas para o tipo de meio de cultivo	60
Figura 27: Box Plot das atividades enzimáticas de acordo com a quantidade de	61

água utilizada.....	
Figura 28: Box plot das atividades enzimáticas durante as 72 horas de cultivo	62
Figura 29: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	63
Figura 30: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	64
Figura 31: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	65
Figura 32: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.....	66
Figura 33: Comparação em Box Plot de todas as atividades enzimáticas através de média e mediana para meios com farelos de trigo/aveia e farelos de trigo/arroz com e sem suplementação de caseína.....	67

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Produção mundial de queijos em milhares de tonelada.....	4
Tabela 2: Principais diferenças entre Fermentação em Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm).....	14
Tabela 3: Principais aplicações da FES.....	16
Tabela 4: Composição da casca de café (% massa seca).....	17
Tabela 5: Microrganismos cultivados em polpa ou casca de café.....	17
Tabela 6: Composição da polpa cítrica.....	19
Tabela 7: Utilização do farelo de laranja para produção de diferentes bioprodutos..	20
Tabela 8: Composição do farelo de trigo.....	22
Tabela 9: Composição do farelo de arroz.....	24
Tabela 10: Composição do farelo de aveia.....	26
Tabela 11 : Produção de renina microbiana por <i>Mucor miehei</i> em 48 horas de cultivo utilizando 10 gramas de farelo de trigo como substrato, adição de HCl e suplementação com quantidades variadas de caseína em fermentação em estado sólido a 35 °C.....	34
Tabela 12: Valores percentuais reais de umidade (% de H ₂ O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada.....	41
Tabela 13: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática, considerando como fatores de variação meio (4), Umidade (4) e tempo (3) e interações.....	41
Tabela 14: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo.....	42
Tabela 15: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo.....	44
Tabela 16: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo.....	45
Tabela 17: Valores percentuais reais de umidade (% de H ₂ O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada.	49
Tabela 18: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática,	

considerando como fatores de variação meio(4), Umidade(5) e tempo(3) e interações.....	50
Tabela 19: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo.....	51
Tabela 20: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência da umidade.....	52
Tabela 21: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo.....	53
Tabela 22: Valores percentuais reais de umidade (% de H ₂ O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada.....	58
Tabela 23: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática, considerando como fatores de variação meio(4), Umidade(5) e tempo(3) e interações.....	59
Tabela 24: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo.....	60
Tabela 25: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência da umidade.....	61
Tabela 26: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo.....	62
Tabela 27: Análise estatística descritiva de todas as atividades enzimáticas nos meios com farelos de trigo/aveia e farelos de trigo/arroz com e sem suplementação de caseína, considerando todas as umidades utilizadas e tempos de cultivo de 24 a 72 horas.....	68

ABSTRACT

The microbial rennin production by *Mucor miehei* produced on Solid State Fermentation (SSF) using wheat bran, rice bran, oat bran, sugarcane bagasse and coffee husk was studied in this work. The combination of two different substrates was also studied. No growth of microorganism was observed when coffee husk, sugar cane bagasse and orange pulp were used. Casein has an important factor in the rennin biosynthesis induction in Submerged Fermentation and Solid State Fermentation. In the experiments with wheat bran and oat bran the maximum enzyme activities had been observed between 48 and 72 hours. Moisture above of 79% and the wheat bran increase in the mixture were favorable for increase enzyme activity. Moisture above 98 % can inhibit the microorganism growth and the enzyme synthesis increased after 48 hours. When casein was added in wheat bran and rice bran medium, a rise in the enzymatic activities was observed. Low enzyme activities were observed in moisture between 80 % and 100 %. The highest activity was observed after 48 hours. The enzyme activity in this study was upper when compared with other researchers.

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a produção de renina microbiana pelo zigomiceto *Mucor miehei* utilizando Fermentação em Estado Sólido (FES). Os substratos utilizados foram farelos de trigo, laranja, aveia e arroz, bagaço de cana e casca de café. Foi estudada também a combinação de várias quantidades de dois substratos diferentes já mencionados. Dos substratos utilizados, não houve crescimento evidenciado do fungo quando foi utilizado, casca de café, bagaço de cana e farelo de laranja. Caseína é um importante fator na potencialização da biosíntese de renina tanto em fermentação submersa quanto em Fermentação em Estado Sólido. Nos experimentos com farelos de trigo e aveia as maiores atividades enzimáticas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo, umidade acima de 79% e o aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura foi favorável no que diz respeito ao aumento desta atividade. Nos experimentos com farelos de trigo e arroz sem suplementação de caseína, todas as combinações de meio de cultivo foram estatisticamente significativas sobre a atividade enzimática. Umidades acima de 98 % parecem inibir o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a síntese enzimática que aumentou após 48 horas de cultivo. Quando houve a suplementação de caseína nos experimentos com farelos de trigo e arroz, houve um sensível incremento nas atividades enzimáticas. Os meios 2, 3 e 4 não forneceram influência estatisticamente importantes segundo o teste de Tukey e as menores atividades foram observadas no meio tipo 1. Umidades abaixo de 80 % e acima de 100 % forneceram baixas atividades enzimáticas. Assim como nos experimentos anteriores, as maiores atividades foram observadas após 48 horas de cultivo.

Analisando-se todos os experimentos, verifica-se que as maiores atividades enzimáticas foram superiores quando comparadas aos relatos de outros pesquisadores.

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento utilizado pelo homem há muito tempo. Provavelmente, os seus primeiros tipos foram fabricados na Mesopotâmia há 8.000 anos (BUDTZ, 1989; NEELAKANTAN, 1999). As origens de sua descoberta são objetos de muitas lendas e uma das mais conhecidas é atribuída a um mercador árabe que, em uma de suas provisões de viagem, armazenou leite em bolsas confeccionadas a partir de estômagos de bezerro. O mercador observou, após um tempo, que o leite havia desaparecido e que, em seu lugar, havia uma pasta semi-sólida e um líquido amarelo e o que o mercador considerou, na ocasião, como um infeliz acidente, converteu-se em um grande sucesso para a humanidade. Assim como o vinho, a fabricação do queijo foi elevada à categoria de ciência pelos romanos e à de arte pelos franceses (RIBEIRO, 2001).

No Brasil a produção de queijos iniciou-se com a colonização portuguesa, porém, a partir da segunda metade do século XVIII, durante a corrida do ouro nas serras mineiras, o leite produzido pelos rebanhos destinados à alimentação dos pioneiros passou a ser utilizado nas fazendas para a produção de queijo do tipo Minas. Com a vinda de imigrantes

dinamarqueses e holandeses para o Brasil e seu estabelecimento no estado de Minas Gerais, iniciou-se a produção de um queijo semelhante ao Dambo dinamarquês e ao Gouda holandês, denominado queijo Prato. Atualmente a liderança na produção de queijos no Brasil pertence ao queijo tipo mussarela, seguido pelo Prato e Minas (RIBEIRO, 2001).

A caseína do leite pode ser coagulada por dois métodos distintos: ácido ou enzimático, porém, na maioria dos tipos de queijo, são utilizadas enzimas proteolíticas para obtenção do coágulo (SPREER, 1975; REED, 1993).

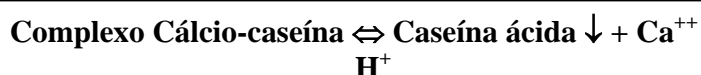
Estas enzimas proteolíticas são industrialmente nomeadas reninas e podem ser de diferentes origens: animal, vegetal ou microbiana (SCRIBAN, 1985). Durante muito tempo, a maioria do coalho utilizado era proveniente de um extrato feito a partir do quarto estômago (abomaso) de bezerros em lactação, porém, devido ao aumento do consumo e produção de queijos aliado à baixa disponibilidade deste tipo de matéria prima citada, houve o estímulo à procura de fontes alternativas para obtenção de renina (SCRIBAN, 1985). Dentre estas, a que sintetizava uma enzima e produzia um queijo com qualidades físicas, químicas e organolépticas similares à renina bovina foi a protease ácida produzida pelo zigomiceto *Mucor miehei* (REED, 1993).

Desde então, têm-se pesquisado muito sobre parâmetros que envolvam a síntese desta protease em cultivo submerso (LASURE, 1980; ESCOBAR e BARNETT, 1993 e 1995; SILVEIRA e CONTIERO, 2001, SEKER *et al.*, 1998 e 1999) e em cultivo em estado sólido (THAKUR *et al.*, 1990).

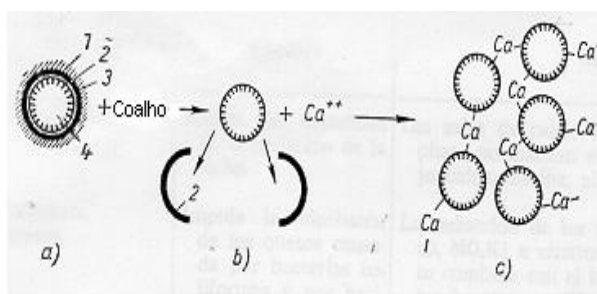
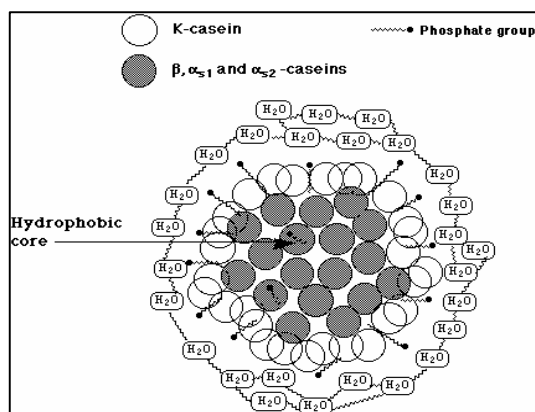
1.1 Fabricação do Queijo

A formação do queijo pode ocorrer de duas maneiras: método ácido e método enzimático. No método ácido há o ajuste do pH ao ponto isoelétrico da caseína (próximo de

4,65), sendo que neste valor, devido à igualdade de cargas (internamente) e neutralidade externa, a solubilidade é mínima, ocorrendo então a formação do complexo caseína-cálcio. Quando o ponto isoelétrico é atingido, ocorre a formação de caseína ácida, a qual precipita, ficando íons cálcio em solução, que combinarão com ácido láctico para formar lactato de cálcio. Esse processo é reversível.



A coagulação enzimática do leite é irreversível e consta de duas fases: na primeira fase ou fase enzimática o colóide que protege a caseína (k-caseína) dissocia os glicomacropéptídeos (parte da k-caseína, integrada por nitrogênio não protéico) fazendo com que o efeito protetor desapareça. O segundo passo ou fase de coagulação envolve a formação de pontes salinas a temperaturas favoráveis, entre as micelas de caseínas sensíveis ao cálcio, produzindo assim rapidamente a coagulação (Figura 2).



Legenda: a) Micela intacta de caseína. b) Partícula de caseína desprovida do colóide protetor. c) Gel do tipo enzimático (paracaseinato de cálcio). (1) Capa hidratada. (2) Glicomacropéptídeo. (3) Parte da caseína sensível ao cálcio. (4) Outras frações protéicas sensíveis ao cálcio.

Figura 1. Representação esquemática de uma micela de caseína e coagulação da caseína segundo a teoria do colóide protetor. (SPREER, 1975).

1.1.1 AUMENTO DA PRODUÇÃO DE QUEIJOS

A produção de queijos vem apresentando crescimento médio de 7% ao ano no País, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (Abiq). Em 2005, foram processadas 545 mil toneladas do produto, com incremento de 7% sobre o ano anterior. Para 2006, a entidade mantém a mesma projeção de crescimento. O faturamento do setor no ano passado chegou a R\$ 3,75 bilhões. O segmento gera em torno de 250 mil empregos diretos e milhares de indiretos.

Tabela 1: Produção mundial de queijos em milhares de tonelada

Milhares de Toneladas							
Países	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006*
AMÉRICA DO NORTE	4.208	4.216	4.372	4.349	4.465	4.588	4.721
Canadá	328	329	350	342	305	307	308
Estados Unidos	3.746	3.747	3.877	3.881	4.026	4.145	4.275
México	134	140	145	126	134	136	138
AMÉRICA DO SUL	952	962	901	845	840	880	920
Argentina	445	440	370	325	370	400	425
Brasil	445	460	470	460	470	480	495
Venezuela	62	62	61	60	n.d.	n.d.	n.d.
UNIÃO EUROPÉIA	5.861	5.865	5.993	6.100	6.430	6.515	6.580
EUROPA ORIENTAL	92	90	88	23	26	28	29
Romênia	92	90	88	23	26	28	29
EX – URSS	287	365	469	504	574	625	650
Rússia	220	260	340	335	350	355	360
Ucrânia	67	105	129	169	224	270	290
ÁFRICA	380	395	414	463	468	473	475
Argélia	n.d.	n.d.	4	13	13	13	13
Egito	380	395	410	450	455	460	462
ÁSIA	49	54	57	60	61	62	63

Coréia do Sul	15	20	20	23	24	23	23
Filipinas	n.d.	n.d.	1	2	2	2	2
Japão	34	34	36	35	35	37	38
OCEANIA	670	655	725	669	697	676	690
Austrália	373	374	413	368	389	376	395
Nova Zelândia	297	281	312	301	308	300	295
TOTAL	12.499	12.602	13.019	13.013	13.561	13.847	14.128

* Previsão

** União Européia é composta por 25 países

Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
Atualizado em junho/ 2006.

1.2 Fontes e Escassez do Coalho Tradicional

A maioria dos tipos de queijos é fabricada pelo método enzimático utilizando a renina, que pode ser proveniente de diferentes fontes: animal, vegetal e microbiana (SCRIBAN, 1985).

Tradicionalmente, utiliza-se, ainda, renina proveniente do quarto estômago (abomaso) de bezerros em lactação. Estes animais são abatidos e, com o seu abomaso, é obtido um extrato de enzimas proteolíticas, denominado coalho (REED, 1993; SCRIBAN, 1985; SPREER, 1975).

Como exemplos de fontes de origem animal, podem-se citar proteases obtidas de bovinos adultos, porcos, cordeiros e cabritos e uma outra enzima, de origem vegetal, proveniente de uma flor denominada *Cynara cardunculus* (SCRIBAN, 1985). Estas enzimas possuem uma alta atividade proteolítica residual sendo indesejáveis para a obtenção de muitos tipos de queijos.

O crescente aumento da produção mundial de queijos (tabela 1), juntamente com a redução na produção de coalho de origem bovino, devido à baixa disponibilidade de animais para abate, resultou em um aumento no preço de coalho tradicional e isto contribuiu para a procura de um substituto desta enzima, (FOX, 1991; ESCOBAR e BARNETT, 1993).

Devido aos problemas descritos, houve o estímulo à procura de fontes microbianas de enzimas coagulantes.

1.3 Fontes Microbianas de Enzimas Coagulantes

Vários microrganismos foram testados na tentativa de obtenção de uma enzima com qualidades aceitáveis para a fabricação de queijo, tais como: *Endothia parasitica*, *Mucor pussilus*, *Cryptococcus albidus*, *Bacillus cereus* e *Mucor miehei* (FOX, 1991; ROSE, 1980; BAYLEY e OLLIS, 1988).

Dentre estes, descobriu-se que os zigomicetos *Mucor miehei* e *Mucor pussilus* produziam uma enzima coagulante com características muito similares ao coalho bovino comercial por produzir altas taxas de coagulação aliada a altas taxas de produção (ROSE, 1980; AUNSTRUP, 1976; REED, 1993; BAILEY e SIIKA-AHO, 1988).

O coalho proveniente de *Endothia parasitica* foi utilizado com relativo sucesso. Entre os coalhos microbianos o de *E. parasitica* é o que exhibe atividades proteolíticas mais altas sobre α - e β - caseínas e menor atividade proteolítica sobre κ -caseína, mas, geralmente, causa um sabor amargo no queijo (REED, 1993).

Outros estudos utilizam a clonagem do gene da quimosina bovina para expressão em outros microrganismos como, por exemplo, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus awamori*

e *Escherichia coli* (REPELIUS, 1998) e também a expressão do gene de *M. miehei* em *Aspergillus oryzae* (NEELAKANTAN *et al.*, 1999)

O uso das proteases de *Mucor* foi sugerido desde 1920, mas, devido a problemas operacionais e da qualidade do coalho obtido, seu uso foi abandonado até meados da década passada. Embora a especificidade proteolítica destas enzimas seja diferente do coalho tradicional, geralmente produzem queijos com boa qualidade e são intensamente utilizados nos Estados Unidos. O uso do coalho tradicional ainda encontra emprego na Europa, Áustria e Nova Zelândia por motivos culturais (FOX, 1991).

A protease de *Mucor pusillus* var. Lindt, a qual não possui carboidratos em sua cadeia, alcançou resultados satisfatórios como coalho alternativo na produção de uma grande variedade de queijos, mas não foram todas as cepas da var. Lindt que produziram queijos de qualidade aceitável. Esta enzima é mais sensível a mudanças de pH na faixa entre 6,4 e 6,8 do que o coalho bovino (REED, 1993).

Enzimas extracelulares de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasitica* tem sido aceitas para aplicação na indústria devido à alta taxa de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica (LASURE, 1980; BAILEY e SIIKA-AHO, 1988; THAKUR *et al.*, 1990; ESCOBAR e BARNETT, 1993).

Um outro aspecto do coalho proveniente do zigomiceto *Mucor miehei* é sua alta termoestabilidade e esta enzima permanece ativa no soro e fica concentrada nos produtos provenientes do mesmo, causando problemas quando tais produtos, contendo coalho microbiano residual, entram em contato com caseína, como subprodutos provenientes do soro ou queijos que necessitam do processo de maturação. Conseqüentemente, quase todo o coalho utilizado na indústria de queijo é, agora, submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio sob condições controladas, com o intuito de diminuir sua termoestabilidade.

Alguma atividade enzimática é perdida, mas a enzima modificada tem estabilidade similar à enzima de origem bovina (REED, 1993)

A protease produzida por *Mucor miehei* é uma protease aspartato ácida (figura 2) com massa molar 38.000 Da (EC 3.4.23.23). A molécula consiste de uma simples cadeia peptídica contendo aproximadamente 6 % de carboidratos. Esta enzima é estável entre o pH 3 e 6, com um pH ótimo de 4,5 para estabilidade (ROSE, 1980).

A enzima hidrolisa, especificamente, ligações peptídicas envolvendo as parcelas aromáticas e hidrofóbicas da cadeia (USTUNOL e ZECKER, 1996; ROSE, 1980).

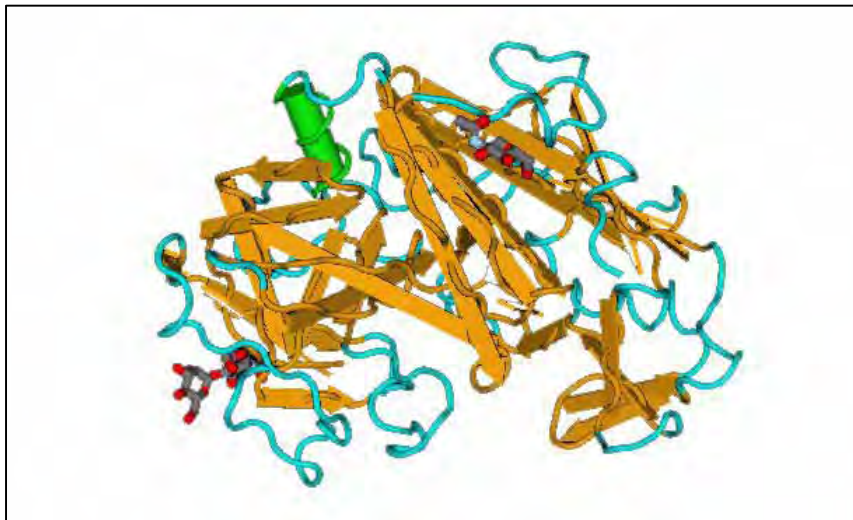


Figura 2: Estrutura tridimensional da protease de *Mucor miehei*. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Após a 2ª Guerra Mundial houve um intenso desenvolvimento na produção de antibióticos por fermentação submersa, contribuindo, posteriormente, para um melhoramento na produção de enzimas microbianas obtidas, também, por fermentação submersa (ROSE, 1980).

As proteases industriais são as maiores representantes no mercado internacional das enzimas (FOGARTY, 1990). Durante a década de 90, o coalho microbiano foi utilizado

para a manufatura de um terço de todo o queijo produzido no mundo (NEELAKANTAN *et al.*, 1999) e, nos Estados Unidos apenas uma pequena porcentagem de coalho bovino é utilizado para a fabricação de queijos. A maioria dos fabricantes de queijo prefere renina microbiana produzida por fermentação (BURRINGTON, 2001).

1.4 Classificação taxonômica do fungo *Mucor miehei*

Mucor miehei tem a seguinte classificação taxonômica :

FILO : Zygomycota
CLASSE : Zygomycetes
ORDEM : Mucorales
FAMÍLIA : Mucoraceae

Trata-se de um fungo saprófita com micélio cenocítico extenso, ocorrendo septo apenas para separar o esporângio durante seu amadurecimento.

A reprodução dos mucorales ocorre por meio de esporos de reprodução assexuada denominados esporangiósporos que ficam armazenados dentro de esporângios simples ou ramificados que são estruturas globosas infladas, apresentando uma columela central (PUTZKE e PUTZKE, 1998; GRIFFIN, 1981).

1.5 Trabalhos utilizando o zigomiceto *Mucor miehei*

O estudo da produção de renina pelo zigomiceto *Mucor miehei* tem seguido duas diferentes metodologias de cultivo: fermentação submersa (batelada e alimentação contínua) e em fermentação em estado sólido (FES).

1.5.1 Produção de renina microbiana via Fermentação em Estado Sólido

Poucos trabalhos têm sido publicados a respeito das variáveis que controlam o processo de produção da protease ácida do *Mucor miehei*. O efeito da composição do meio e concentração de cada constituinte do meio têm sido investigados com relação à atividade coagulante da enzima produzida por *Mucor miehei*. Segundo Preetha e Boopathy (1994), *M. miehei* exibe atividade coagulante quando cultivado em meios à base de farelo de trigo, batata/glicose ou extrato de levedura/glicose, mas não quando cresce em meios à base de leite desnatado/glicose, peptona/glicose ou peptona/levedura. A partir destes dados, foi verificado que, para cultivo em meio sólido, o uso de farelo de trigo favorece a produção da enzima. Os mesmos observaram que o farelo de trigo, umedecido com água na proporção 1:0,6 (peso/volume), apresentou ótimos resultados. Segundo esses autores, o meio contendo farelo de trigo favoreceu a produção da atividade coagulante da renina porém não a atividade proteolítica (o que é desejável em uma enzima utilizada na fabricação de queijo). Outros aspectos observados foram que o teor de umidade do meio de crescimento influenciou na atividade coagulante e que as mais altas atividades coagulantes e proteolíticas foram atingidas após 3 e 5 dias de crescimento, respectivamente.

Thakur *et al.* (1990), estudando a produção da enzima, mediante o processo de fermentação em estado sólido, verificaram as condições ótimas que resultaram em máximo rendimento na atividade coagulante: uso simultâneo de farelo de trigo e farinha de trigo no meio de cultura na proporção 9:1; leite em pó desnatado 1% ; pH 1,0; temperatura de 42°C e conteúdo de umidade em 70%.

1.5.2 Produção de renina microbiana via Fermentação Submersa

Lasure (1980) verificou que, durante a produção da protease ácida por fermentação em meio líquido, altas concentrações de aminoácidos, glicose e sulfato de magnésio no meio de cultivo reprimem a atividade enzimática. Compostos contendo alta concentração de nitrogênio ou enxofre, tais como tartarato de amônio e sulfato de magnésio reprimem a atividade enzimática na ausência de caseína. Este mesmo estudo relatou que uma proteína semelhante à caseína do leite deve estar presente no meio de cultura para induzir a produção de enzima. O uso de caseína (aproximadamente 0,08% p/v) induz a produção de altas concentrações da enzima. A pesquisa comprovou também que concentrações de glicose acima de 162 g/L resultam em decréscimo em sua síntese. Outros fatores que podem inibir a síntese da enzima são a presença de aminoácidos no meio de cultivo em concentrações acima de 3,0 g/L e problemas de aeração inadequada e/ou transferência insuficiente de nutrientes. Sabe-se também que a enzima de *Mucor miehei* CBS 370.65 é instável para valores de pH maiores que 6,5 (ESCOBAR e BARNETT, 1995).

Seker *et al.* (1999) e Beyenal *et al.* (1999) estudaram a produção de renina por *Mucor miehei* em fermentação com alimentação contínua de glicose (2,5-30 g/L) e verificaram que, sob altas taxas de alimentação, a produção da enzima ocorria em menor tempo na forma de picos que decresciam rapidamente. Este comportamento mostrou que havia o uso de glicose predominantemente para crescimento celular do que para síntese da enzima. Alimentação com glicose na faixa de 15 até 30 g/L foram observadas atividades enzimáticas de 368 a 408 U.S. (Unidades Sohxlet) mas, na faixa de 2,5 a 15 g/L, a atividade enzimática variou gradualmente até um pico de 496 U.S. A concentração de 7,5 g/L de glicose, foi o valor apropriado para este tipo de cultivo.

Foi demonstrado que há uma perda da atividade enzimática em meio ligeiramente básico (pH=8,0) à 38° C. A partir disso, verifica-se que para minimizar perdas na atividade enzimática a fermentação deve ocorrer em meio ligeiramente ácido (pH ≤ 6,5) (ESCOBAR e BARNETT, 1995).

Sabe-se que *Mucor miehei* NRRL 3420 atinge uma concentração celular máxima de 9,56 g/L à 48° C em 72 horas nas condições descritas pelos autores (STREETS e INGLE, 1972). Porém, este trabalho estudou apenas o crescimento do fungo, não verificando a produção de renina sob as mesmas condições.

O efeito da velocidade de agitação na produção da enzima foi investigado utilizando frascos em agitação e foi observado que a produção da enzima estava associada à concentração celular e de substrato. A velocidade de consumo de substrato diminuía em velocidades de agitação baixas (menores que 80 rpm) devido às condições limitantes de transferência de massa enquanto as mais altas concentrações da enzima, 1400 US/mL foram obtidas na agitação de 380 rpm (ESCOBAR e BARNETT, 1993).

1.6 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Segundo Del Bianchi *et al.* (2001), a fermentação em estado sólido pode ser definida como “processos que se referem à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido, que pode ser um substrato ou meio umidificante ligado a ela, está a um nível de água que, por um lado assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação de água com a matriz sólida”.

Neste tipo de fermentação, o substrato fornece, não somente os nutrientes para o microrganismo, como também age como suporte para o crescimento celular (PANDEY *et*

al., 2000a; DOELLE *et al.*, 1992). Um aspecto interessante é que este processo simula as condições naturais de sobrevivência da maioria dos fungos que tiveram uma convergência evolucionária em direção à utilização de substratos sólidos (HÖLKER *et al.*, 2004; HÖLKER e LENZ, 2005).

Ao se comparar a utilização da FES no oriente, o continente ocidental tradicionalmente não utiliza este tipo de processo, pois, além de ser uma influência cultural na produção de insumos e alimentos naquele continente, no ocidente ele compete com as facilidades tecnológicas da fermentação submersa que teve amplo desenvolvimento após os anos 40 devido à necessidade da intensa produção de antibióticos para utilização na segunda guerra mundial. Outra vantagem da fermentação em estado sólido é um maior rendimento do produto a ser obtido, pois ela é um processo conduzido na ausência de uma fase líquida. Deste modo, há baixa geração de resíduos, economia de energia, sem necessidade da utilização de agentes antiespumantes e agitação e o processo pode ser conduzido em condições semiestéreis, pois o crescimento de bactérias e leveduras é minimizado devido à baixa quantidade de água no sistema. Outra vantagem ecológica é que a FES, em muitos casos, utiliza resíduos agroindustriais como fonte de carbono e energia (HÖLKER e LENZ, 2005; RAIMBAULT, 1998; DOELLE *et al.*, 1992). As principais diferenças entre FES e Fermentação submersa podem ser visualizadas na tabela 2, a seguir:

Tabela 2: Principais diferenças entre Fermentação em Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm)

FATOR	FES	FSm
Substratos	Polímeros insolúveis ou pouco solúveis	Compostos geralmente solúveis em água
	Geralmente fornece todos os nutrientes	Cada composto tem uma função diferencial
	O microrganismo cresce firmemente aderido ao substrato	O microrganismo encontra-se distribuído uniformemente no sistema
Assepsia (Escala Industrial)	Trabalha-se com baixos níveis de assepsia ou há tratamento térmico do sistema	O sistema é esterilizado com calor ou filtração. É necessário um estrito controle de contaminação
Inoculação	Relação inóculo/meio geralmente é alta. Operação complexa	Relação inóculo/meio geralmente é baixa. Operação simples
Controles de processo	Controle de temperatura é complexo devido a baixa condutividade térmica do substrato	Controle de temperatura simples devido às características do sistema
	O pH geralmente não é controlado e, quando é, utiliza-se solução tampão ou o próprio substrato já é tamponante	Controle de pH é fácil devido às características do sistema
Aeração	A fase gasosa ocupa os espaços entre as partículas fornecendo oxigênio ao sistema	O oxigênio é transferido continuamente ao meio por injeção de ar
Bioreator	Reatores estáticos ou agitados com projetos dirigidos. Baixo consumo energético	Grande volume, complexos com modelos nomeados e patenteados. Alto consumo energético
Concentração e recuperação de produtos	Recuperação relativamente simples Altamente concentrados (100-300 g/L)	Recuperação pode ser complexa Baixa concentração (30-80 g/L)
Contaminação	Baixa devido à baixa umidade no sistema	Grande. As condições de cultivo precisam ser estritamente controladas
Geração de efluentes	Dependendo do processo, os resíduos são poucos e a capacidade poluente é mínima	Geração de grandes volumes com alta capacidade poluente
Agitação	Evita-se	Fundamental

Fontes: Doelle *et al.*, 1992; Raimbault, 1998.

1.6.1 Substratos para Fermentação em Estado Sólido

Um substrato considerado ideal é aquele que fornece tanto a fonte de carbono (energia) como a fonte de nitrogênio para o microrganismo (PANDEY *et al.*, 1999). Em relação à principal fonte de carbono utilizada pelos microrganismos, os substratos podem ser divididos dentro de 3 (três) principais grupos: amiláceos, compostos por celulose ou lignocelulose e aqueles que possuem açúcares solúveis (PANDEY *et al.*, 2000a).

Resíduos agroindustriais (RAs) geralmente são considerados os melhores substratos para FES devido à geração de grande quantidade de produtos aliada a um baixo ou nenhum preço de obtenção uma vez que, em sua maioria, estes são destinados para descarte no final da produção. Deste modo, numerosas espécies de RAs podem ser empregados para este fim (PANDEY *et al.*, 1999-2000a; DEL BIANCHI *et al.*, 2001; DOELLE *et al.*, 1992).

Na Tabela 3 estão inseridos alguns produtos que foram obtidos a partir de RAs mediante o processo de FES: bagaço de cana, cascas de arroz, café e trigo; farelos de arroz, trigo e milho; polpa de sorgo e café, serragem, arroz em grão, mesocarpo de côco, etc. O substrato mais utilizado para estudos em FES é o farelo de trigo (RAIMBAULT, 1998; PANDEY *et al.*, 1999-2000a ; DOELLE *et al.*, 1992).

Tabela 3: Principais aplicações da FES

SETOR	APLICAÇÃO	EXEMPLOS
Fermentações Industriais	Enzimas	Amilases, celulases, pectinases, xilanases e proteases
	Antibióticos	Penicilina, tetraciclina
	Ácidos Orgânicos	Fumárico, gálico, cítrico, láctico
	Etanol	<i>Scwanniomycetes</i> (em substratos amiláceos), <i>Sacharomyces</i> (*Caiçuma)
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides
Agricultura	Biocontrole e Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Colletotricum</i>
	Estimulantes de crescimento vegetal	Giberelinas, <i>Incoderma Rhizobium</i>
	Produção de inóculo	Micorrizas, cogumelos, bioinseticidas
Indústria Agro-alimentícia	Alimentos tradicionais	Koji, Queijos fermentados, molho de soja (Shoyu)
	Produção de fungos comestíveis	<i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Shiitake</i>
	Aditivos alimentares	Bioaromas, corantes, ácidos orgânicos
Ambiental	Biorremediação e Biodegração de compostos tóxicos	Casca de café, pesticidas, subprodutos da mandioca

Fonte: Raimbault, 1998.

* Caiçuma é uma bebida alcoólica indígena feita a partir de mandioca fermentada (Nota do autor)

1.7 Substratos utilizados para a produção de renina utilizando FES

Os trabalhos sobre produção de renina microbiana utilizando-se FES, que utilizaram farinha e farelo de trigo, glicose e peptona como substratos (FERNANDEZ-LAHOURE, 1998; PREETHA e BOOPATHY, 1994; THAKUR *et al.*, 1990). Além destes, outros resíduos agroindustriais foram estudados como potenciais substratos para este fim. Estes resíduos, além de serem de fácil obtenção são de baixo custo. Sua utilização como substratos pode induzir uma destinação mais nobre que os métodos de descarte convencionais.

1.7.1 Casca de café

O café (*Coffea* sp) é uma das mais importantes “commodities” provenientes da agricultura no mundo. Anualmente são produzidas mais de um (1) milhão de toneladas em todo o mundo sendo o Brasil o seu maior produtor. Durante o seu processamento há a produção de resíduos como casca ou polpa de café, folhas e borra em mais de 2 milhões de toneladas por ano (PANDEY *et al.*, 2000c).

No Brasil, os frutos do café são processadas pelo método seco, resultando em apenas casca de café que é rica em compostos orgânicos e nutrientes, além de cafeína, taninos e polifenóis (Tabela 4) que apresentam natureza tóxica ou podem causar poluição ambiental (PANDEY *et al.*, 2000c).

Tabela 4: Composição da casca de café (% massa seca)

Componentes	%
Carboidratos	57,8
Proteínas	9,2
Fibras	-
Óleos	2
Cafeína	1,3
Taninos	4,5
Polifenóis	1
Pectinas	12,4

Tabela 5: Microrganismos cultivados em polpa ou casca de café

Microrganismo	Propósito
<i>Aspergillus</i> sp.	Enriquecimento protéico
A. niger	Produção de pectinase e ácido cítrico
Ceratocystis fimbriata, P. tannophilus	Bioaroma
F. moniliforme e G. fujikuroi	Ácido giberélico
Lentinus edodes, Pleurotus ostreatus e Volvarilla volvacea	Produção de cogumelos
Culturas metanogênicas termófilas	Produção de Biogás
<i>Rhizopus</i> sp. e <i>P. crhysopodium</i>	Biorremediação
Pleurotus ostreatus	Degradação de cafeína

Considerando a riqueza de carboidratos e proteínas na casca de café, juntamente com sua potencialidade como substrato para numerosos microrganismos (Tabela 5). Nesta pesquisa, este substrato foi também utilizado para a produção de renina utilizando-se *Mucor miehei*.

1.7.2 Farelo de laranja

O farelo de laranja ou polpa cítrica (Figura 3) é obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco. Entre estes resíduos, estão presentes cascas, sementes e polpas de laranjas. Esse material equivale a 50% do peso de cada fruta (ABECITRUS, 2002).



Figura 3: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de laranja

Tabela 6: Composição da polpa cítrica.

Componente	Porcentagem (%)
Proteínas	6,0
Carboidratos	62,7
Lipídios	3,4
Fibra	13,0
Cinzas	6,9
Umidade	8,0

Fonte: Abecitrus (2002)

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco concentrado. Da extração do suco é gerada uma grande quantidade de farelo de laranja, onde o Brasil ocupa espaço importante no setor de exportação (ABECITRUS, 2002).

Durante o processamento da laranja, há a geração de grande volume de resíduos que ocupam um grande espaço físico, exigindo custos para manutenção e podem tornar-se problemas ambientais. Este subproduto da indústria cítrica é tradicionalmente utilizado de duas formas: como suplementação na ração animal, embora seu uso deve ser restringido a no máximo 30% da matéria seca para cada animal adulto (ABECITRUS, 2002) e também como adubo orgânico (GARZÓN e HOURS, 1992). No entanto, estes dois caminhos de utilização não absorvem toda a sua produção causando os problemas mencionados anteriormente.

Uma alternativa às mencionadas é a utilização do farelo de laranja como substrato para produção de bioprodutos a partir da fermentação utilizando microrganismos já que, em sua composição há a presença de carboidratos, lipídios e proteínas (Tabela 6). Estes bioprodutos geralmente têm um alto valor comercial e, além disso, este processo permite a

degradação e conseqüente diminuição da carga poluidora deste subproduto da indústria cítrica.

O farelo de laranja tem sido estudado como substrato para alguns microrganismos como mostra na Tabela 7.

Tabela 7: Utilização do farelo de laranja para produção de diferentes bioprodutos

Microrganismo	Bioproduto	Referência
<i>Thermoascus auranticus</i>	Pectinase	Martins <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilase, protease e Poligalacturanato liase	Mahmood, Greenman e Scragg, 1998
Vários microrganismos	metano	Srilatha <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus foetidus</i>	pectinase	Garzón e Hours, 1992
Vários	Pectinase, celulase e xilanase	Ismail, 1996
<i>Rhizopus oryzae</i>	Poligalacturonase	Hart <i>et al.</i> , 1991

1.7.3 Farelo de trigo

A fibra ou farelo de trigo (Figura 4) é a película externa da parte comestível do grão de trigo, que não é digerida pelo organismo humano. Ele é retirado do grão no processo de refinamento industrial.



Figura 4: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de trigo

O farelo de trigo ainda é o substrato mais pesquisado e utilizado para a FES por ser uma excelente fonte de carbono e nitrogênio (Tabela 8) e, conseqüentemente, utilizado em pesquisas que visam produção de renina a partir do cultivo de *Mucor miehei*. Em resultados anteriores utilizando-se este substrato suplementado com caseína, obtiveram-se bons resultados citados em Silveira e Contiero (2001), Silveira *et al.* (2001), Silveira *et al.* (2002). Deste modo, verificou-se a influência da combinação de diversos substratos com o farelo de trigo.

Tabela 8: Composição do farelo de trigo

Nutrientes	Unidade	Valor por 100 g
Proteínas	g	15,55
Lípides totais (gordura)	g	4,25
Carboidratos, por diferença	g	64,51
Fibra total dietética	g	42,79
Cinzas	g	5,79
Minerais		
Cálcio, Ca	mg	73,00
Ferro, Fé	mg	10,57
Magnésio, Mg	mg	611,00
Fósforo, P	mg	1013,00
Potássio, K	mg	1182,00
Sódio, Na	mg	2,00
Zinco, Zn	mg	7,27
Cobre, Cu	mg	0,99
Manganês, Mn	mg	11,50
Selênio, Se	µg	77,59
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	0
Tiamina	mg	0,52
Riboflavina	mg	0,57
Niacina	mg	13,57
Ácido pantotênico	mg	2,18
Vitamina B6	mg	1,30
Folato total	µg	79,00
Vitamina B12	µg	0
Lipídeos		
Ácidos graxos, total saturados	g	0,63
Ácidos graxos, total mono-insaturados	g	0,63
Ácidos graxos, total poli-insaturados	g	2,21
Colesterol	mg	0

Fonte: USDA Nutrient Database for Standard Reference (Julho 2001)

1.7.4 Farelo de arroz

O farelo de arroz é obtido mediante o polimento do grão integral do arroz para produzir arroz branco, o farelo de arroz (Figura 5) é um subproduto que concentra carboidratos, gorduras, proteínas, fibras, vitaminas e minerais (Tabela 9)



Figura 5: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de arroz

O farelo de arroz, pela sua riqueza em carboidratos, compostos nitrogenados, vitaminas e sais minerais, pode ser considerado um excelente meio de cultivo de microrganismos devido à sua composição (Tabela 9).

Tabela 9: Composição do farelo de arroz

Nutrientes	Unidade	Valor por 100 g
Proteínas	g	13,35
Lípides totais (gordura)	g	20,85
Carboidratos, por diferença	g	49,68
Fibra total dietética	g	21,00
Cinzas	g	9,98
Minerais		
Cálcio, Ca	mg	57,00
Ferro, Fe	mg	18,54
Magnésio, Mg	mg	781,00
Fósforo, P	mg	1677,00
Potássio, K	mg	1485,00
Sódio, Na	mg	5,00
Zinco, Zn	mg	6,04
Cobre, Cu	mg	0,72
Manganês, Mn	mg	14,21
Selênio, Se	µg	15,60
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	0
Tiamina	mg	2,75
Riboflavina	mg	0,28
Niacina	mg	33,99
Ácido pantotênico	mg	7,39
Vitamina B6	mg	4,07
Folato total	µg	63,00
Vitamina B12	µg	0
Lipídeos		
Ácidos graxos, total saturados	g	4,17
Ácidos graxos, total mono-insaturados	g	7,54
Ácidos graxos, total poli-insaturados	g	7,45
Colesterol	mg	0

Fonte: USDA Nutrient Database for Standard Reference (Julho 2001)

1.7.5 Farelo de aveia

O farelo de aveia (Figura 6) é obtido por um processo mecânico que separa a película que reveste o grão de aveia, é rico em fibras, chamadas β -glucanas.



Figura 6: Fotografia mostrando o aspecto do farelo de aveia

A Tabela 10 insere a composição do farelo de aveia que, da mesma maneira que outros farelos, pode ser uma possível fonte de carbono e nitrogênio e outros compostos importantes no cultivo de microrganismos.

Tabela 10: Composição do farelo de aveia

Nutrientes	Unidade	Valor por 100 g
Proteínas	g	17.299999
Lípides totais (gordura)	g	7.03
Carboidratos, por diferença	g	66.220001
Fibra total dietética	g	15.4
Cinzas	g	2.89
Minerais		
Cálcio, Ca	mg	58
Ferro, Fé	mg	5.41
Magnésio, Mg	mg	235
Fósforo, P	mg	734
Potássio, K	mg	566
Sódio, Na	mg	4
Zinco, Zn	mg	3.11
Cobre, Cu	mg	0.403
Manganês, Mn	mg	5.63
Selênio, Se	µg	45.200001
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	0
Tiamina	mg	1.17
Riboflavina	mg	0.22
Niacina	mg	0.934
Ácido pantotênico	mg	1.494
Vitamina B6	mg	0.165
Folato total	µg	52
Vitamina B12	µg	0
Lípidios		
Ácidos graxos, total saturados	g	1.328
Ácidos graxos, total mono-insaturados	g	2.376
Ácidos graxos, total poli-insaturados	g	2.766
Colesterol	mg	0

Fonte: USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 14 (Julho 2001)

1.7.6 Bagaço de Cana

O bagaço e o bagacilho de cana (Figura 7) são subprodutos com maior quantidade de celulose, proveniente do processamento da cana de açúcar nas destilarias e usinas açucareiras. O produto é constituído de aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina. Quimicamente, contém aproximadamente 50 % de celulose, 30 % de pentosanas e 2,4 % de cinzas e, devido a essa pequena quantidade de cinzas, o bagaço de cana oferece inúmeras vantagens em comparação a outros resíduos agroindustriais como palhas de arroz e trigo que têm 17,5 e 11 % de conteúdo de cinzas, respectivamente (PANDEY et al., 2000b).



Figura 7: Fotografia mostrando o aspecto do bagaço de cana

Geralmente um pré-tratamento deste bagaço é desejável para aumentar a digestibilidade e facilitar o acesso do ataque microbiano. Este pré-tratamento resulta no aumento da área interior das partículas do substrato, realizando solubilização parcial e/ou degradação da hemicelulose e lignina. Isto pode ser feito mediante aplicação de

pressão de vapor seguido de uma súbita expansão das fibras ou utilizando-se radiação gama e tratamentos com álcalis, peróxido de hidrogênio e solventes (PANDEY et al., 2000b).

Através dos anos, um vasto número de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e, preferencialmente, fungos filamentosos podem cultivados em bagaço de cana. Sua utilização em fermentação em estado sólido ocorre de duas formas: como fonte de energia e como material inerte (suporte) (PANDEY et al., 2000b).

Segundo Pandey et al. (2000b) há a descrição de, pelo menos, 53 espécies de microrganismos utilizados para a obtenção de subprodutos como celulasas, xilanasas, lacases, ácidos láctico, cítrico e glutâmico, pectinases, penicilina, bioaromas, pigmentos e muitos outros. Entretanto, não foram encontradas pesquisas que relatassem o uso de bagaço de cana para a produção de renina por *M. miehei*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Utilizou-se o zigomiceto *Mucor miehei* NRRL 3420 proveniente da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, sediada em Campinas – SP. As fotografias abaixo (Figura 8) foram obtidas utilizando microscópio estereoscópico com placa de captura de vídeo acoplada a um microcomputador e mostram *Mucor miehei* crescendo em farelo de trigo (as estruturas globulares escuras são os esporangiósporos).

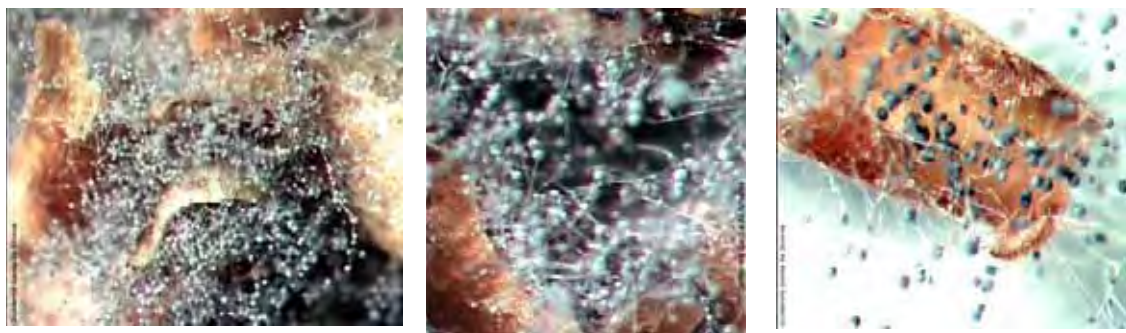


Figura 8: Fotomicroscopia de *Mucor miehei* cultivado em farelo de trigo.(Fonte: Guilherme Garcia da Silveira)

2.2 Estoque e manutenção

A cultura de estoque foi mantida em tubos inclinados, a 4 °C, com meio de cultura, Sabouraud modificado, cuja composição é de peptona bacteriológica (10 g/L), glicose PA (20g/L) e ágar (15g/L) . Caso houvesse necessidade, estoques de esporos proveniente do repique inicial mantidos em tubos criogênicos (em freezer) com uma solução contendo 20% de glicerol.

2.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação foi conduzida em frascos (erlenmeyers) de 300 mL em incubadora B.O.D. à temperatura de 35°C. O inóculo consistiu de 6 a 10 mL de uma suspensão padronizada de 10⁶ esporos/mL por grama de substrato. Todo o material utilizado (meios de cultivo, água destilada, frascos, filtros) foi esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm de pressão por aproximadamente 20 minutos.

2.4 Substratos

Os substratos testados foram: farelos de trigo, laranja, aveia e arroz, bagaço de cana e casca de café. Estudou-se, ainda, a combinação de várias quantidades de dois substratos diferentes já mencionados, codificados como meios 1, 2, 3 ou 4 de acordo com a descrição a seguir:

Meio 1: 8 gramas de farelo de trigo e 2 gramas de substrato X

Meio 2: 6 gramas de farelo de trigo e 4 gramas de substrato X

Meio 3: 4 gramas de farelo de trigo e 6 gramas de substrato X

Meio 4: 2 gramas de farelo de trigo e 8 gramas de substrato X

X: Substrato genérico que pode ser: farelo de laranja, farelo de aveia ou farelo de arroz.

2.5 Suplementação

Caseína demonstrou ser um importante indutor enzimático nas fermentações submersas e em estado sólido (SILVEIRA *et al.*, 2001), deste modo analisou-se a produção de renina com ausência/presença deste suplemento.

2.6 Extração da solução enzimática do cultivo em estado sólido

A solução enzimática foi extraída colocando-se 100 mL de água destilada gelada (10 °C) em cada frasco com material fermentado, seguida de homogeneização, filtração em um funil contendo algodão e centrifugação (10 minutos) em centrífuga refrigerada a 12 °C a 10.000 rpm. A homogeneização compreende a utilização de bastão de vidro com o objetivo de desagregar os grumos de substrato fermentado.

2.7 Determinação da atividade enzimática

A verificação da atividade enzimática foi realizada mediante a técnica modificada de ARIMA *et al.* (1970), obtendo, assim, os resultados em Unidades Soxhlet.. Neste procedimento foi adicionado 1 mL da solução resultante da filtração do meio fermentado com pH ajustado a 6,5 à 10 mL de substrato (leite desnatado reconstituído da marca Molico da Nestlé) preparado com água destilada contendo 0,01 M de CaCl₂, previamente aquecido à 35 °C, anotando-se o tempo exato para o aparecimento dos primeiros coágulos no tubo de ensaio e, caso não houvesse coagulação após 10 minutos, padronizou-se que a atividade seria igual a zero. Uma unidade Soxhlet é definida como a quantidade de enzima requerida para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos à 37 °C.

Obs: Alguns artigos expressam a atividade enzimática em unidades internacionais (U.I.) sendo que, 1 Unidade Internacional é equivalente a 400 Unidades Sohxlet (U.S.)

2.8 Análises estatísticas dos dados

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância do modelo do tipo fatorial para a atividade enzimática considerando os fatores umidade, tempo de cultivo e tipo de meio. As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do “software” SAS System v. 6.12 e para os gráficos foram utilizados os “softwares” Origin Graphics 5.0. e Statistica 6.

O principal propósito da análise de variância do modelo fatorial é visualizar o efeito dos fatores e suas intercorrelações entre as variáveis considerando suas causas adjacentes para a atividade enzimática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fermentações iniciais com Farelo de Trigo

Ensaio foram realizados para a avaliação da produção de renina utilizando fermentação em estado sólido. Nestes experimentos (SILVEIRA *et al.*, 2005) foi verificada a influência da hidrólise primária do farelo de trigo através da adição de HCl, no intuito de facilitar a utilização do substrato para o fungo, e de várias concentrações de caseína, verificando seu poder de potencialização na produção de renina observado nas fermentações em cultivo submerso.

A quantidade de substrato foi de 10 gramas de farelo de trigo. Foram utilizadas várias concentrações de caseína para se testar se havia potencialização da produção de renina ou 10 mL de HCl nas concentrações de 0,2 e 0,4 N para se verificar se um possível pré hidrólise do farelo de trigo influiria na produção da enzima.

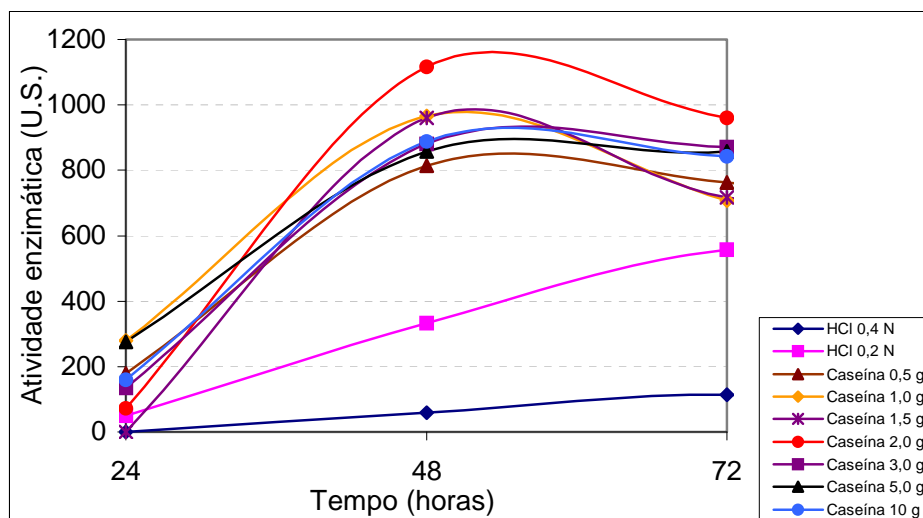


Figura 9: Comparação das atividades enzimáticas obtidas nas fermentações em estado sólido utilizando-se caseína (0,5-10 gramas) ou HCl nas concentrações 0,2 e 0,4 N.

Tabela 11 : Produção de renina microbiana por *Mucor miehei* em 48 horas de cultivo utilizando 10 gramas de farelo de trigo como substrato, adição de HCl e suplementação com quantidades variadas de caseína em fermentação em estado sólido a 35 °C.

Adição de HCL	Suplementação de Caseína (gramas)	pH	Máxima atividade coagulante (U.S.)
0,4 N		3,15	58,5
0,2 N		4,58	333,3
	0,5	6,84	813,6
	1,0	7,1	966
	1,5	6,88	960
	2,0	7,02	1117
	3,0	7,64	880,8
	5,0	7,65	857,1
	10	7,77	888,9

A Figura 9 e a Tabela 11 registram que as atividades enzimáticas mais significativas ocorreram em 48 horas de fermentação. Estes dados contrastam com os do trabalho de Thakur *et al.* (1990), que utilizou uma combinação de farelo e farinha de trigo na proporção de 9:1, leite em pó desnatado 1% e temperatura de 42 °C e os resultados de Preetha e Boopathy (1994), empregou farelo de trigo umedecido na proporção de 1:0,6 e temperatura de 30 °C, em que o pico de atividade da renina ocorreu em períodos superiores a este.

Nos experimentos utilizando-se HCl, em 48 horas de fermentação, observa-se que, na concentração de 0,4 N, a atividade enzimática foi de 58,5 U.S., enquanto que, na concentração de 0,2 N, foi de 333,3 evidenciando que, quanto maior a concentração deste ácido no meio, menor foi a atividade enzimática. Isto pode ter ocorrido devido à hidrólise do farelo de trigo que, liberando excesso de carboidratos, permitia que houvesse uma repressão catabólica, também observado por Thakur *et al.* (1990). Nestes dois experimentos o pico de atividade aconteceu mais tardiamente que nos demais ensaios, em 72 horas de fermentação, provavelmente devido à ausência da caseína que potencializa a produção de renina, mas para efeito de comparação utilizou-se como referência os valores obtidos em 48 horas.

A Figura 9 e Tabela 11 evidenciam que esta influência realmente existe pois, quando se aumenta a concentração de caseína, há um aumento gradativo da atividade coagulante. O aumento da quantidade de 0,5 para 2,0 gramas ocasionou aumento na síntese da enzima que atingiu o máximo de 1117 U.S. em 48 horas de fermentação. Em concentrações de caseína superiores a 2 gramas há a tendência na diminuição da atividade ocasionada, provavelmente, por repressão catabólica. Preetha e Boopathy

(1994) estudaram a influência da inclusão de leite em pó desnatado no meio sólido e observaram que concentrações acima de 2% neste constituinte, ocasionava um aumento de 3,5 vezes na atividade coagulante em relação ao controle. Thakur *et. al.* (1990) observaram que a maior atividade coagulante foi obtida utilizando-se de 5 % de leite em pó desnatado. A caseína é o constituinte em quantidade mais expressiva no leite em pó desnatado, comprovando assim, o papel na indução da síntese da enzima.

Embora não evidenciado na figura 9, observou-se que, no experimento com 5 gramas de caseína, o pico de atividade enzimática aconteceu em 96 horas de fermentação, portanto mais tardiamente em relação aos demais, mas também, para efeitos de comparação com os demais ensaios, utilizou-se o valor no tempo 48 horas.

3.2 Fermentações com farelo de laranja

As fermentações utilizando Farelo de Laranja foram realizadas inicialmente para se estudar a possibilidade deste substrato fornecer as condições mínimas de cultivo.

Foi utilizado 10 gramas de farelo de laranja e 10 mL de inóculo. Não houve evidência de crescimento micelial do fungo mesmo após 2 meses de cultivo e, provavelmente, os esporos não germinaram. Este fato pode ser devido à inabilidade de degradação do fungo a este substrato ou mesmo à presença de alguma(s) substância(s) inibidora(s) ou tóxica(s).

3.3 Fermentações utilizando farelo de laranja e farelo de trigo em diversas concentrações

Como os ensaios utilizando somente farelo de laranja não evidenciaram crescimento do fungo, decidiu-se combinar o farelo de laranja com farelo de trigo. A

quantidade total de substrato foi de 10 gramas, sendo que as proporções entre os dois substratos foram de 2/8, 4/6, 6/4 e 8/2 gramas de farelo de trigo e farelo de laranja, respectivamente. A quantidade de água adicionada foi de 10 mL.

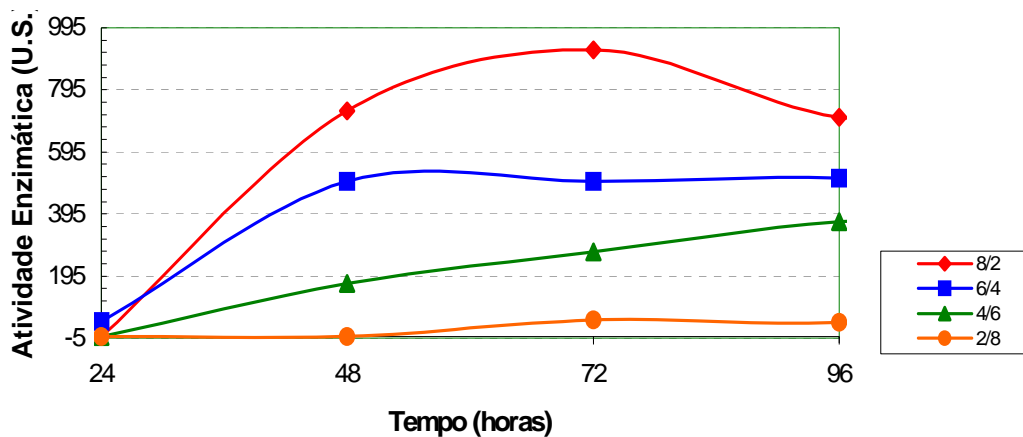


Figura 10: Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas nas fermentações a 35°C utilizando-se quantidades de 8/2, 6/4, 4/6 e 2/8 gramas de farelo de trigo e laranja, respectivamente.

Observa-se, através da figura 10 que as maiores atividades foram obtidas utilizando-se a proporção de 8/2 gramas de farelo de trigo e laranja, respectivamente. O pico de atividade, neste caso, foi de 923,1 U.S. em 72 horas de cultivo, decaindo-se e estabilizando-se em seguida na faixa de 700 U.S

O aumento da atividade enzimática nas várias concentrações dos dois substratos é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura.

Paralelamente aos resultados apresentados na Figura 10, observou-se que, o aumento na quantidade de farelo de trigo na mistura, proporcionava uma maior obtenção de esporos, evidenciado após a centrifugação.

Foi observado também, embora com fraca tendência, aumento do pH do meio de cultivo correspondendo ao aumento da concentração de farelo de trigo na mistura.

3.4 Fermentações utilizando Farelo de Laranja e Farelo de Trigo em diversas concentrações e caseína.

A caseína demonstrou ser um importante fator na potencialização da síntese de renina quando utilizada com farelo de trigo, deste modo outros experimentos foram realizados para observar se este fato também aplicava-se quando esta fosse incluída juntamente com a mistura de farelos de trigo e laranja. A quantidade de caseína adicionada a cada frasco foi de 2 gramas, mantendo-se a proporção de farelo de trigo e farelo de laranja. De 8/2 a 2/8 gramas, respectivamente.

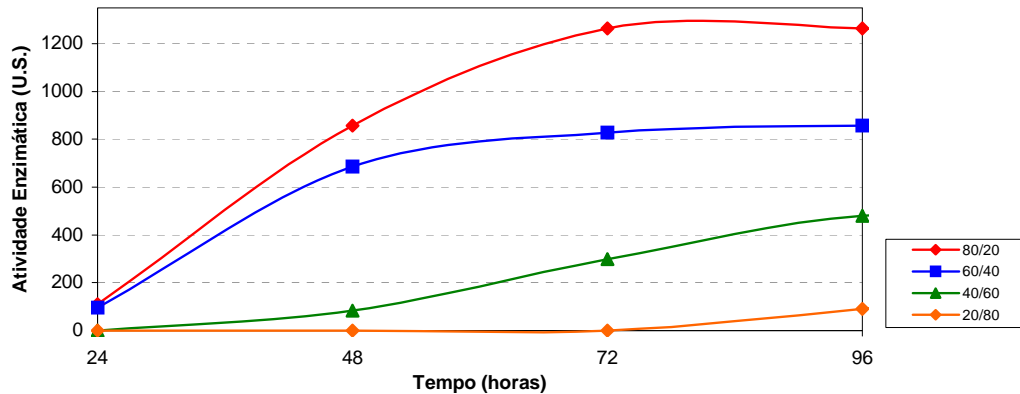


Figura 11: Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas nas fermentações a 35°C utilizando-se quantidades de 8/2, 6/4, 4/6 e 2/8 gramas de farelo de trigo e laranja, respectivamente e adição de 2 gramas de caseína.

A figura 11 ilustra o perfil de produção de renina microbiana utilizando-se farelos de trigo e laranja em diversas proporções com adição de 2 gramas de caseína..

Pode-se observar que há um nítido aumento na atividade enzimática nas proporções de 8/2, 6/4, 4/6 e 2/8 gramas de farelos de trigo/laranja, respectivamente, comparando-se com os cultivos em que havia a ausência de caseína.

Corroborando os experimentos sem a adição de caseína, a melhor combinação foi a de 8/2 gramas de farelos de trigo e laranja, respectivamente, onde a maior atividade enzimática foi de 1263,15 U.S. em 72 horas de cultivo, havendo a tendência de estabilização desta atividade em valores próximos a estes.

A atividade enzimática acima é superior ao maior valor obtido com a utilização de farelo de trigo e caseína somente (1117 U.S.), porém este valor ocorreu em 72 horas de cultivo enquanto que o anterior ocorreu em 48 horas de cultivo e, além disso, acredita-se que o farelo de laranja contribua para a melhoria da homogeneização da aeração em todo o substrato uma vez que sua granulação é um pouco maior em relação àquela do farelo de trigo.

3.5 Fermentações utilizando casca de café e bagaço de cana

Foram realizados aproximadamente 3 bateladas de experimentos utilizando casca de café e bagaço de cana, porém não houve germinação dos esporos ou crescimento micelial evidente, mesmo nos frascos aos quais acrescentou-se caseína.

Em relação a casca de café, isto pode ser devido a dois fatores: ou o fungo não contém o sistema enzimático para a utilização deste resíduo como substrato ou o tanino

e polifenóis presentes neste substrato estariam causando um efeito inibidor ou tóxico sobre o microrganismo.

Pode-se inferir que casca de café e bagaço de cana não podem ser utilizados para a produção de renina microbiana por este fungo.

3.6 Fermentações utilizando Farelo de Trigo e Aveia: análise estatística das interações entre tempo, mistura de farelos e umidade.

Em experimentos preliminares realizados foi constatado a viabilidade da utilização do farelo de aveia na produção de renina mediante fermentação em estado sólido porém, as atividades enzimáticas analisadas possuíam valores muito baixo (dados não mostrados). Deste modo pretendeu-se verificar se a combinação deste substrato com farelo de trigo sobre a produção da enzima seria viável.

Para a análise dos resultados foi utilizado o modelo do tipo fatorial para a atividade enzimática considerando como fatores de variação: mistura de meios (4 níveis), umidade (4 níveis) e tempo (3 níveis). A análise da variância do modelo foi realizada utilizando-se o Sistema Estatístico SAS System 6.12 pelo Teste de Tukey e os gráficos foram plotados utilizando-se os “softwares” Origin Graphics 5.0. e Statistica 6. Para realização deste estudo foram preparadas as seguintes composições de meio:

Mistura de meios (4 níveis):

1 : 8 e 2 gramas de farelos de trigo e aveia, respectivamente.

2 : 6 e 4 gramas de farelos de trigo e aveia, respectivamente.

3: 4 e 6 gramas de farelos de trigo e aveia, respectivamente.

4 : 2 e 8 gramas de farelos de trigo e aveia, respectivamente.

Umidade (4 níveis): 6, 7, 8 e 9 mL de água

Tempo (3 níveis): 24, 48 e 72 horas de cultivo.

A análise da umidade dos substratos detectada foi de 9,2% para farelo de trigo e 9,12 para o farelo de aveia. Deste modo os valores reais dos teores de umidade estão listados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores percentuais reais de umidade (% de H₂O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada

		Quantidade de água adicionada (em mL)			
		6	7	8	9
Combinação de substratos Farelo de Trigo/Farelo de Aveia em gramas, respectivamente	8/2	69,18	79,18	89,18	99,18
	6/4	69,17	79,17	89,17	99,17
	4/6	69,15	79,15	89,15	99,15
	2/8	69,14	79,14	89,14	99,14

A análise da Tabela 13 permite concluir que, ao nível de 5% de significância, todos os fatores e interações tiveram diferenças significativas, excluindo-se a interação meio x meio de cultivo.

Tabela 13: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática, considerando como fatores de variação meio (4), Umidade (4) e tempo (3) e interações.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr. > F
Meio	3	527713,583	175904,528	51,61	< 0,0001
Umidade	3	656488,500	218829,500	64,2	< 0,0001
Meio x Umidade	9	115506,583	12834,065	3,77	0,0012
	2	1453723,896	726861,948	213,26	< 0,0001

Tempo					
Meio x Tempo	6	46025,604	7670,934	2,25	0,0540
Umidade x Tempo	6	166183,687	27697,281	8,13	< 0,0001
Meio x Umidade x Tempo	18	154298,479	8572,138	2,52	0,0056

$R^2=0,95$; $CV=15,45$

3.6.1 Mistura de meios de cultivo

Através do teste de Tukey (Tabela 14) e da Figura 12 observa-se que as atividades enzimáticas foram decrescentes de acordo com o tipo de meio (meio 1 → meio 4). As médias mais altas das atividades foram de 466,79 U.S. no meio 1. As atividades nos meios 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas e a menor atividade foi observada no meio 4. Provavelmente isto ocorreu devido ao tipo de combinação de substratos; o aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura parece ser diretamente proporcional ao aumento das atividades enzimáticas, evidenciando que este favoreceu a síntese da enzima.

Tabela 14: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Meio
A	466,79	24	1
B	403,42	24	2
B	379,43	24	3
C	262,00	24	4

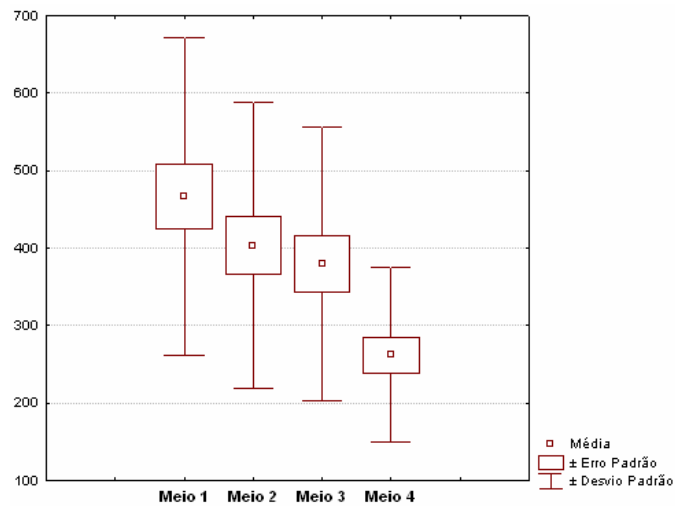


Figura 12: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tipo de meio de cultivo

3.6.2 Tempo de cultivo

A Figura 13 e a Tabela 15 evidenciam que as maiores atividades enzimáticas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo, 467,09 e 462,75 U.S., respectivamente. Em 72 horas de cultivo observam-se um pequeno aumento da atividade, porém, não há diferenças estatísticas entre estes dois tempos de cultivo. A menor atividade foi observada em 24 horas onde, provavelmente não houve tempo suficiente para o desenvolvimento para a colonização do substrato e, conseqüentemente, síntese da enzima.

Tabela 15: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Tempo
A	467,09	32	72
A	462,75	32	48
B	203,91	32	24

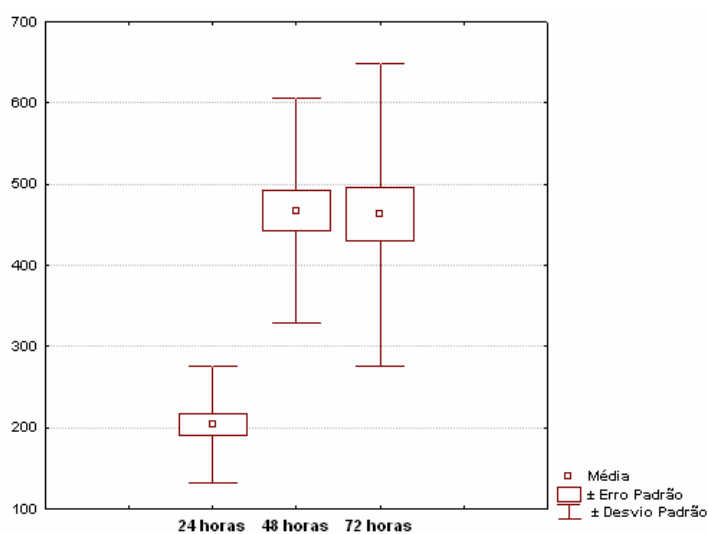


Figura 13: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tempo de cultivo.

3.6.3 Umidade

Através da Figura 14 e Tabela 16 observam-se as médias de atividades enzimáticas de acordo com o teor de umidade do meio de cultivo. A maior média de atividade enzimática, 461,96 U.S., embora discreta, foi observada quando utilizou-se 9 mL de água. Mediante o teste de Tukey, verificou-se que há diferenças estatísticas em comparação a outras umidades inferiores que proporcionaram um decréscimo na atividade enzimática não havendo diferenças significativas entre 7 e 8 mL de água. As menores atividades enzimáticas foram observadas quando utilizou-se 6 mL de água.

Tabela 16: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Umidade (mL)
A	461,96	24	9
B	416,29	24	7
B	391,96	24	8
C	241,46	24	6

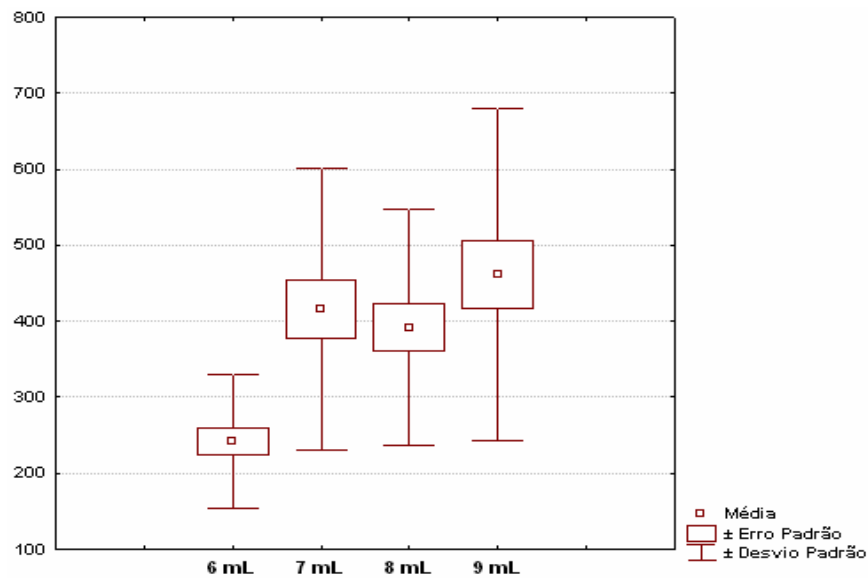


Figura 14: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração a umidade

3.6.4 Análise das interações significativas

Como todos os fatores e interações tiveram diferenças estatísticas significativas para as atividades enzimáticas, as análises das interações foram realizadas utilizando o po de meio de cultivo como fator de comparação.

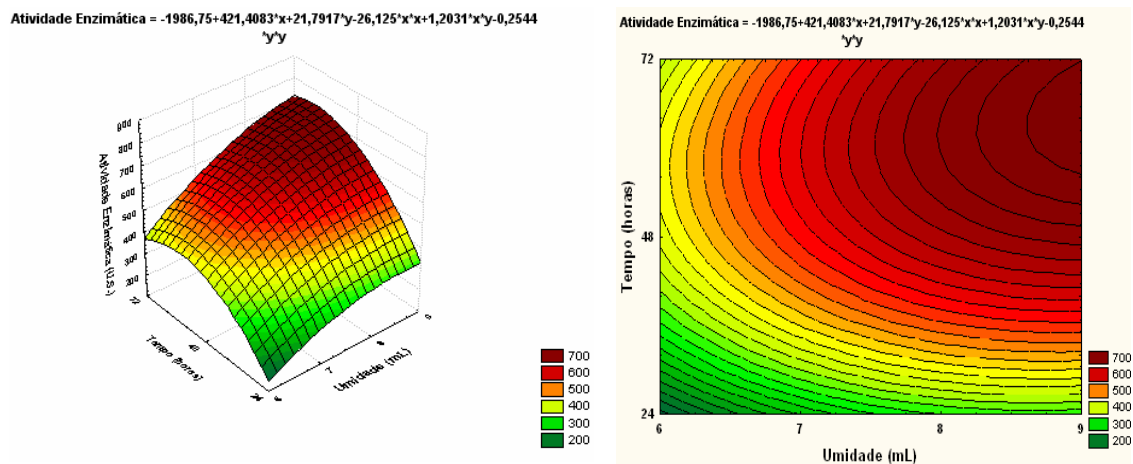


Figura 15: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

As maiores atividades enzimáticas para o meio 1 (Figura 15) foram observadas após 48 horas de cultivo e quantidades de água acima de 7 mL (acima de 79,2 % de umidade) favorecem a síntese da enzima. Análises estatísticas projetaram a máxima atividade de 743,4 U.S. em 65,5 horas de cultivo e umidade na faixa de 9,6 (105,8 % de umidade).

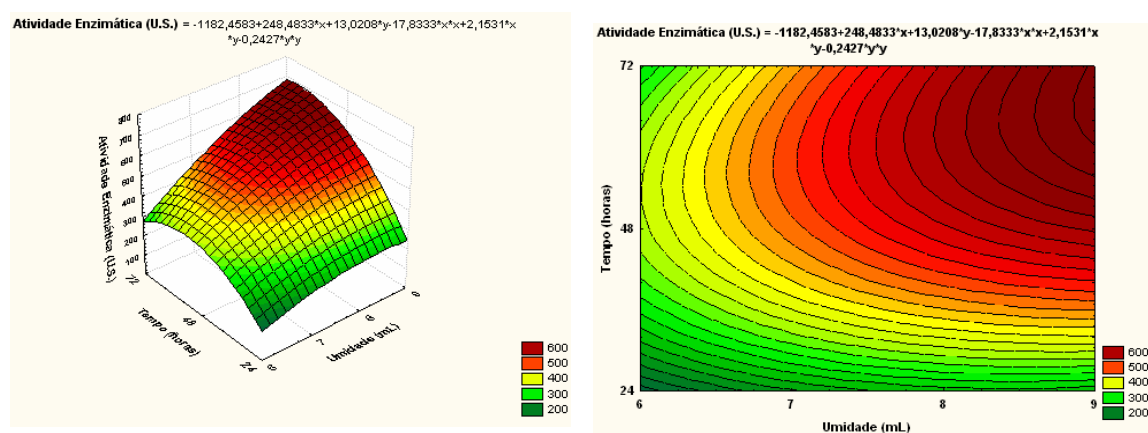


Figura 16: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

Através da Figura 16 (meio de cultivo 2), pode-se observar que, após 48 horas de cultivo, valores de quantidade de água acima de 8 mL (acima de 89,2 % de umidade) foram favoráveis para síntese da enzima. Segundo a projeção, a maior atividade enzimática foi de 787, 5 U.S. em 78 horas de cultivo e quantidades de água em torno de 11 mL (121,2 % de umidade).

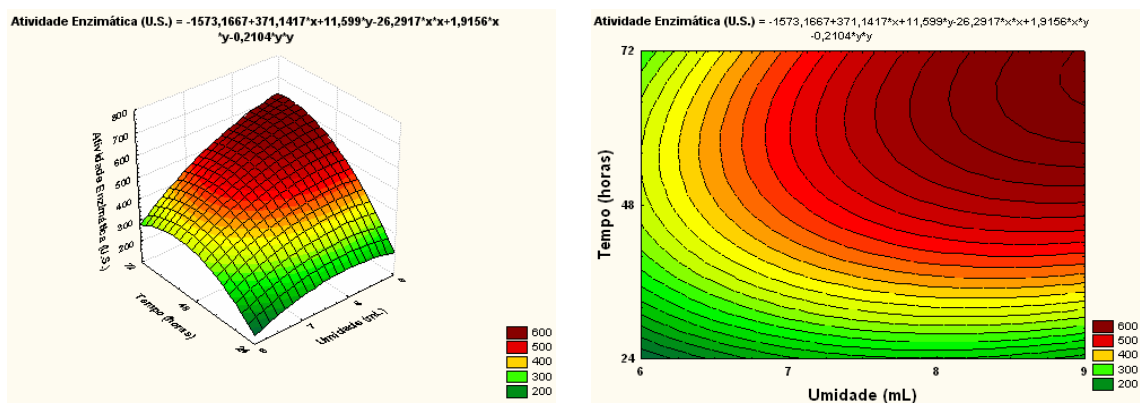


Figura 17: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

As maiores atividades enzimáticas (Figura 17) no meio tipo 3 foram observadas após 48 horas de cultivo quantidades de água acima de 7 mL (acima 79,15 % de umidade). A projeção do pico de atividade foi de 635,5 U.S. no tempo 71,5 horas e umidade em torno de 9,7 (106,9 % de umidade).

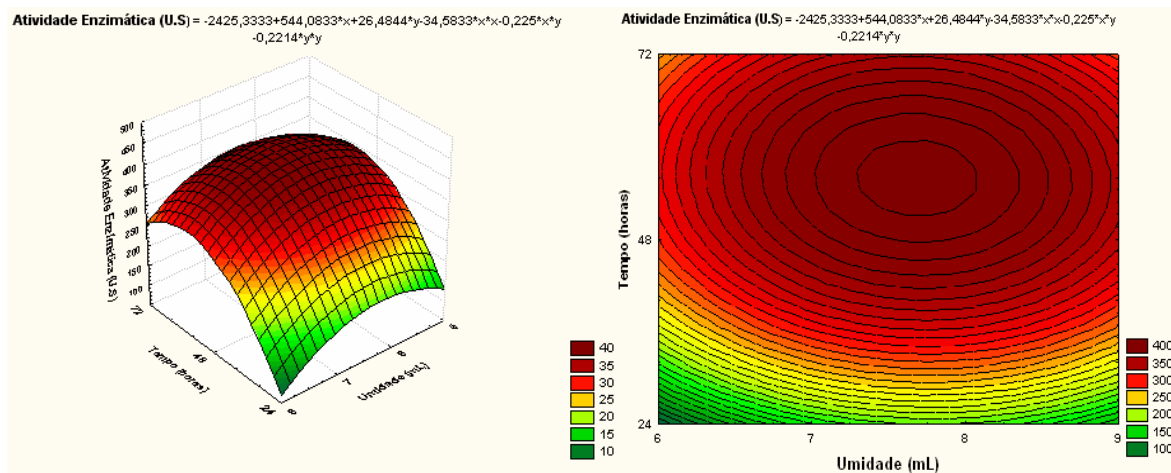


Figura 18: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

A figura 18 exibe um típico gráfico em superfície de resposta, onde se pode verificar que as maiores atividades enzimáticas são encontradas entre 48 e 72 horas de cultivo. A máxima atividade enzimática projetada é de 405,6 U.S. em 56 horas de cultivo quando a umidade encontrava-se no em torno de 84,8 % (7,7 mL)

3.7 Fermentações utilizando farelos de trigo e arroz sem suplementação de caseína: análises estatísticas das interações entre tempo, mistura de farelos e umidade.

Para a análise dos resultados foi utilizado o modelo do tipo fatorial para a atividade enzimática considerando como fatores de variação: mistura de meios (4), umidade (5) e tempo (3). A análise da variância do modelo foi feita utilizando-se o Sistema Estatístico SAS System 6.12 pelo Teste de Tukey e os gráficos foram plotados utilizando-se os “softwares” Origin Graphics 5.0. e Statistica 6.

Como mencionado, nesta análise estatística foram avaliados 3 (três) fatores de variação (mistura de meios, umidade e tempo de cultivo), sendo que cada fator possuía vários níveis detalhados abaixo:

Mistura de meios (4 níveis):

1 : 8 e 2 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

2 : 6 e 4 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

3 : 4 e 6 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

4 : 2 e 8 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente

Umidade (4 níveis): 6, 7, 8, 9 e 10 mL de água

Tempo (3 níveis): 24, 48 e 72 horas de cultivo

Foi verificado que o teor de umidade do farelo de trigo era de 9,2 % e do farelo de arroz era de 8%. Na tabela 17 estão os valores dos teores reais de umidade.

Tabela 17: Valores percentuais reais de umidade (% de H₂O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada

		Quantidade de água adicionada (em mL)				
		6	7	8	9	10
Combinação de substratos Farelo de Trigo/Farelo de Arroz em gramas, respectivamente	8/2	68,96	78,96	88,96	98,96	108,96
	6/4	68,72	78,72	88,72	98,72	108,72
	4/6	68,42	78,42	88,42	98,42	108,42
	2/8	68,24	78,24	88,24	98,24	108,24

Tabela 18: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática, considerando como fatores de variação meio(4), Umidade(5) e tempo(3) e interações.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Pr. > F
Meio	3	35315,400	11771,800	2,26	0,0910
Umidade	4	1216416,133	304104,033	58,30	0,0001
Meio x Umidade	12	399010,600	33250,883	6,37	0,0001
Tempo	2	7845574,200	3922787,100	752	0,0001
Meio x Tempo	6	255342,400	42557,066	9,63	0,0001
Umidade x Tempo	8	401940,466	50242,558	8,16	0,0001
Meio x Umidade x Tempo	24	187958,600	7831,608	1,5	0,1034
Resíduo	60				
Total	119				

$R^2 = 0,97$; CV = 10,89

A análise da Tabela 18 permite concluir que, ao nível de 5% de significância, não há diferenças significativas entre as médias de atividades enzimáticas para o fator meio de cultivo e para a interação meio x umidade x tempo. Para os outros fatores (umidade e tempo de cultivo) e interações (meio x umidade, meio x tempo, umidade x tempo e meio umidade e tempo) há pelo menos uma ou mais médias que se diferem, porém, onde havia o fator meio de cultivo, pode-se inferir que este fator não contribuiu significativamente para que as médias diferissem.

3.7.1 Mistura de meios de cultivo

A Tabela 19 e a Figura 19 mostram que não houve diferenças significativas nas médias de atividade enzimática avaliando-se o tipo de meio de cultivo, pois todos eles pertencem ao mesmo grupo de Tukey (A), embora o meio do tipo 3 tenha uma discreta média acima dos outros tipos de meios.

Tabela 19: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Meio
A	688,37	30	3
A	668,87	30	4
A	653,70	30	2
A	642,67	30	1

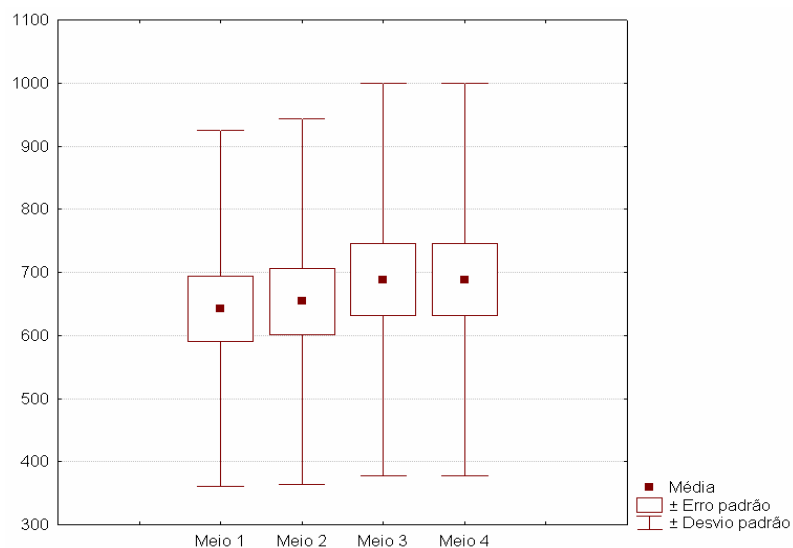


Figura 19: Box Plot das atividades enzimáticas levando-se em consideração o tipo de meio de cultivo

3.7.2 Umidade

Através da Tabela 20 e Figura 20 observa-se que a média de atividade enzimática mais elevada (789,96 U.S.) foi obtida quando se utilizou 9 mL de água (grupo de Tukey A). Quantidades acima de 9 e 8 mL de água não foram estatisticamente significativas e a média de atividade mais baixa (521,75 U.S.) foi obtida quando se utilizou 6 mL de água.

Tabela 20: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência da umidade

Grupo de Tukey	Média	N	Umidade (mL)
A	789,96	24	9
B	731,04	24	10
B	702,88	24	8
C	571,38	24	7
C	521,75	24	6

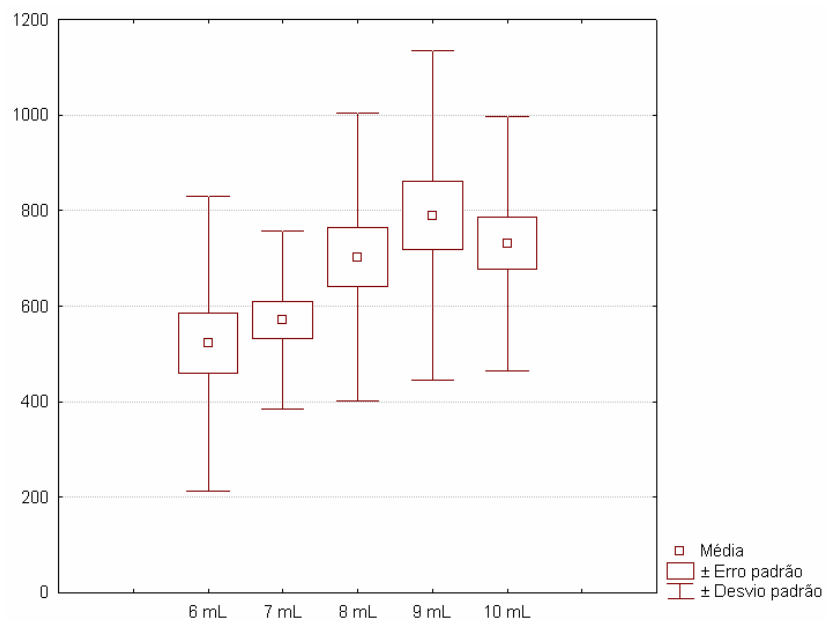


Figura 20: Box Plot das atividades enzimáticas de acordo com a quantidade de água utilizada.

Geralmente, umidades muito baixas podem dificultar o crescimento do fungo, pois dificulta a obtenção de água necessária aos processos metabólicos básicos, tanto para a colonização quanto para a produção de metabólitos e, neste caso, pode-se inferir esta informação quanto à síntese de renina. Por outro lado, quando o substrato encontra-se muito úmido, pode ocorrer o fenômeno de “empacotamento” do substrato, principalmente do farelo de arroz que possui uma granulometria menor em relação ao farelo de trigo. Este empacotamento pode dificultar o crescimento intra e inter partículas do substrato pelo micélio ocasionando uma diminuição da área a ser colonizada, que propicia um déficit na aeração no interior do substrato, menor crescimento micelial e, como causa direta, diminuição da síntese de renina.

3.7.3 Tempo de Cultivo

No período de 24 horas de cultivo observou-se uma intensa colonização do micélio no substrato e, neste ponto, observou-se uma baixa atividade enzimática. Após este período, as médias das atividades enzimáticas foram bastante superiores, como observado na Tabela 21 e Figura 21, mas não há diferenças estatísticas destas médias entre 48 e 72 horas. Em observações preliminares, as diferenças entre as atividades após 72 horas não foram significativas e, por este motivo, limitou-se o cultivo até 72 horas.

Tabela 21: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Tempo de cultivo
A	853,35	40	72
A	834,90	40	48
B	301,95	40	24

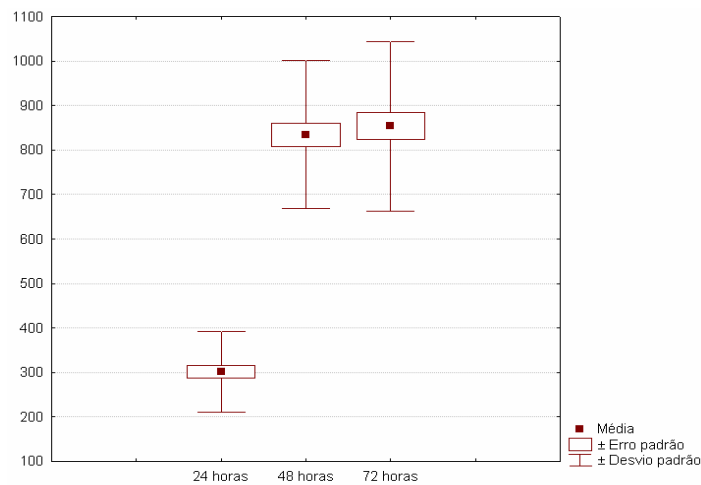


Figura 21: Plotagem das médias das atividades enzimáticas durante 72 horas de cultivo.

3.7.4 Análise das interações significativas

Como as médias das atividades enzimáticas não foram significativas para o fator meio de cultivo, resolveu-se utilizá-lo como parâmetro para comparação das interações significativas.

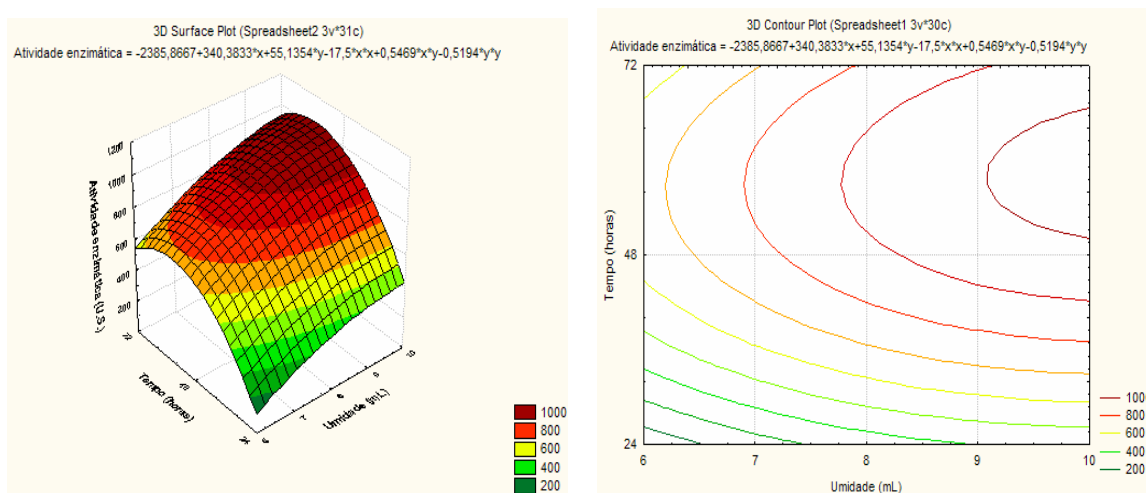


Figura 22: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

Através da Figura 22, para o meio de cultivo 1, observou-se que as atividades enzimáticas mais altas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo e entre 98,96 e 108,96 % de umidade (9 e 10 mL). Para uma análise mais completa foi utilizado o software SAS System que faz uma projeção dos valores. Segundo este programa, o ponto estacionário é do tipo máximo cuja projeção da atividade enzimática máxima é de 1043 U.S. em 58,7 horas de cultivo e umidade em torno de 115, 50 % (10,6 mL).

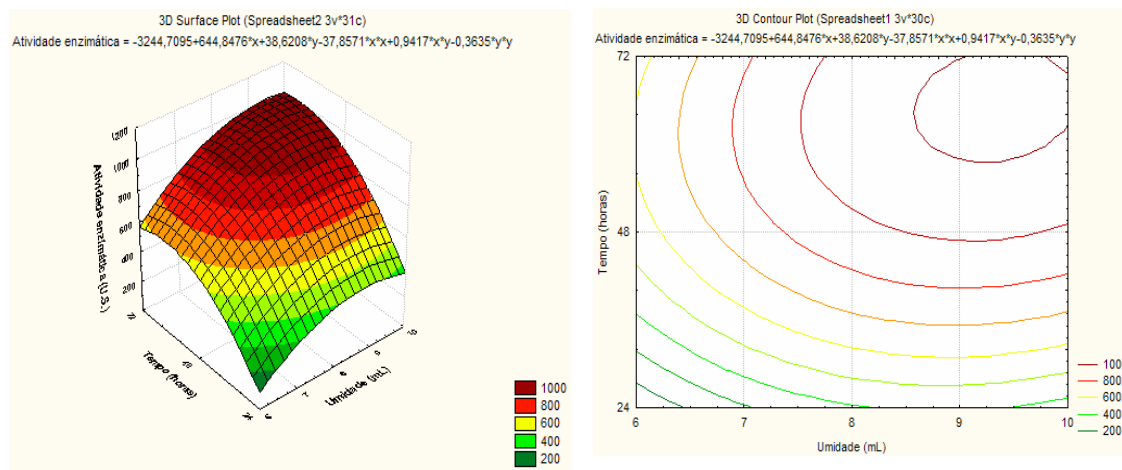


Figura 23: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

A Figura 23 mostra que as maiores atividades enzimáticas foram observadas, novamente após 48 horas de cultivo e umidades entre 98,72 e 108,72% (9 e 10 mL). O ponto estacionário é do tipo máximo com atividade enzimática estimada em 1022 U.S. em 65,2 horas e umidade em torno de 102% (9,3 mL).

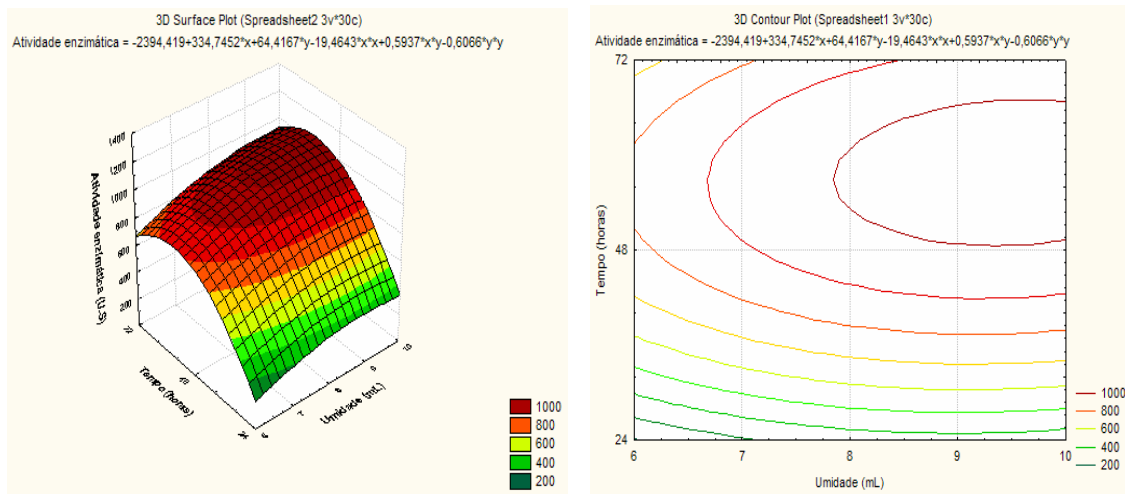


Figura 24: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

Observa-se, na Figura 24 para o meio de cultivo 3, que as atividades enzimáticas mais altas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo e umidades entre 88,42 e 108,42% (8 e 10 mL). A projeção da máxima atividade enzimática é de 1052 U.S. em 57,7 horas de cultivo e 103 % de umidade(9,5 mL).

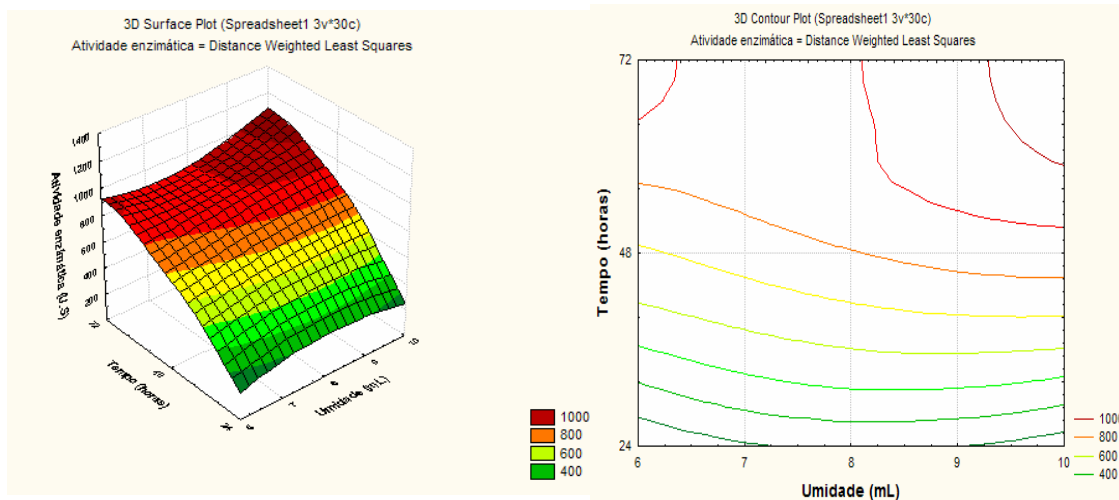


Figura 25: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

A figura 25 evidencia um comportamento atípico em comparação aos meios anteriores. Embora as atividades mais altas estivessem entre 24 e 48 horas de cultivo e umidades em torno de 98,24 e 108,24% (9 e 10 mL), a projeção da atividade mais alta não pode ser obtida pois estava situada na depressão do ponto estacionário cujo gráfico era em ponto de sela. Isto foi causado, provavelmente, pelos baixos valores de atividades enzimáticas próximo de 78,24 % de umidade (7 mL). Foram feitas várias repetições, mas sempre este comportamento foi observado.

3.8 Fermentações utilizando farelos de trigo e arroz com suplementação de caseína: análises estatísticas das interações entre tempo, mistura de farelos e umidade.

Para a análise dos resultados foi utilizado o modelo do tipo fatorial para a atividade enzimática considerando como fatores de variação mistura de meios (4), umidade (5) e tempo (3).

Nesta análise estatística foram avaliados 3 fatores de variação (mistura de meios, umidade e tempo de cultivo), sendo que cada fator possuía vários níveis detalhados abaixo:

Mistura de meios (4 níveis):

1 : 8 e 2 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

2 : 6 e 4 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

3 : 4 e 6 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente.

4 : 2 e 8 gramas de farelos de trigo e arroz, respectivamente

Umidade (5 níveis): 6, 7, 8, 9 e 10 mL de água

Tempo (3 níveis): 24, 48 e 72 horas de cultivo

Suplementação de caseína: 2 gramas

O teor de umidade verificado do farelo de trigo é de 9,2 %, o do farelo de arroz é de 8 % e da caseína é 10 %. Na tabela 22 estão listados os reais teores de umidade levando-se em consideração a combinação de substratos e a quantidade de água adicionada.

Tabela 22: Valores percentuais reais de umidade (% de H₂O) considerando o tipo de meio de cultivo e a quantidade de água adicionada

		Quantidade de água adicionada (em mL)				
		6	7	8	9	10
Combinação de substratos Farelo de Trigo/Farelo de Arroz + caseína em gramas, respectivamente	8/2	70,96	80,96%	90,96%	100,96	110,96
	6/4	70,72	80,72	90,72	100,72	110,72
	4/6	70,42	80,42	90,42	100,42	110,42
	2/8	70,24	80,24	90,24	100,24	110,24

Tabela 23: Análise da variância do modelo fatorial para a atividade enzimática, considerando como fatores de variação meio(4), Umidade(5) e tempo(3) e interações.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Pr, > F
Meio	3	177661,892	59220,630	6,37	0,0008
Umidade	4	2719411,133	679852,783	73,13	0,0001
Meio x Umidade	12	491377,066	40948,089	4,40	0,0001
Tempo	2	8961345,266	4480672,633	481,98	0,0001
Meio x Tempo	6	146360,533	24393,422	2,62	0,0252
Umidade x Tempo	8	1785419,816	223177,477	24,01	0,0001
Meio x Umidade x Tempo	24	606235,383	25259,807	2,72	0,0009
Resíduo	60				
Total	119				

$R^2 = 0,96$; CV = 11,74

A análise da Tabela 23 permite concluir, ao nível de 5% de significância, que todos os fatores e interações tiveram diferenças significativas.

3.8.1 Mistura de meios de cultivo

A Tabela 24 e Figura 26 evidenciam que os meios de cultivo 3, 2 e 4 pertencem ao mesmo grupo de Tukey (A), portanto, não há diferenças significativas entre as médias das atividades enzimáticas, embora pode-se observar que no meio 3 houve um discreto aumento na atividade enzimática em relação aos demais. As menores atividades enzimáticas (< 800 U.S.) foram observadas no meio tipo 1 que foi categorizado como grupo de Tukey B, portanto, há uma diferença significativa para as médias das atividades enzimáticas.

Tabela 24: Teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tipo de meio de cultivo.

Grupo de Tukey	Média	N	Meio
A	867,83	30	3
A	830,37	30	2
A	824,6	30	4
B	760,77	30	1

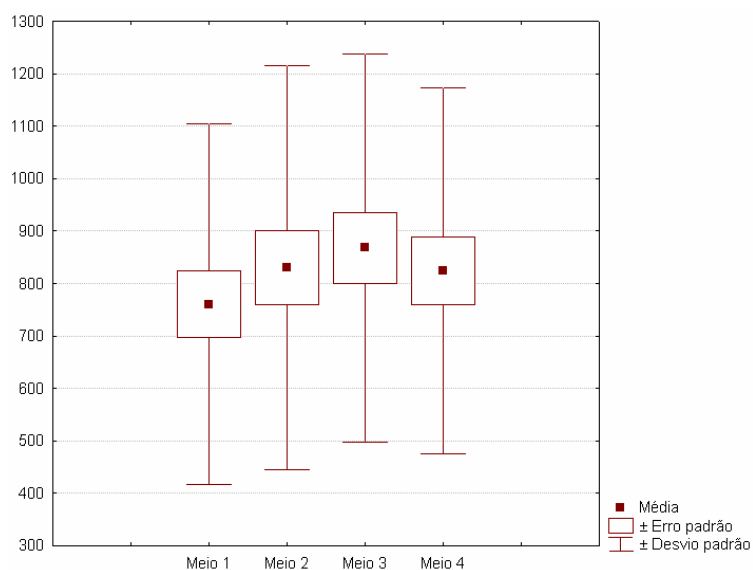


Figura 26: Box Plot das atividades enzimáticas para o tipo de meio de cultivo

3.8.2 Umidade

Através da Tabela 25 e Figura 27 pode-se verificar que as atividades mais altas foram obtidas utilizando-se 9 mL de água (983,58 U.S), não havendo diferenças significativas quando se utilizou 9 e 7 mL de água. As mais baixas atividades foram obtidas com a utilização de 6 mL de água.

Tabela 25: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência da umidade

Grupo de Tukey	Média	N	Umidade (mL)
A	983,58	24	9
A	925,83	24	7
C	856,58	24	8
C	788,71	24	10
D	549,75	24	6

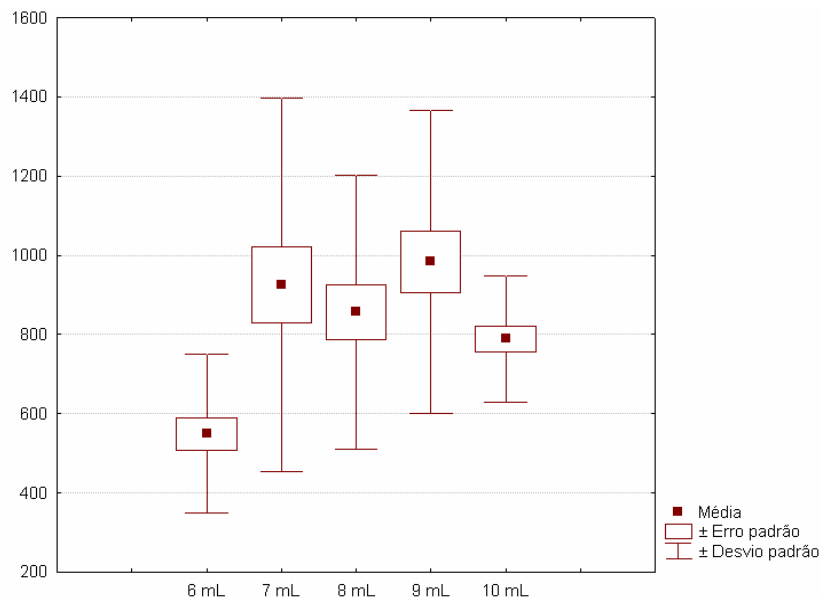


Figura 27: Box Plot das atividades enzimáticas de acordo com a quantidade de água utilizada

3.8.3 Tempo de Cultivo

Observou-se o mesmo comportamento quando se comparou os experimentos com ausência de caseína. No período de 24 horas de cultivo houve uma intensa colonização do micélio no substrato, mas com baixa atividade enzimática. Após este

período, houve um incremento das médias das atividades enzimáticas, como observado na Tabela 26 e Figura 28, mas não há diferenças estatísticas destas médias entre 48 e 72 horas.

Tabela 26: teste de Tukey para as médias das atividades enzimáticas a 5% de significância verificando-se a influência do tempo de cultivo

Grupo de Tukey	Média	N	Tempo de cultivo
A	1037,68	40	72
A	989,58	40	48
B	435,43	40	24

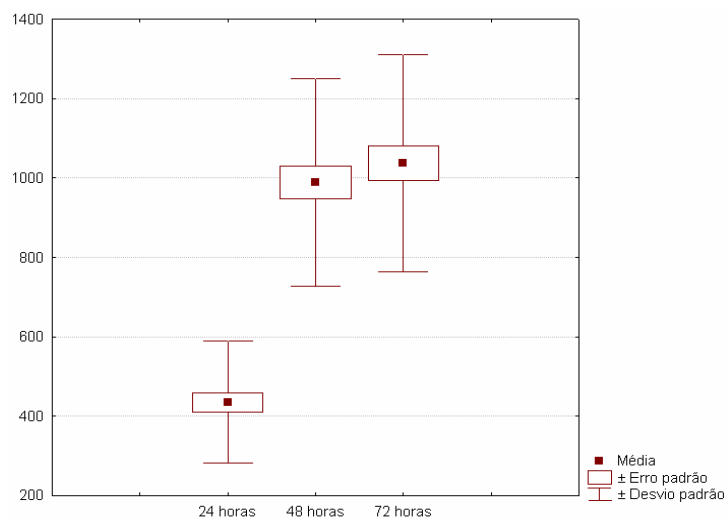


Figura 28: Box plot das atividades enzimáticas durante as 72 horas de cultivo.

3.8.4 Análise das interações significativas

Como todos os fatores e interações foram estatisticamente significativas, as análises das interações significativas foram realizadas utilizando o tipo de meio como fator de comparação do mesmo modo com os experimentos utilizando-se caseína.

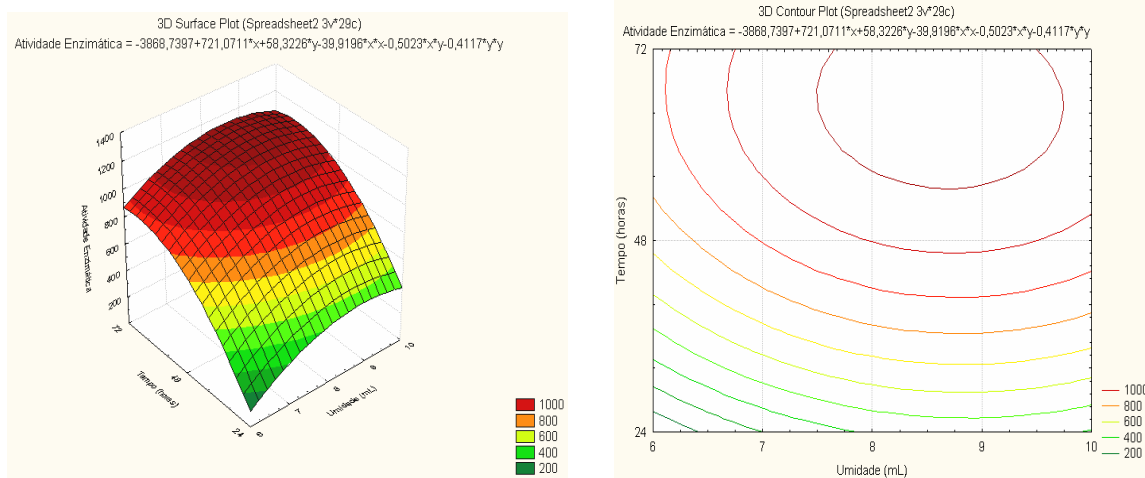


Figura 29: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 1 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

Analisando-se a Figura 29, pode-se verificar que, para o meio 1, a máxima produção de renina foi observada entre 48 e 72 horas de cultivo e umidades na faixa de 90,96 a 110,96 % (8 a 10 mL). O ponto estacionário é máximo com valor projetado de 1143,4 U.S. nos valores de 96,65 % de umidade (8,5 mL) e 64,7 horas de cultivo.

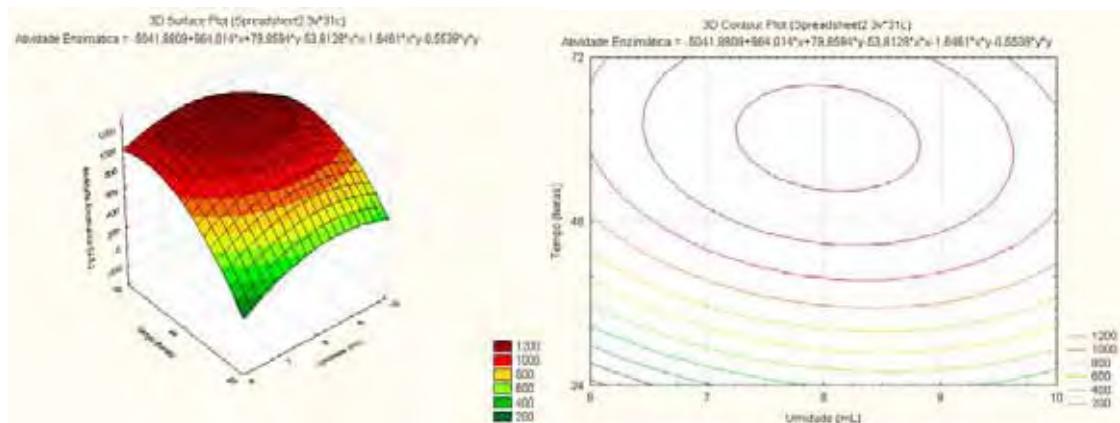


Figura 30: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 2 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

A figura 30 evidencia que as maiores atividades enzimáticas foram observadas após as 48 horas de cultivo com umidades na faixa de 80,72 a 100,72 % de água (7 a 9 mL). Valores de umidade menores que 70,72% (6 mL) e maiores que 100,72 % (9 mL) foram desfavoráveis pois nestes intervalos as atividades enzimáticas eram menores. Isto pode acontecer devido à baixa quantidade de água no sistema (umidade < 70,72%) ou por umidades acima de 100,72 % (9 mL) podem ser desfavoráveis pois permitem o “empacotamento” do substrato e pode ser um efeito limitante para que o micélio se desenvolva, metabolize o substrato e sintetize a enzima. O máximo valor de atividade enzimática no ponto estacionário é de 1233,7 U.S. com valor de umidade projetado para umidade em torno de 90,72 % (8 mL) de água em 60,1 horas de cultivo.

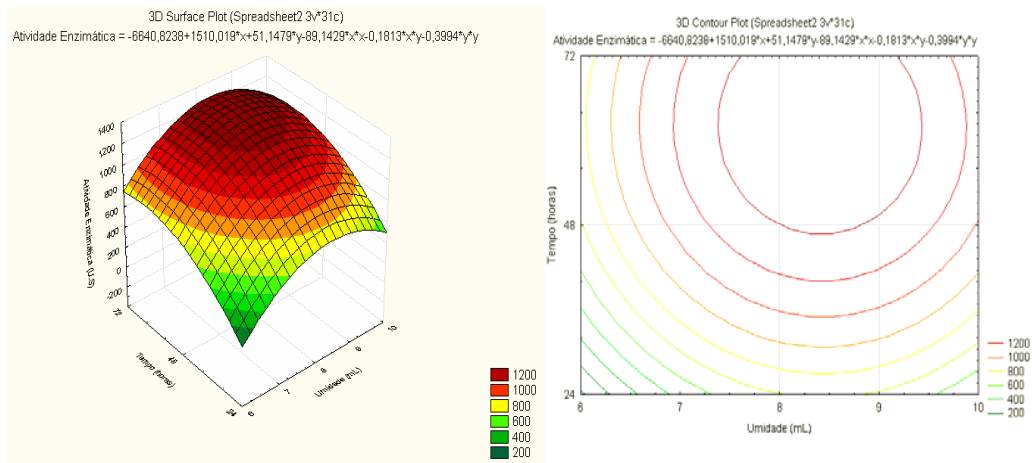


Figura 31: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 3 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

Na figura 31 observa-se que a maior formação do produto ocorre entre 48 e 72 de cultivo no intervalo de umidade entre 90,42 e 100,42 % (8 e 9 mL). Abaixo de 80,42 % de umidade (7 mL) houve um decréscimo da atividade enzimática e acima de 100,42 % (9 mL) nota-se uma fraca tendência ao decréscimo da atividade enzimática. Segundo a projeção, a atividade enzimática máxima foi de 1294,9 U.S. no tempo de 62,1 horas de cultivo e umidade em torno de 94,94 % (8,4 mL de água).

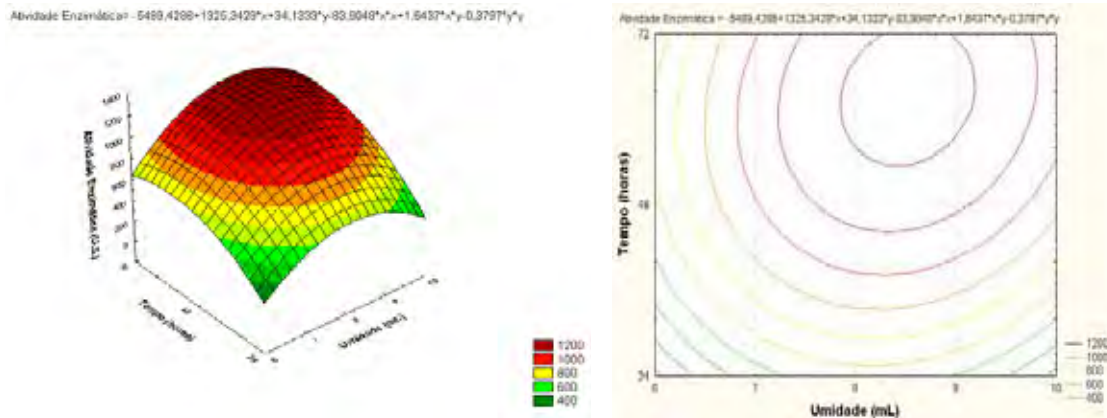


Figura 32: Superfície de resposta e contorno das atividades enzimáticas para o meio de cultivo tipo 4 considerando a influência da interação entre os fatores umidade e tempo de cultivo.

A figura 32 mostra que as atividades enzimáticas mais elevadas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo quando a faixa de umidade estava entre 90,24 e 100,24 % (8 e 9 mL de água). Valores de umidade abaixo de 80,24 % (7 mL) prejudicam a síntese de renina. O valor projetado para máxima atividade enzimática no ponto estacionário foi de 1237,6 quando a umidade era de 95,88 (8,5 mL) em 63,4 horas.

3.9 Comparação das atividades enzimáticas entre as combinações farelos de trigo/aveia e trigo/arroz sem e com suplementação de caseína.

Com a finalidade de se observar quais dentre os meios contendo farelos de trigo e aveia e farelos de trigo e arroz com e sem suplementação de caseína exibiram as maiores atividades enzimáticas, foi feito uma análise estatística descritiva destes experimentos (tabela 27) e, para uma melhor visualização destes resultados, os dados foram plotados em gráfico tipo Box Plot (Figura 33) onde se pode notar que o meio contendo farelos de trigo e aveia forneceu as menores atividades enzimáticas. Quando se

comparou a influência da caseína nos meios contendo farelos de trigo e arroz, houve um sensível aumento nas atividades enzimáticas com esta suplementação, comprovando que a caseína é um importante fator na síntese de renina tanto em fermentação submersa e em estado sólido. Este fato corrobora os trabalhos de Thakur *et al.* (1990) e Fernandez-Lahore *et al.* (1998).

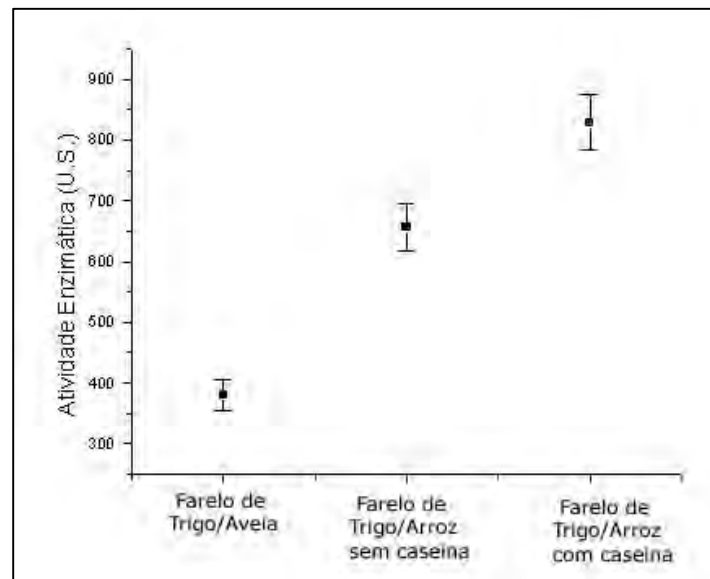


Figura 33: Comparação em Box Plot de todas as atividades enzimáticas através de média e mediana para meios com farelos de trigo/aveia e farelos de trigo/arroz com e sem suplementação de caseína

Em todos os experimentos realizados, as maiores atividades enzimáticas foram observadas nos meios contendo farelos de trigo e arroz com suplementação de caseína após 48 horas de cultivo quando o teor de umidade encontrava-se entre 80 e 101 % (entre 7 a 9 mL de água). Estes valores são superiores aos observados por Preetha e Boopathy (1994) no qual o valor máximo de atividade enzimática foi de 1210 U.S. após 120 horas de cultivo e umidade em torno de 1:0,6 p/v de farelo de trigo e água respectivamente.

Tabela 27: Análise estatística descritiva de todas as atividades enzimáticas nos meios com farelos de trigo/aveia e farelos de trigo/arroz com e sem suplementação de caseína, considerando todas as unidades utilizadas e tempos de cultivo de 24 a 72 horas.

Variável	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão
Farelo de Trigo/Arroz Sem Caseína	656,7	104	1122	293,5
Farelo de Trigo/Arroz Com Caseína	828,6	200	1506	360,3
Farelo de Trigo/Aveia	380,1	91,5	775	352,3

4. CONCLUSÕES

Caseína é um importante fator na potencialização da síntese de renina tanto em fermentação submersa quanto em Fermentação em Estado Sólido, porém, quantidades maiores que 20% parecem reprimir a síntese enzimática.

Farelo de laranja como única fonte de nutrientes não permitiu a germinação dos esporos ou o crescimento evidenciado do fungo devido, provavelmente, à inabilidade da degradação deste substrato ou à presença de algum fator inibidor ou tóxico. Quando houve a combinação de farelos de trigo e laranja o aumento da atividade enzimática foi diretamente proporcional ao aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura. Foi observado que a inclusão de 2 gramas de caseína favorecia sensivelmente o aumento da atividade enzimática e a granulometria do farelo de laranja provavelmente foi um fator positivo neste aspecto pois, aparentemente, permitiu uma maior aeração do substrato e conseqüentemente uma maior colonização do substrato pelo micélio do fungo.

Não foi observado crescimento evidenciado de *Mucor miehei* nos experimentos utilizando casca de café, mesmo quando foram realizados testes com inclusão de

caseína, podendo-se inferir que este resíduo agroindustrial pode ter efeitos tóxicos sobre o fungo devido à presença de taninos e polifenóis.

As análises estatísticas da influencia das interações entre umidade, tempo de cultivo e combinação de substratos sobre a síntese de renina utilizando-se o modelo do tipo fatorial foram de fundamental importância na interpretação dos resultados.

Nos experimentos com farelos de trigo e aveia as maiores atividades enzimáticas foram observadas entre 48 e 72 horas de cultivo, umidade acima de 79% (> 7 mL de água) e o aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura foi favorável no que diz respeito ao aumento desta atividade.

Nos experimentos com farelos de trigo e arroz sem suplementação de caseína, segundo o teste de Tukey, em todas as combinações de meio de cultivo foram observadas influências estatisticamente significativas sobre a atividade enzimática. Umidades acima de 98% (> 9 mL de água) parecem inibir o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a síntese enzimática que aumentou após 48 horas de cultivo.

Quando houve a suplementação de caseína nos experimentos com farelos de trigo e arroz, houve um sensível incremento nas atividades enzimáticas. Os meios 2, 3 e 4 não forneceram influência estatisticamente importantes segundo o teste de Tukey e as menores atividades foram observadas no meio tipo 1. Umidades abaixo de 80% (7 mL) e acima de 100% (9 mL) forneceram baixas atividades enzimáticas. Assim como nos experimentos anteriores, as maiores atividades foram observadas após 48 horas de cultivo.

Analisando-se todos os experimentos, verifica-se que as maiores atividades enzimáticas foram superiores e obtidas em menor tempo de cultivo comparadas com àquelas relatadas por outros pesquisadores.

5. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITRUS – ABECITRUS.

Diponível em: <www.abecitrus.com.br>. Acesso em : 10 ago. de 2002.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pussilus* var. Lindt. **Methods in Enzymology**, New York, v.19, p. 446-460, 1970.

AUNSTRUP, K. U.S. Patent 3,988,207 assigned to Novo Terapeutik Lab. A/S. Denmark, 1976.

BAILEY, M. J., SIIKA-AHO, M.. Production of microbial rennin. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n.3, 1988.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2. ed. New York. 1986.

BEYENAL, H *et al.* The effect of D-glucose on milk clotting activity of *Mucor miehei* in a chemostat with biomass retention. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 74, n. 6, p. 527-532, 1999.

BUDTZ, P. Microbial rennets for cheese making. **Dairy Industries International**, v 54 n. 5 p. 15-19, 1989.

BURRINGTON, D. IDF article. FMD tightens supply of animal rennet, sending prices soaring . Disponível em <www.cheesemarketnews.com/articlearch/topstories.html>. Acesso em : 08 abr. 2001.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido p. 247-276 In: SCHMIDELL, W. *et. al.* Biotecnologia Industrial, v. 2, São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2.

DOELLE, H. R.; MITCHELL, D. A.; ROLS, C. **Solid substrate cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992. 466p.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease . **Enzyme Microb. Technol.**, Atlanta, v. 15, p. 1009-1013, 1993.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. Synthesis of Acid Protease from *Mucor miehei* : Integration of Production and Recovery. **Process Bioch.**, Oxford, v. 30. n.8, p. 695-700, 1995.

FERNADEZ-LAHOURE, H.; FRAILE, E.; CASCONO, O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 83-93, 1998.

FOGARTY, W.M. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, New York; London: Elsevier Science Publisher, 1990. 472p.

FOX, P.F. **Food Enzymology**. New York; London: Elsevier Science Publisher, 1991.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: a alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Bioresource Technology**, Orlando v. 39, p. 93-95, 1992.

GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. New York, John Wiley, 1981.

HART, H. E., *et al.* Orange finisher pupl as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Food Science**, Chicago v. 56, n. 2, p. 480-483, 1991.

HÖLKER, U.; Höfer, M.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Orlando v. 64, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; Lenz, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford v. 8, p. 301-306, 2005.

ISMAIL, A. M. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 645-650.

LASURE, L.L. Regulation of extracellular acid protease in *Mucor miehei*. *Mycol.*, Albuquerque, n.72, p. 483-493 1980.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus auranticus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 949-954, 2002.

MAHMOOD, A. U., GREENMAN, J., SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: Analysis na use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 22, p. 130-137, 1998.

NEELAKANTAN, S., MOHANTY, A.K., KAUSHIK, J.K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, 1999.

PANDEY, A *et al.* Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore, v. 77 n. 1, 1999.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry.**, Oxford, v. 35, p. 1153-1169, 2000a.

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 74, p. 69-80, 2000b.

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Manchester, v. 6 p. 153-162, 2000c.

PREETHA, S., BOOPATHY, R. Influence of culture conditions on the production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Dordrecht, v.10, p.527-530. 1994.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul : EDUNISC, 1998.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electron. J. Biotechnol.** v. 1 n. 3, p. 26-27, 1998.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3. ed. San Diego: Academic, 1993.

REPELIUS, K. Coagulants produced by fermentation technology. **The Australian Journal of Dairy Technology**. Wrentham v. 53, 1998.

RIBEIRO, E. P. Queijos. p. 225-253 In: SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotechnologia Industrial**, São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 4, p. 225-253.

ROSE, A. H. Economic Microbiology. In: ROSE, A. H. **Microbial Enzymes and Bioconversion**. London: Academic Press, 1980. v.5.

SCRIBAN, R. (Ed.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole Ltda, 1985. 489p.

SEKER, S.; BEYENAL, H.; TANIOLAÇ, A. Modeling Milk Cotting Activity in the Continuous Production of Microbial Rennet from *Mucor miehei*. **Journal of Food Science**. Chicago, v.64, n. 3, p. 525-529, 1999.

SEKER, S.; BEYENAL, H.; TANIOLAÇ, A. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**. Atlanta, v.23, p. 469-474, 1998.

SILVEIRA, G. G.; CONTIERO, J. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in Batch Fermentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v.13, suppl. 1, p. S38, 2001.

SILVEIRA, G. G.; OLIVEIRA, G. M.; RIBEIRO, E. J.; CONTIERO, J. Utilization of Solid State and Submerged Fermentation for production of microbial rennin from zygomycete *Mucor miehei*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001 Foz do Iguaçu, Anais, p. 327.

SILVEIRA, G. G.; OLIVEIRA, G. M.; RIBEIRO, E. J.; CONTIERO, J. Production of microbial rennin from zygomycete *Mucor miehei* by solid state and submerged liquid fermentation. In: **Annual Meeting of Society for Industrial Microbiology** (Abstracts), Philadelphia, p. 92, 2002.

SILVEIRA, G. G.; OLIVEIRA, G. M.; RIBEIRO, E. J.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 931-937, 2005.

SPREER, E. **Lactologia industrial; leche, preparacion y elaboracion, maquinas, Instalaciones y aparatos, productos lacteos.** Zaragoza: Acribia, 1975.

SRILATHA, H. R. *et al.*. Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 327-331, 1995.

STREETS, B. W.; INGLE, M. B. The effect of temperature on spore germination and growth of *Mucor miehei* in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 18, 1972.

THAKUR M.S.; KARANTH, N.G.; NAND, K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v.32, p.409-413, 1990.

USTUNOL, Z.; ZECKER, T. Relative Proteolytic Action of Milk Clotting Enzyme Preparations on Bovine α -, β -, κ - casein. **Journal of Food Science**. Chicago, v.61, n. 6, 1996.

ANEXOS

Saída de dados das análises estatísticas completas para os experimentos com farelos de aveia e trigo realizado pelo SAS System

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Meio	4	1 2 3 4
Umidade	4	6 7 8 9
Tempo	3	24 48 72

Number of Observations Read 96
 Number of Observations Used 96

The GLM Procedure

Dependent Variable: Resp

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr >
Model	47	3119940.333	66381.709	19.48	<.0001
Error	48	163601.000	3408.354		
Corrected Total	95	3283541.333			

R-Square 0.950175
 Coeff Var 15.44814
 Root MSE 58.38111
 Resp Mean 377.9167

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >
Meio	3	527713.583	175904.528	51.61	<.0001
Umidade	3	656488.500	218829.500	64.20	<.0001
Meio*Umidade	9	115506.583	12834.065	3.77	0.0012

	Tempo	2	1453723.896	726861.948	213.26
<.0001					
	Meio*Tempo	6	46025.604	7670.934	2.25
0.0540					
	Umidad*Tempo	6	166183.687	27697.281	8.13
<.0001					
	Meio*Umidad*Tempo	18	154298.479	8572.138	2.52
0.0056					

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Resp

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	3408.354
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	44.853

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Meio
A	466.79	24	1
B	403.42	24	2
B	379.46	24	3
C	262.00	24	4

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Resp

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	3408.354
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	44.853

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Umidad
A	461.96	24	9
B	416.29	24	7
B	391.96	24	8
C	241.46	24	6

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Resp

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	3408.354
Critical Value of Studentized Range	3.42026
Minimum Significant Difference	35.299

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Tempo
A	467.09	32	48
A	462.75	32	72
B	203.91	32	24

Saída de dados das análises estatísticas de superfície para os experimentos com farelos de aveia e trigo realizado pelo SAS System

The RSREG Procedure

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
Umidade	7.500000	1.500000
Tempo	48.000000	24.000000

Response Surface for Variable resp

Response Mean	466.791667
Root MSE	108.534244
R-Square	0.7801
Coefficient of Variation	23.2511

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Pr > F
Linear	2	604627	0.6270	25.66	<.0001
Quadratic	2	130943	0.1358	5.56	0.0132
Crossproduct	1	16675	0.0173	1.42	0.2496
Total Model	5	752246	0.7801	12.77	<.0001

Residual	DF	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	18	212034	11780

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	-1986.750000	1291.245851	-1.54	0.1413	597.156250
Umidade	1	421.408333	336.426980	1.25	0.2264	130.925000
Tempo	1	21.791667	10.961235	1.99	0.0622	153.312500
Umidade*Umidade	1	-26.125000	22.154460	-1.18	0.2537	-58.781250
Tempo*Umidade	1	1.203125	1.011208	1.19	0.2496	43.312500
Tempo*Tempo	1	-0.254449	0.081592	-3.12	0.0059	-146.562500

Meio=1

The RSREG Procedure

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Umidade	3	261607	87202	7.40	0.0020
Tempo	3	507314	169105	14.36	<.0001

Meio=1

The RSREG Procedure
 Canonical Analysis of Response Surface Based on Coded Data

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
Umidade	1.381568	9.572351
Tempo	0.727170	65.452075

Predicted value at stationary point: 743.339229

Eigenvalues	Eigenvectors	
	Umidade	Tempo
-53.729254	0.973852	0.227181
-151.614496	-0.227181	0.973852

Stationary point is a maximum.

Meio=2

The RSREG Procedure

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
Umidade	7.500000	1.500000
Tempo	48.000000	24.000000

Response Surface for Variable resp

Response Mean	403.416667
Root MSE	70.666524
R-Square	0.8856
Coefficient of Variation	17.5170

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Pr > F
Linear	2	530614	0.6753	53.13	<.0001
Quadratic	2	111886	0.1424	11.20	0.0007
Crossproduct	1	53406	0.0680	10.69	0.0043
Total Model	5	695906	0.8856	27.87	<.0001

Residual	DF	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	18	89888	4993.757639

Parameter

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Estimate from Coded Data
Intercept	1	-1182.458333	840.728719	-1.41	0.1766	518.916667
Umidade	1	248.483333	219.047228	1.13	0.2715	126.500000
Tempo	1	13.020833	7.136848	1.82	0.0847	140.812500
Umidade*Umidade	1	-17.833333	14.424744	-1.24	0.2322	-40.125000
Tempo*Umidade	1	2.153125	0.658396	3.27	0.0043	77.512500
Tempo*Tempo	1	-0.242730	0.053124	-4.57	0.0002	-139.812500

Meio=2

The RSREG Procedure

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Umidade	3	274402	91467	18.32	<.0001
Tempo	3	474910	158303	31.70	<.0001

Meio=2

The RSREG Procedure

Canonical Analysis of Response Surface Based on Coded Data

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
Umidade	2.816948	11.725422
Tempo	1.284439	78.826527

Predicted value at stationary point: 787.521115

Eigenvalues	Eigenvectors	
	Umidade	Tempo
-26.830439	0.945896	0.324471
-153.107061	-0.324471	0.945896

Stationary point is a maximum.

Meio=3

The RSREG Procedure

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
Umidade	7.500000	1.500000
Tempo	48.000000	24.000000

Response Surface for Variable resp

Response Mean 379.458333
 Root MSE 83.953000
 R-Square 0.8219
 Coefficient of Variation 22.1244

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Pr > F
Linear	2	448298	0.6293	31.80	<.0001
Quadratic	2	94918	0.1332	6.73	0.0066
Crossproduct	1	42274	0.0593	6.00	0.0248
Total Model	5	585490	0.8219	16.61	<.0001

Residual	DF	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	18	126866	7048.106250

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	-1573.166667	998.799632	-1.58	0.1327	493.114583
Umidade	1	371.141667	260.231732	1.43	0.1709	103.075000
Tempo	1	11.598958	8.478693	1.37	0.1881	138.437500
Umidade*Umidade	1	-26.291667	17.136834	-1.53	0.1424	-59.156250
Tempo*Umidade	1	1.915625	0.782186	2.45	0.0248	68.962500
Tempo*Tempo	1	-0.210395	0.063112	-3.33	0.0037	-121.187500

Meio=3

The RSREG Procedure

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Umidade	3	200523	66841	9.48	0.0006
Tempo	3	427241	142414	20.21	<.0001

Meio=3

The RSREG Procedure

Canonical Analysis of Response Surface Based on Coded Data

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded

Umidade	1.443543	9.665315
Tempo	0.981899	71.565586

Predicted value at stationary point: 635.477054

Eigenvalues	Eigenvectors	
	Umidade	Tempo
-43.793803	0.913443	0.406967
-136.549947	-0.406967	0.913443

Stationary point is a maximum.

Meio=4

The RSREG Procedure

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
Umidade	7.500000	1.500000
Tempo	48.000000	24.000000

Response Surface for Variable resp

Response Mean	262.000000
Root MSE	55.344301
R-Square	0.8121
Coefficient of Variation	21.1238

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Pr > F
Linear	2	122277	0.4168	19.96	<.0001
Quadratic	2	115404	0.3933	18.84	<.0001
Crossproduct	1	583.200000	0.0020	0.19	0.6678
Total Model	5	238264	0.8121	15.56	<.0001

Residual	DF	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	18	55134	3062.991667

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	-2425.333333	658.438262	-3.68	0.0017	390.229167
Umidade	1	544.083333	171.552455	3.17	0.0053	21.800000

Tempo	1	26.484375	5.589405	4.74	0.0002	85.125000
Umidade*Umidade	1	-34.583333	11.297108	-3.06	0.0067	-77.812500
Tempo*Umidade	1	-0.225000	0.515640	-0.44	0.6678	-8.100000
Tempo*Tempo	1	-0.221354	0.041606	-5.32	<.0001	-127.500000

Meio=4

The RSREG Procedure

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Umidade	3	35624	11875	3.88	0.0267
Tempo	3	203223	67741	22.12	<.0001

Meio=4

The RSREG Procedure

Canonical Analysis of Response Surface Based on Coded Data

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
Umidade	0.122909	7.684363
Tempo	0.329919	55.918065

Predicted value at stationary point: 405.611064

Eigenvalues	Eigenvectors	
	Umidade	Tempo
-77.484551	0.996738	-0.080711
-127.827949	0.080711	0.996738

Stationary point is a maximum.

Saída de dados das análises estatísticas completas para os experimentos com farelos de arroz e trigo sem caseína realizado pelo SAS System

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
MEIO	4	1 2 3 4
UMIDAD	5	60 70 80 90 100
TEMPO	3	24 48 72

Number of observations in data set = 120

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr >
Model	59	10341557.80000000	175280.64067797	33.60	0.0001
Error	60	312987.00000000	5216.45000000		
Corrected Total	119	10654544.80000000			
R-Square	C.V.	Root MSE	RESP Mean		
	0.970624	10.88710	72.22499567		
	663.40000000				

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr
MEIO	3	5315.40000000	11771.80000000	2.26	0.0910
UMIDAD	4	216416.13333333	304104.03333333	58.30	0.0001
MEIO*UMIDAD	12	99010.60000000	33250.88333333	6.37	0.0001
TEMPO	2	7845574.20000000	3922787.10000000	752.00	0.0001
MEIO*TEMPO	6	255342.40000000	42557.06666667	8.16	0.0001
UMIDAD*TEMPO	8	401940.46666667	50242.55833333	9.63	0.0001
MEIO*UMIDAD*TEMP	24	187958.60000000	7831.60833333	1.50	0.1034

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 5216.45
 Critical Value of Studentized Range= 3.737
 Minimum Significant Difference= 49.279

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	MEIO
A	688.37	30	3
A			
A	668.87	30	4
A			
A	653.70	30	2
A			
A	642.67	30	1

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but
 generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 5216.45
 Critical Value of Studentized Range= 3.977
 Minimum Significant Difference= 58.639

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	UMIDADE
A	789.96	24	9
B	731.04	24	10
B			
B	702.88	24	8
C	571.38	24	7
C			
C	521.75	24	6

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but
 generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 5216.45
 Critical Value of Studentized Range= 3.399
 Minimum Significant Difference= 38.812

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	853.35	40	72
A			
A	834.90	40	48
B	301.95	40	24

Saída de dados das análises estatísticas de superfície para os experimentos com farelos de arroz e trigo sem caseína realizado pelo SAS System

MEIO=1

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=1

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	642.666667
Root MSE	80.301439
R-Square	0.9329
Coef. of Variation	12.4950

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	1523555	0.6603	118.1	0.0000
Quadratic	2	622330	0.2697	48.255	0.0000
Crossproduct	1	6890.625000	0.0030	1.069	0.3116
Total Regress	5	2152775	0.9329	66.770	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	154760	6448.321181

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-2385.866667	596.227083	-4.002	0.0005
UMIDADE	1	340.383333	142.843728	2.383	0.0254
TEMPO	1	55.135417	6.733480	8.188	0.0000
UMIDADE*UMIDADE	1	-17.500000	8.761605	-1.997	0.0572
TEMPO*UMIDADE	1	0.546875	0.529032	1.034	0.3116
TEMPO*TEMPO	1	-0.519358	0.053994	-9.619	0.0000

Parameter	Parameter Estimate from Coded Data
INTERCEPT	877.100000
UMIDADE	173.266667
TEMPO	231.650000
UMIDADE*UMIDADE	-70.000000
TEMPO*UMIDADE	26.250000
TEMPO*TEMPO	-299.150000

MEIO=1

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	482936	160979	24.964	0.0000
TEMPO	3	1676730	558910	86.675	0.0000

MEIO=1

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	1.321083	10.642166
TEMPO	0.445142	58.683407

Predicted value at stationary point 1043.108405

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-69.250691	0.998374	0.056997
-299.899309	-0.056997	0.998374

Stationary point is a maximum.

The SAS System

8

MEIO=2

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=2

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	653.700000
Root MSE	71.860084
R-Square	0.9493
Coef. of Variation	10.9928

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	1885807	0.7720	182.6	0.0000
Quadratic	2	412708	0.1689	39.961	0.0000
Crossproduct	1	20430	0.0084	3.956	0.0582
Total Regress	5	2318945	0.9493	89.814	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	123933	5163.871627

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-3244.709524	533.551184	-6.081	0.0000

UMIDADE	1	644.847619	127.827873	5.045	0.0000
TEMPO	1	38.620833	6.025651	6.409	0.0000
UMIDADE*UMIDADE	1	-37.857143	7.840578	-4.828	0.0001
TEMPO*UMIDADE	1	0.941667	0.473420	1.989	0.0582
TEMPO*TEMPO	1	-0.363542	0.048318	-7.524	0.0000

Parameter Estimate
from Coded

Parameter	Data
INTERCEPT	869.014286
UMIDADE	168.666667
TEMPO	270.100000
UMIDADE*UMIDADE	-151.428571
TEMPO*UMIDADE	45.200000
TEMPO*TEMPO	-209.400000

MEIO=2

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	567543	189181	36.635	0.0000
TEMPO	3	1771833	590611	114.4	0.0000

MEIO=2

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	0.663865	9.327731
TEMPO	0.716587	65.198093

Predicted value at stationary point 1021.775378

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-143.659264	0.945679	0.325101
-217.169308	-0.325101	0.945679

Stationary point is a maximum.

MEIO=3

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=3

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	688.366667
Root MSE	131.278342
R-Square	0.8526
Coef. of Variation	19.0710

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	1538173	0.5483	44.626	0.0000
Quadratic	2	845693	0.3014	24.536	0.0000
Crossproduct	1	8122.500000	0.0029	0.471	0.4990
Total Regress	5	2391989	0.8526	27.759	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	413616	17234

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-2394.419048	974.723538	-2.457	0.0216
UMIDADE	1	334.745238	233.523682	1.433	0.1646
TEMPO	1	64.416667	11.008024	5.852	0.0000
UMIDADE*UMIDADE	1	-19.464286	14.323641	-1.359	0.1868
TEMPO*UMIDADE	1	0.593750	0.864872	0.687	0.4990
TEMPO*TEMPO	1	-0.606597	0.088271	-6.872	0.0000

Parameter	Parameter Estimate from Coded Data
INTERCEPT	960.228571

UMIDADE	103.633333
TEMPO	262.400000
UMIDADE*UMIDADE	-77.857143
TEMPO*UMIDADE	28.500000
TEMPO*TEMPO	-349.400000

MEIO=3

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	201045	67015	3.889	0.0213
TEMPO	3	2199067	733022	42.533	0.0000

MEIO=3

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	0.739784	9.479569
TEMPO	0.405672	57.736137

Predicted value at stationary point 1051.785947

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-77.111381	0.998633	0.052263
-350.145762	-0.052263	0.998633

Stationary point is a maximum.

MEIO=4

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=4

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	668.866667
Root MSE	144.499941
R-Square	0.8364
Coef. of Variation	21.6037

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	2355437	0.7689	56.404	0.0000
Quadratic	2	195055	0.0637	4.671	0.0194
Crossproduct	1	11594	0.0038	0.555	0.4634
Total Regress	5	2562086	0.8364	24.541	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	501126	20880

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-556.223810	1072.892083	-0.518	0.6089
UMIDADE	1	-3.680952	257.042843	-0.0143	0.9887
TEMPO	1	36.943750	12.116688	3.049	0.0055
UMIDADE*UMIDADE	1	0.107143	15.766236	0.0068	0.9946
TEMPO*UMIDADE	1	0.709375	0.951977	0.745	0.4634
TEMPO*TEMPO	1	-0.296962	0.097161	-3.056	0.0054

Parameter	Parameter Estimate from Coded Data
INTERCEPT	782.685714
UMIDADE	64.166667
TEMPO	338.650000
UMIDADE*UMIDADE	0.428571
TEMPO*UMIDADE	34.050000
TEMPO*TEMPO	-171.050000

MEIO=4

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	73355	24452	1.171	0.3414
TEMPO	3	2500324	833441	39.915	0.0000

The SAS System 19

MEIO=4

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	-23.049520	-38.099040
TEMPO	-1.304257	16.697843

Predicted value at stationary point -177.662962

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
2.102533	0.995201	0.097852
-172.723961	-0.097852	0.995201

Stationary point is a saddle point.

Saída de dados das análises estatísticas completas para os experimentos com farelos de arroz e trigo com caseína realizado pelo SAS System

General Linear Models Procedure Class Level Information

Class	Levels	Values
MEIO	4	1 2 3 4
UMIDAD	5	60 70 80 90 100
TEMPO	3	24 48 72

Number of observations in data set = 120

Dependent Variable: RESP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	59	14887811.09166660	252335.78121469	27.14	0.0001
Error	60	557778.50000000	9296.30833333		
Corrected Total	119	15445589.59166660			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESP Mean
0.963888	11.74544	96.41736531	820.89166667

Source F	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >
MEIO 0.0008	3	177661.89166667	59220.63055556	6.37	
UMIDAD 0.0001	4	2719411.13333333	679852.78333333	73.13	
MEIO*UMIDAD 0.0001	12	491377.06666667	40948.08888889	4.40	
TEMPO 0.0001	2	8961345.26666667	4480672.63333333	481.98	
MEIO*TEMPO 0.0252	6	146360.53333333	24393.42222222	2.62	
UMIDAD*TEMPO 0.0001	8	1785419.81666667	223177.47708333	24.01	
MEIO*UMIDAD*TEMPO 0.0009	24	606235.38333333	25259.80763889	2.72	

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 9296.308
 Critical Value of Studentized Range= 3.737
 Minimum Significant Difference= 65.785

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	MEIO
A	867.83	30	3

	A			
	A	830.37	30	2
	A			
B	A	824.60	30	4
B				
B		760.77	30	1

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 9296.308
 Critical Value of Studentized Range= 3.977
 Minimum Significant Difference= 78.28

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	UMIDAD
A	983.58	24	90
A			
B	925.83	24	70
B			
B	856.58	24	80
C			
C	788.71	24	100
D	549.75	24	60

General Linear Models Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: RESP

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 60 MSE= 9296.308
 Critical Value of Studentized Range= 3.399
 Minimum Significant Difference= 51.812

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	1037.68	40	72

A			
A	989.58	40	48
B	435.43	40	24

Saída de dados das análises estatísticas de superfície para os experimentos com farelos de arroz e trigo com caseína realizado pelo SAS System

The SAS System

MEIO=1

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=1

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	760.766667
Root MSE	106.851421
R-Square	0.9203
Coef. of Variation	14.0452

Regression	Degrees of Freedom	Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	2599874	0.7560	113.9	0.0000
Quadratic	2	551257	0.1603	24.141	0.0000
Crossproduct	1	13801	0.0040	1.209	0.2825
Total Regress	5	3164932	0.9203	55.441	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	274013	11417

Degrees of	Parameter	Standard	T for H0:
------------	-----------	----------	-----------

Parameter	Freedom	Estimate	Error	Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-4143.776190	793.357024	-5.223	0.0000
UMIDADE	1	779.430952	190.072001	4.101	0.0004
TEMPO	1	61.310417	8.959764	6.843	0.0000
UMIDADE*UMIDADE	1	-43.023810	11.658446	-3.690	0.0011
TEMPO*UMIDADE	1	-0.773958	0.703946	-1.099	0.2825
TEMPO*TEMPO	1	-0.423003	0.071846	-5.888	0.0000

Parameter	Parameter Estimate from Coded Data
INTERCEPT	1009.247619
UMIDADE	107.800000
TEMPO	348.250000
UMIDADE*UMIDADE	-172.095238
TEMPO*UMIDADE	-37.150000
TEMPO*TEMPO	-243.650000

MEIO=1

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	343602	114534	10.032	0.0002
TEMPO	3	2835131	945044	82.773	0.0000

MEIO=1

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Coded	Value Uncoded
UMIDADE	0.238022	8.476043
TEMPO	0.696506	64.716150

Predicted value at stationary point 1143.356138

Eigenvectors

Eigenvalues	UMIDADE	TEMPO
-167.560690	0.971471	-0.237157
-248.184548	0.237157	0.971471

Stationary point is a maximum.

MEIO=2

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=2

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	830.366667
Root MSE	222.163467
R-Square	0.7249
Coef. of Variation	26.7549

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	2128957	0.4945	21.567	0.0000
Quadratic	2	927412	0.2154	9.395	0.0010
Crossproduct	1	64481	0.0150	1.306	0.2643
Total Regress	5	3120850	0.7249	12.646	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	1184559	49357

H0: Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Error	Standard Parameter=0	T for Prob > T
INTERCEPT	1	-5069.014286	1649.533018	-3.073	0.0052
UMIDADE	1	969.771429	395.194133	2.454	0.0218
TEMPO	1	80.154167	18.628973	4.303	0.0002
UMIDADE*UMIDADE	1	-54.119048	24.240021	-2.233	0.0352
TEMPO*UMIDADE	1	-1.672917	1.463630	-1.143	0.2643
TEMPO*TEMPO	1	-0.555035	0.149381	-3.716	0.0011

Parameter
Estimate
From Coded Data

Parameter	
INTERCEPT	1151.738095
UMIDADE	47.133333
TEMPO	323.700000
UMIDADE*UMIDADE	-216.476190
TEMPO*UMIDADE	-80.300000
TEMPO*TEMPO	-319.700000

MEIO=2

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	343829	114610	2.322	0.1006
TEMPO	3	2841502	947167	19.190	0.0000

MEIO=2

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	0.015326	8.030653
TEMPO	0.504331	60.103946

Predicted value at stationary point 1233.725272

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-202.698408	0.945859	-0.324579
-333.477783	0.324579	0.945859

Stationary point is a maximum.

MEIO=3

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=3

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	867.833333
Root MSE	218.219826
R-Square	0.7134
Coef. of Variation	25.1454

Regression	Degrees of Freedom	Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	1823470	0.4573	19.146	0.0000
Quadratic	2	1020322	0.2559	10.713	0.0005
Crossproduct	1	756.900000	0.0002	0.0159	0.9007
Total Regress	5	2844549	0.7134	11.947	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	1142877	47620

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-6640.823810	1620.252031	-4.099	0.0004
UMIDADE	1	1510.019048	388.179012	3.890	0.0007
TEMPO	1	51.147917	18.298289	2.795	0.0100
UMIDADE*UMIDADE	1	-89.142857	23.809735	-3.744	0.0010
TEMPO*UMIDADE	1	-0.181250	1.437649	-0.126	0.9007
TEMPO*TEMPO	1	-0.399392	0.146729	-2.722	0.0119

Parameter	Estimate from Coded Data
INTERCEPT	1199.485714
UMIDADE	150.066667
TEMPO	272.550000
UMIDADE*UMIDADE	-356.571429
TEMPO*UMIDADE	-8.700000
TEMPO*TEMPO	-230.050000

MEIO=3

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	1006059	335353	7.042	0.0015
TEMPO	3	1839247	613082	12.875	0.0000

MEIO=3

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
UMIDADE	0.203250	8.406501
TEMPO	0.588528	62.124671

Predicted value at stationary point 1294.937909

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-229.900617	-0.034321	0.999411
-356.720812	0.999411	0.034321

Stationary point is a maximum.

MEIO=4

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
UMIDADE	8.000000	2.000000
TEMPO	48.000000	24.000000

MEIO=4

Response Surface for Variable RESP

Response Mean	824.600000
Root MSE	202.357200
R-Square	0.7221
Coef. of Variation	24.5400

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	1580907	0.4471	19.304	0.0000
Quadratic	2	910225	0.2574	11.114	0.0004
Crossproduct	1	62252	0.0176	1.520	0.2295
Total Regress	5	2553385	0.7221	12.471	0.0000

Residual	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
Total Error	24	982762	40948

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEPT	1	-5489.428571	1502.474225	-3.654	0.0013
UMIDADE	1	1325.342857	359.961876	3.682	0.0012
TEMPO	1	34.133333	16.968167	2.012	0.0556
UMIDADE*UMIDADE	1	-83.904762	22.078981	-3.800	0.0009
TEMPO*UMIDADE	1	1.643750	1.333145	1.233	0.2295
TEMPO*TEMPO	1	-0.379688	0.136064	-2.791	0.0102

Parameter Estimate from Coded

Parameter	Data
INTERCEPT	1138.209524
UMIDADE	123.533333
TEMPO	260.000000
UMIDADE*UMIDADE	-335.619048
TEMPO*UMIDADE	78.900000
TEMPO*TEMPO	-218.700000

MEIO=4

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
UMIDADE	3	882520	294173	7.184	0.0013
TEMPO	3	1733117	577706	14.108	0.0000

MEIO=4

Canonical Analysis of Response Surface
(based on coded data)

Factor	Critical Value Coded	Uncoded
UMIDADE	0.259409	8.518818
TEMPO	0.641215	63.389156

Predicted value at stationary point 1237.590280

Eigenvalues	Eigenvectors	
	UMIDADE	TEMPO
-206.634220	0.292476	0.956273
-347.684827	0.956273	-0.292476

Stationary point is a maximum.