

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Contribuição ao estudo de produção de *koji* para
fabricação de molho de soja**

RENATO AKIRA HONMA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Sunao Sato

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005480

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Honma, Renato Akira
H773c Contribuição ao estudo de produção de *Koji* para a
fabricação de molho de soja / Renato Akira Honma. --
São Paulo, 2003.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Sato, Sunao

1. Enzimas : Bioquímica industrial 2. Enzima
proteolítica : Bioquímica 3. Soja : Tecnologia de
alimentos I. T. II. Sato, Sunao, orientador.

660.63e CDD

RENATO AKIRA HONMA

**Contribuição ao estudo de produção de *kaji* para fabricação
de molho de soja**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Titular Sunao Sato
Orientador/Presidente

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
1º. examinador

Prof. Dra. Telma Mary Kaneko
2º. examinador

São Paulo, 24 de junho de 2003

*Aos meus queridos pais, Mitsuaki e Kitsuko
pelas lições de vida, dedicação
e esforços com a minha educação.*

*À minha esposa, Emi e meus filhos Yuuki e Airy
pela força, energia e estímulo sempre presentes.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sunao Sato, pelo constante estímulo, confiança e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Sr. Renato Kenji Nakaya, Presidente da SAKURA NAKAYA ALIMENTOS LTDA. pela oportunidade e confiança dada a mim neste trabalho.

Ao Prof. Lyrio Sartório, consultor da SAKURA NAKAYA ALIMENTOS LTDA. pelas discussões, sugestões e grandes ensinamentos científico-tecnológicos.

Ao Paulo Teruharu Takahashi, Gerente Industrial da SAKURA NAKAYA ALIMENTOS LTDA., pela amizade e apoio.

Aos analistas do laboratório, Givaldo Manoel Bonfim, Luciano Souza Alves, Benedito Donizete de Jesus, César Ismael Lopes e Liliane Fineza Jaques pela grande colaboração na parte experimental.

Ao Valdeci Miguel da Silva, encarregado de produção da unidade de Boituva pelas noites mal dormidas durante vários experimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Produção convencional do molho de soja	2
2.2 Matérias Primas	2
2.3 Proporção de soja para trigo	7
2.4 Substituição da matéria prima	8
2.5 Tratamento da matéria prima	10
2.6 Fungos do <i>koji</i>	13
2.7 Fabricação do <i>koji</i>	15

2.8 Principais enzimas produzidas no <i>koji</i>	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Matéria Prima	22
4.2 Microorganismo	23
4.2.1 Preparo do inóculo	24
4.2.2 Determinação da concentração de esporos	24
4.3 Meios de cultivo para fermentação	26
4.4 Métodos Analíticos do <i>koji</i>	26
4.4.1 Preparo da Amostra	26
4.4.2 Determinação de umidade	26
4.4.3 Determinação de pH do <i>koji</i>	27
4.4.4 Determinação do crescimento micelial	27
4.4.5 Determinação de açúcares redutores (AR) presentes no meio de cultura	29
4.4.6 Extração de enzimas para determinação de atividades enzimáticas	31

4.4.7 Determinação de α -amilase	31
4.4.8 Determinação da atividade das proteases	33
4.5 Planejamento dos experimentos	35
4.5.1 Comentários sobre condições dos ensaios da tabela 4.5.1.	36
4.6 Análise de produção de enzimas	37
5. ENSAIO PADRÃO DE FERMENTAÇÃO	38
5.1 Seqüência dos ensaios na produção de enzimas no cultivo do <i>koji</i>	40
5.1.1 Efeito na concentração de inóculo	40
5.1.2 Efeito na proporção de matéria prima	40
5.1.3 Efeito da temperatura e tempo de fermentação	40
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	89
7.1 Influência da concentração de inóculo na produção de enzimas	89
7.1.1 Análise do crescimento micelial	92

7.1.2 Análise de produção de açúcares redutores	93
7.2 Efeito da temperatura e do meio de cultura na produção de enzimas em 48 horas de fermentação	95
7.2.1 Análise de produção de enzimas	95
7.2.2 Análise do crescimento micelial	99
7.2.3 Análise de produção de açúcares redutores	100
7.2.4 Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.	101
7.3 Determinação de custos do molho de soja no presente estudo	103
7.3.1 Preços médios das matérias-primas	104
7.3.2 Custo do molho de soja no presente estudo	106
8. CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

RESUMO

A primeira etapa na produção de molho de soja é chamada de *koji*. Nesta etapa ocorre o crescimento do microorganismo *Aspergillus oryzae* e/ou *Aspergillus sojae* sobre a mistura de soja e trigo produzindo diferentes tipos de enzimas. Estas hidrolisam as proteínas e polissacarídeos das matérias-primas. No Brasil, quase a totalidade da produção de *koji* utiliza como mistura soja e milho em vez da mistura soja e trigo que é utilizada milenarmente pelos países asiáticos. Na literatura há poucos dados sobre a produção de *koji* com a mistura soja e milho, assim o presente trabalho foi realizado visando à contribuição para as indústrias produtoras de molho de soja. No trabalho, estudou-se a influência da concentração inicial de inóculo, da matéria-prima, da temperatura e tempo de fermentação.

As concentrações de inóculo ensaiadas foram limitadas entre 10^4 e 10^{10} esporos/grama de matéria seca (gms); as matérias-primas utilizadas foram soja e trigo nas proporções 50:50 e 60:40, e idem para soja e milho; os efeitos das temperaturas de fermentação estudadas foram 25 °C, 30 °C, 35 °C em um tempo de 56 horas. Também, foram realizados dois ensaios em duas etapas de temperaturas na seqüência. O primeiro ensaio foi realizado na condição de temperatura de 30 °C durante 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas e o segundo a 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas.

Os resultados obtidos mostram que a produção das enzimas proteolíticas e amilolíticas são dependentes da quantidade de inóculo inicial e da temperatura quando se fixa o tempo de fermentação de 48 horas. O melhor resultado obtido foi com inóculo inicial de 10^{10} esporos/gms e quando se utilizou a condição de temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 24 horas. A mudança

de matéria-prima não afetou a produtividade enzimática de protease, porém causou uma redução na produtividade da α -amilase. O melhor custo de produção de molho de soja se deu para a matéria prima soja e trigo na proporção de 50:50.

ABSTRACT

The first step of the soy sauce production is called *koji*. On this step the growth of microorganisms *Aspergillus oryzae* and/or *Aspergillus sojae* occurs over a soybean and wheat mixture producing different kinds of enzymes. These enzymes hydrolyzed the proteins and polysaccharides of raw materials. In Brazil almost all *koji* production utilize as raw material, a mixture of soybeans and corn, instead of a mixture of soybeans and wheat, which is used millenary by Asia countries. Due a lack of data about *koji* production utilizing soybeans and corn as raw materials in literature, the present work was realized to help the industrial producers of soy sauce. The influence of initial concentration of inoculums, raw materials, temperatures and time of fermentation were items studied in this work.

The inoculums concentrations tested were limited between 10^4 to 10^{10} spores/grams of dry material; the raw materials utilized were soy and wheat in proportion 50:50 and 60:40. The same proportion was used for soy and corn; the temperature and time effects studied over fermentation were 25 °C, 30 °C, 35 °C for 56 hours. Also, two tests in two temperatures stages were realized in sequence. The first test was realized at 30 °C for 24 hours followed by 25 °C for more 32 hours. The second at 35 °C for 24 hours followed by 25 °C for more 32 hours.

The results obtained show that the productivity of proteolytic and amylolytic enzymes depends on the amount of initial inoculums size and on temperature when it is fixed a fermentation time of 48 hours. The best result was obtained with initial inoculum size of 10^{10} spores/grams of dry material at 30 °C for 24 hours followed by 25 °C for more 32 hours. The change of raw material has not caused effect on protease productivity. However, it has caused reduction for α -amylase productivity. The best-cost benefit on soy sauce production was obtained by soybeans and wheat as raw material at proportion of 50:50.

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 2.1.1 Processo convencional de produção de molho de soja.	3
FIGURA 2.5.1.1 Explicação esquemática da hidrólise enzimática de proteínas desnaturadas.	11
FIGURA 2.7.1 Papel das enzimas proteolíticas do fungo do <i>koji</i> na liberação de aminoácidos de proteínas.	17
FIGURA 5.1 Esquema de ensaio padrão de fermentação	39
FIGURA 6.1.1 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no.1, onde a concentração de inóculo foi de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.	42
FIGURA 6.1.2 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 1, onde a concentração de inóculo foi de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.	42
FIGURA 6.1.3 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no.2, onde a concentração de inóculo foi de 10^8 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.	44

- FIGURA 6.1.4 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 2, onde a concentração de inóculo foi de 10^8 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 44
- FIGURA 6.1.5 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no.3, onde a concentração de inóculo foi de 10^6 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 46
- FIGURA 6.1.6 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 3, onde a concentração de inóculo foi de 10^6 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 46
- FIGURA 6.1.7 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 4, onde a concentração de inóculo foi de 10^4 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 48
- FIGURA 6.1.8 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 4, onde a concentração de inóculo foi de 10^4 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 48

- FIGURA 6.2.1 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 5 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 50
- FIGURA 6.2.2 Variação da umidade, açúcares redutores , pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 5 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 50
- FIGURA 6.2.3 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 6 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 52
- FIGURA 6.2.4 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 6 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 52
- FIGURA 6.2.5 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 7 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 54

- FIGURA 6.2.6 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 7 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 54
- FIGURA 6.2.7 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 8 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 56
- FIGURA 6.2.8 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 8 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 56
- FIGURA 6.2.9 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 9 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 58
- FIGURA 6.2.10 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 9 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 58
-

- FIGURA 6.2.11 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 10 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 60
- FIGURA 6.2.12 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 10 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 60
- FIGURA 6.2.13 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 11 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 62
- FIGURA 6.2.14 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 11 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 62
- FIGURA 6.2.15 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 12 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 64

- FIGURA 6.2.16 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 12 em temperatura de 30°C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 64
- FIGURA 6.2.17 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 13 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 66
- FIGURA 6.2.18 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 13 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 66
- FIGURA 6.2.19 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 14 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 68
- FIGURA 6.2.20 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 14 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 68

- FIGURA 6.2.21 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 15 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 70
- FIGURA 6.2.22 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 15 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 70
- FIGURA 6.2.23 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 16 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 72
- FIGURA 6.2.24 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 16 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. 72
- FIGURA 6.2.25 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 17 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25°C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 74

- FIGURA 6.2.26 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 17 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 74
- FIGURA 6.2.27 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 18 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 76
- FIGURA 6.2.28 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 18 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 76
- FIGURA 6.2.29 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 78
- FIGURA 6.2.30 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 19 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 78

- FIGURA 6.2.31 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 20 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 80
- FIGURA 6.2.32 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 20 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 80
- FIGURA 6.2.33 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 21 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.. 82
- FIGURA 6.2.34 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 21 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 82

- FIGURA 6.2.35 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 22 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 84
- FIGURA 6.2.36 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 22 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 84
- FIGURA 6.2.37 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 23 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 86
- FIGURA 6.2.38 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 23 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 86

- FIGURA 6.2.39 Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 24 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 88
- FIGURA 6.2.40 Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 24 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms. 88
- FIGURA 7.1.1 Variação da produtividade enzimática de protease com o tempo de fermentação e concentração de inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms. Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 91
- FIGURA 7.1.2 Variação da produtividade enzimática de α -amilase com o tempo de fermentação e concentração de inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms . Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. 91
- FIGURA 7.1.1.1 Variação do crescimento micelial utilizando concentração inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms , 10^4 esporos/gms com o tempo de fermentação. Meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e temperatura de 30 °C. 92

FIGURA 7.1.2.1 Variação da formação de açúcares redutores utilizando concentração inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms com o tempo de fermentação. Meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e temperatura de 30 °C	93
FIGURA 7.2.1.1 Efeito da temperatura e do meio de cultura na produtividade enzimática média (Pm) de protease. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.	98
FIGURA 7.2.1.2 Efeito da temperatura e do meio de cultura na produtividade enzimática média (Pm) de α -amilase. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.	98
FIGURA 7.2.2.1 Efeito da temperatura e do meio de cultura no crescimento micelial. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.	100
FIGURA 7.2.3.1 Efeito da temperatura e do meio de cultura sobre a produção de açúcares redutores. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.	101

LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 2.2.1.1 Dados comparativos da composição da soja provenientes de países diferentes.	4
TABELA 2.4.1 Composição química do trigo e milho.	9
TABELA 2.4.2 Composição em aminoácidos (g AA/16g N) do gérmen de trigo e de milho.	9
TABELA 2.5.1.1 Efeito das condições de cozimento da soja sobre a digestibilidade enzimática da proteína.	12
TABELA 4.3.1 Meio de Cultivo para fermentação (a).	26
TABELA 4.3.1 Meio de Cultivo para fermentação (b)	26
TABELA 4.5.1 Planejamento dos experimentos	35
TABELA 6.1.1 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 1.	41
TABELA 6.1.2 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^8 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 2.	43

TABELA 6.1.3 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^6 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 3.	45
TABELA 6.1.4 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^4 esporos em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 4.	47
TABELA 6.2.1 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 5.	49
TABELA 6.2.2 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 6.	51
TABELA 6.2.3 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 7.	53

TABELA 6.2.4 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10 ¹⁰ esporos/gms. Ensaio 8.	55
TABELA 6.2.5 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10 ¹⁰ esporos/gms. Ensaio 9.	57
TABELA 6.2.6 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30°C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10 ¹⁰ esporos/gms. Ensaio 10.	59
TABELA 6.2.7 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10 ¹⁰ esporos/gms. Ensaio 11.	61
TABELA 6.2.8 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10 ¹⁰ esporos/gms. Ensaio 12.	63

TABELA 6.2.9 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 13.	65
TABELA 6.2.10 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos no experimento realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 14.	67
TABELA 6.2.11 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 15.	69
TABELA 6.2.12 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 16.	71
TABELA 6.2.13 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 17.	73

TABELA 6.2.14 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 18.	75
TABELA 6.2.15 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 19.	77
TABELA 6.2.16 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 20.	79
TABELA 6.2.17 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 21.	81

TABELA 6.2.18 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 22.	83
TABELA 6.2.19 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 23.	85
TABELA 6.2.20 Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms. Ensaio 24.	87
TABELA 7.1.1 Variação da produtividade média enzimática (Pm) em função da concentração inicial de esporos no inóculo e do tempo. Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.	90
TABELA 7.2.1.1 Efeito da temperatura e do meio de cultura na produtividade no tempo de fermentação de 48 horas.	97
TABELA 7.2.4.1 Composição química da soja	102
TABELA 7.2.4.2 Composição química do trigo	102

TABELA 7.2.4.3 Composição química do milho	102
TABELA 7.3.1 Resultados das análises de proteína total nos molhos de soja obtidos no experimento.	104
TABELA 7.3.1.1 Tabela de custo de preparação de <i>koji</i> utilizando uma proporção de soja e milho 50:50.	105
TABELA 7.3.1.2 Tabela de custo de preparação de <i>koji</i> utilizando uma proporção de soja e milho 60:40.	105
TABELA 7.3.1.3 Tabela de custo de preparação de <i>koji</i> utilizando uma proporção de soja e trigo 50:50.	106
TABELA 7.3.1.4 Tabela de custo de preparação de <i>koji</i> utilizando uma proporção de soja e trigo 60:40.	106
TABELA 7.3.2.1 Custo de produção do molho de soja	107

LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS

gms:	grama de matéria seca
U:	unidade enzimática
kg:	quilo
ha:	hectare
AA:	aminoácidos
N:	nitrogênio
cm ²	centímetro quadrado
ufc:	unidade formadora de colônia
dfp	diisopropilfluorfosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
UFV:	Universidade Federal de Viçosa
ml	mililitros
PDA:	meio de cultura Potato Dextrose Agar
mm:	milímetros
mesh:	número de malhas por polegada linear
AR:	açúcares redutores
DNS:	ácido 3,5 dinitrosalicílico
TCA:	ácido tricloroacético
mM	mmol
μmol	micromol
30/25:	Combinação de duas temperaturas em ensaio contínuo de 30 °C por 24 horas e seguidos por 25 °C por mais 32 horas
35/25:	Combinação de duas temperaturas em ensaio contínuo de 35 °C por 24 horas e seguidos por 25 °C por mais 32 horas
Pm:	Produtividade média

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE PRODUÇÃO DE *KOJI* NA FABRICAÇÃO DE MOLHO DE SOJA.

1. INTRODUÇÃO

Shoyu nome japonês para molho de soja é um líquido condimentado popular usado na culinária oriental e atualmente também na ocidental. É obtido da hidrólise enzimática da soja e do trigo na presença de sal. Os constituintes do trigo dão ao *shoyu* sua característica aromatizante e a coloração, os constituintes da soja dão a ele o aroma, sabor e a cor avermelhada e o sal o sabor salgado.

Suas características dependem das variedades e proporções de matérias primas usadas, tipos de microorganismos empregados e condições de preparação. Um molho de soja de boa qualidade contém 1,5-1,8% (massa/volume) de nitrogênio total, 3,0-5,0% de açúcares redutores (principalmente glicose), 2,0-2,5% de etanol, 1,0-1,5% de glicerol, 1,0-2,0% de ácidos orgânicos (predominantemente ácido láctico), pH de 4,7-4,8, e 17,0-18,0% de sal (YOKOTSUKA, 1986).

Na primeira etapa da produção de molho de soja chamada *koji*, muitas enzimas são produzidas para a conversão da soja e trigo ou outro cereal em molho de soja. Os fungos crescem sobre a soja e trigo e/ou outro cereal e produzem diferentes enzimas, tais como proteases, peptidases, glutaminases, amilases e celulasas. Contudo, como a qualidade do molho de soja é medida pela quantidade de proteína, açúcares e álcool, neste trabalho seu deu ênfase somente na quantidade produzida de proteases e α -amilases.

O presente trabalho visou uma contribuição ao estudo do processo da primeira etapa da fermentação do molho de soja, usando como matérias-primas a soja e o milho, uma vez que os trabalhos publicados são realizados utilizando como matérias-primas a soja, trigo e seus derivados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO CONVENCIONAL DO MOLHO DE SOJA

A produção do molho de soja é um processo de duas etapas principais. Na primeira etapa da fermentação chamada de *koji* ocorre o crescimento do microorganismo, *Aspergillus oryzae* ou *sojae*, sobre a mistura de soja e trigo produzindo diferentes enzimas, tais como proteases, amilases, celulasas e glutaminases. As enzimas produzidas hidrolisam as proteínas e polissacarídeos da matéria-prima. Quando o crescimento do fungo chega a um nível desejado, a mistura de soja e trigo coberta pelos micélios é colocada dentro de uma solução de cloreto de sódio a 23%. Esta mistura, constituindo a segunda etapa, é chamada de *moromi*, e nesta etapa fermentativa ocorre o início do crescimento de bactérias lácticas halófilas. Este crescimento provoca a redução do pH pela produção de ácido láctico. O decréscimo do pH permite o crescimento de leveduras produzindo álcool. Após a completa fermentação da segunda etapa, o molho é filtrado, pasteurizado e colocado à venda. O fluxograma de produção convencional do molho de soja é descrito na figura 2.1.1 na página 3.

2.2 MATÉRIAS-PRIMAS

2.2.1 SOJA

A soja conhecida botanicamente como *Glicine max*, é nativa da Ásia oriental. Há poucas diferenças na composição dos grãos de soja produzidas em diferentes países, como mostra a tabela 2.2.1.1 adaptada de YOKOTSUKA, (1960).

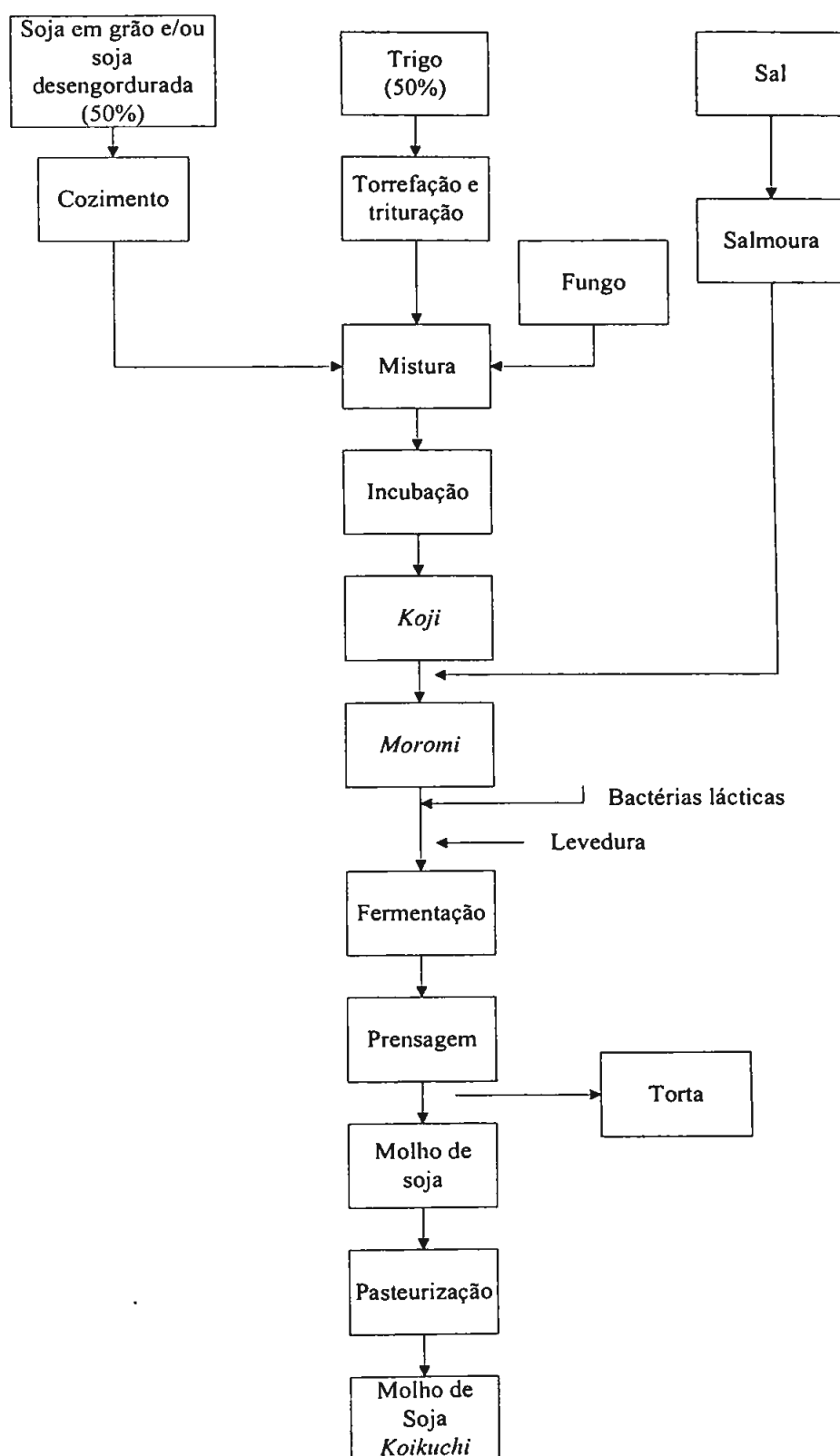


FIGURA 2.1.1: Processo convencional de produção de molho de soja
FONTE: FUKUSHIMA, (1985).

TABELA 2.2.1.1: Dados comparativos da composição da soja provenientes de países diferentes.

País	Umidade %	Nitrogênio Total (%)	Gordura bruta (%)	Açúcares invertidos (%)
Japão	13	6	16	15
China	11	6	19	19
U.S.A	10	6	20	17

A soja é um dos principais produtos de exportação da agricultura brasileira. Os maiores produtores mundiais de soja são os Estados Unidos em primeiro lugar, o Brasil em segundo e a Argentina em terceiro. A produção nos Estados Unidos na safra 2001/01 foi de 75,38 milhões de toneladas contra 35,5 milhões de toneladas no Brasil. Contudo, em relação a produtividade, o Brasil superou os Estados Unidos em torno de 50 kg/hectare (EMBRAPA/SOJA, 2002).

Soja em grão ou soja desengordurada podem ser usadas na manufatura do molho. Quando grãos de soja são utilizados, a fração oleosa deve ser retirada do *moromi* (dispersão de soja + trigo torrado e moído fermentado em salmoura). Esta fração conhecida como “óleo de molho de soja” serve para fabricação de sabão de baixa qualidade e como fonte de ácido linoleico. Este óleo contém etil ésteres de ácidos graxos superiores produzidos durante a fermentação, ácidos graxos livres e triésteres do glicerol de origem (KUBO, 1947). O “óleo de molho de soja” contém 30%-40% de ácidos graxos livres (YOKOTSUKA, 1964).

A soja desengordurada tem sido utilizada para substituir a soja em grãos em cerca de 75% da produção de molho de soja no Japão, porém no Brasil quase 90% da produção é feita com soja em grão. A principal razão para o uso de soja em grão no Brasil é pela facilidade e abundância na obtenção da matéria-prima.

Tem se verificado por experiências práticas que a fermentação com soja desengordurada requer um período menor de fermentação, cerca de 10 meses à temperatura ambiente, e para soja em grão cerca de 15 meses (YOKOTSUKA, 1960). Segundo a literatura, a superfície da camada de óleo afeta a transferência de oxigênio no *Moromi* fermentado, diminuindo o crescimento das leveduras, o que resulta quando os grãos de soja são usados (FUKAI, 1929) ou que a soja em grão é digerida mais lentamente do que as partículas mais finamente divididas na soja desengordurada. O período de fermentação do *moromi* é principalmente dependente da digestibilidade enzimática da soja cozida e da atividade enzimática do *koji*.

2.2.2 TRIGO

Pode se usar farinha de trigo e/ou trigo em grãos. Usualmente somente farinha de trigo com 8%-9% (m/m) de proteína é usada. YOKOTSUKA, (1964) resumiu a função do trigo na produção do molho de soja como se segue:

- a) Permite o ajuste da umidade ideal do material a ser cultivado que deve ser de aproximadamente 45% com intuito de evitar o crescimento indesejável de bactérias. A soja cozida tem aproximadamente 60% de umidade, e o trigo torrado e moído serve para diminuir a umidade do material;
 - b) Ajuda obter uma alta atividade proteolítica na etapa do *koji*; a atividade é mais alta quando o material inicial é misturado em proporções iguais de soja e trigo, permitindo um grande crescimento de fungos;
 - c) Serve como maior fonte de carboidratos e como precursor de açúcares, álcool e ácidos orgânicos;
 - d) Serve como rica fonte de ácido glutâmico.
-

2.2.3 MILHO

O milho há séculos vem sendo utilizado na alimentação humana e de animais domésticos, devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, principalmente amido, e de outros componentes tais como proteínas, óleo e vitaminas.

O milho, em função de sua composição e valor nutritivo, constitui-se em um dos mais importantes cereais cultivados no mundo, sendo suplantado apenas pelo trigo e arroz. O grão de milho é constituído basicamente de carboidratos (60%), proteína (10%) e óleo (4%), que não se encontram igualmente distribuídos. O endosperma é praticamente constituído de carboidrato, ao passo que o germe concentra maior porcentagem de óleo, proteína e sais minerais e ainda pode conter quantidades significativas de ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantotênico e vitamina E (FANCELLI & LIMA, 1991).

2.2.4 SAL

O cloreto de sódio atua como conservante e age como agente seletivo de microorganismos que crescem na fermentação. Se o sal não estiver presente, fermentações anaeróbicas perigosas poderiam ocorrer. A função do sal não é somente de inibir microorganismos perigosos para saúde humana, mas também é necessário para um desenvolvimento de um sabor exclusivo que é formado a partir de leveduras e bactérias lácticas.

2.3 PROPORÇÃO DE SOJA PARA TRIGO

O uso de trigo diminui o conteúdo de nitrogênio total do molho de soja, mas contribui para o aroma, sabor e aumentando o teor de ácido glutâmico (YONG & WOOD, 1974). Segundo estes autores, o melhor molho de soja é geralmente manufaturado com soja desengordurada e trigo na proporção de 50:50 em peso. A proporção de matéria-prima também irá depender do tipo de molho de soja que se deseja obter.

O JAPANESE AGRICULTURAL STANDARD (1999) classifica o molho de soja em cinco variedades :

- *Koikuchi* : é o molho de soja regular, feito de partes iguais de soja e trigo com coloração marrom avermelhada.
- *Usukuchi*: é o molho de soja contendo arroz, menos trigo e mais soja do que o tipo *Koikuchi*, mais suave no sabor e com baixo teor de nitrogênio.
- *Tamari*: é produzido principalmente com soja e uma pequena quantidade de trigo cerca de (90:10), alto teor de nitrogênio, baixo teor de álcool, e sabor forte.
- *Shirô*: possui coloração muito clara e é feito com trigo e uma pequena quantidade de soja.
- *Saishikomi*: o saishikomi-shoyu é obtido pela dupla fermentação do molho de soja *Koikuchi* tendo alto teor de nitrogênio.

Estes cinco tipos de molho de soja são reconhecidos pelo governo japonês e cada tipo é classificado em três graus que são Especial, Maior e Padrão. Cada grau é determinado por avaliação organoléptica, conteúdo total de nitrogênio, álcool, sólidos solúveis e outros como teor de cloretos e cor.

2.4 SUBSTITUIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Houve várias tentativas de manufatura de molho de soja usando outros materiais sem ser soja e trigo, mas todas foram comercialmente mal sucedidas (YONG & WOOD, 1974). Experimentou-se torta de amendoim prensado ao invés da mistura soja e trigo. O molho obtido foi chamado molho de amendoim. A fermentação da torta de amendoim prensado em escala industrial não é um processo fácil e o controle do crescimento microbiano é muito difícil.

MEEI & CHENG, (1996) em seus estudos investigaram os efeitos de substituição das matérias primas tradicionais por material extrudado de soja desengordurada e farinha de trigo, obtendo-se alta atividade enzimática e demonstrando o potencial e os benefícios do uso de materiais extrudados para o pré-tratamento das matérias primas.

No Brasil devido ao preço e a dificuldade de importação do trigo na década de 40, imigrantes japoneses utilizaram o milho no lugar do trigo obtendo resultados organolépticos e físico-químicos similares, porém não foram feitos estudos sobre as diferenças das concentrações enzimáticas obtidas durante a fermentação.

A composição do trigo e milho é similar como pode ser visto na tabela 2.4.1 de composição química dos alimentos (FRANCO, 1999) e complementada na tabela 2.4.2 da composição em aminoácidos do gérmen de trigo e de milho (BALDINI, et al., 1981) abaixo:

TABELA 2.4.1: Composição Química de Trigo e Milho.

Composição	Trigo (100 g)	Milho (100 g)
Glicídios	68,85 g	70,10 g
Proteínas	14,22 g	9,80 g
Lipídios	1,81g	4,92 g
Cálcio	28,00 mg	9,00 mg
Ferro	6,47 mg	0,53 mg
Fósforo	204 mg	165 mg

TABELA 2.4.2: Composição em aminoácidos (g AA/16g N) do gérmen de trigo e de milho

Aminoácidos	Gérmen Trigo	Gérmen de Milho
Lisina	6,49	4,81
Histidina	2,54	2,71
Amônia	2,65	1,60
Arginina	7,99	6,36
Ácido aspártico	9,07	9,01
Treonina	4,27	4,53
Serina	4,52	5,07
Ácido Glutâmico	15,59	11,19
Prolina	5,63	7,49
Glicina	6,88	6,63
Alanina	8,06	9,39
Valina	7,13	7,43
Metionina	2,26	2,20
Isoleucina	3,30	4,10
Leucina	5,73	10,24
Tirosina	3,26	2,57
Fenilalanina	4,26	4,57

2.5 TRATAMENTO DA MATÉRIA PRIMA

2.5.1 SOJA

A proteína na soja crua está presente em um estado não desnaturado e não é hidrolisada pelas enzimas do fungo do *koji*. Por isso, é necessária uma desnaturação das proteínas da soja para que ela possa ser digerida pelas enzimas do fungo do *koji* para manufatura do molho de soja.

A digestibilidade das proteínas da soja e trigo pelas enzimas é marcadamente influenciada pelas condições do tratamento térmico dos grãos de soja. A proteína nativa é muito resistente à proteólise devido a sua conformação compacta. A taxa de hidrólise é dependente do grau de desdobramento do substrato das moléculas de proteína. Conseqüentemente, quando as proteínas da soja são usadas como substrato para proteases, as moléculas de proteína devem estar desdobradas por algum tratamento, preferencialmente pelo aquecimento. Contudo, o tratamento térmico extenso das proteínas pode diminuir a razão de proteólise por modificar sua estrutura (YOKOTSUKA, 1986). Os fatores que afetam a proporção e a extensão da hidrólise enzimática das proteínas no *koji* incluem:

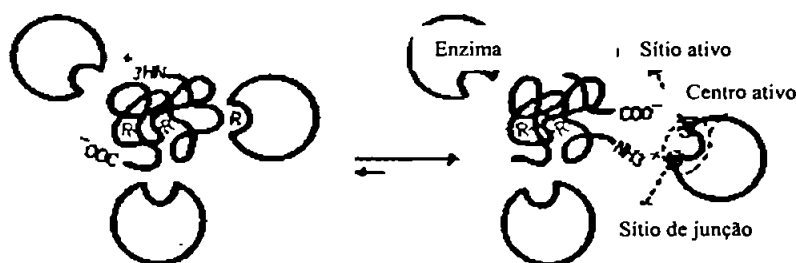
- a) a especificidade do substrato da enzima;
- b) a modificação da cadeia de aminoácidos do substrato protéico;
- c) a estrutura tridimensional do substrato protéico.

É essencial que o centro ativo da enzima seja capaz de se ligar a resíduos de aminoácidos do substrato das proteínas. Na proteína nativa da soja, as moléculas são completamente compactadas e por isso os resíduos de aminoácidos requeridos pelas enzimas não estão disponíveis. Ao contrário, quando a proteína está desnaturada pelo

tratamento térmico, a hidrólise enzimática irá se processar rapidamente visto que os resíduos dos aminoácidos específicos ficam disponíveis como mostra a figura 2.5.1.1 (FUKUSHIMA, 1985).

O cozimento por vapor tem sido o método mais empregado para desnaturação das proteínas. Até 25 anos atrás, os grãos de soja eram cozidos a uma pressão de 0,8 kg/cm² por várias horas. Desde então, o tempo tem sido diminuído para menos de 1 hora à mesma pressão.

Hidrólise Enzimática da Molécula Dobrada (Proteína Nativa)



Hidrólise Enzimática da Molécula Desdobrada (Proteína Desnaturada)

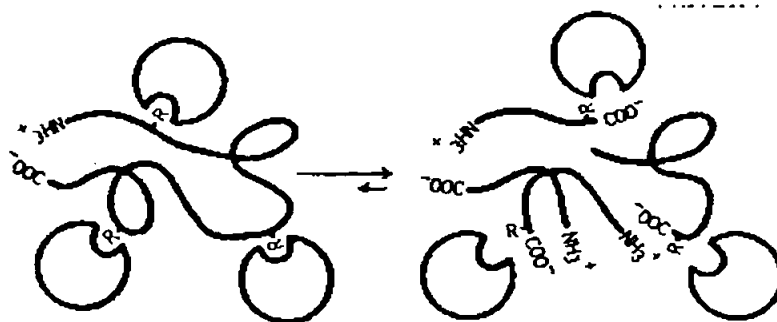


FIGURA 2.5.1.1: Esquema de hidrólise enzimática de proteínas desnaturadas. FONTE: FUKUSHIMA, (1985).

A digestibilidade da proteína na fabricação do molho de soja é a razão entre o nitrogênio total do molho de soja e o da matéria prima. Esta digestibilidade tem aumentado de 69% para 73% pelo método de cozimento NK. O método NK consiste no cozimento da soja por pressão de vapor em cozedor rotatório e resfriamento rápido à temperatura de 40 °C extraindo o vapor por um sistema Venturi.

YOKOTSUKA, (1966) encontrou melhores condições para aumentar a digestibilidade enzimática pelo cozimento a pressão de vapor e curto tempo com o método NK, como exposto na tabela 2.5.1.1. Este método indica a possibilidade de ter de 92% a 94% de digestibilidade da proteína na produção de *shoyu*, e um produto final com melhores qualidades organolépticas (YASUDA et. al. 1973 a, b).

TABELA 2.5.1.1: Efeito das condições de cozimento da soja sobre a digestibilidade enzimática da proteína.

Pressão de vapor (kg/cm ²)	Tempo de Cozimento (min)	Digestibilidade da proteína em solução enzimática (sal 0%, 37 °C, 7 dias)
0.9	45	86%
1.2	10	91%
1.8	8	91%
2.0	5	92%
3.0	3	93%
4.0	2	94%
5.0	1	95%
6.0	0.5	95%
7.0	0.25	95%

Uma digestibilidade da proteína de 87,80% foi obtida cozinhando grãos de soja a 1,7kg/cm² por 8 minutos, usando o cozedor NK, comparada com 81,80% pelos métodos convencionais de cozimento nas condições de 0,9kg/cm² por 40 minutos (IIJIMA et al. 1973).

2.5.2 TRIGO

O trigo é a maior fonte de carboidratos entre todas as matérias primas utilizadas, mas seu conteúdo protéico não pode ser desprezado pois um quarto da proteína no molho de soja é proveniente desta fonte. O β -amido nos grãos de trigo devem ser transformados em α -amido pela torrefação adequada para ser digerido pela amilase fúngica. Se o trigo não for suficientemente torrado, seu amido cru ou β -amido não poderá ser digerido pela amilase fúngica e se o trigo for torrado excessivamente, a digestibilidade proteica diminui. A quantidade ideal de α -amido em trigo torrado usado na preparação dos molhos de soja *Koikuchi* e no *Usukuchi* relatadas em estudo foi de 40% e 20-30% respectivamente (MORIGUCHI & NISHIYAMA, 1960).

Após a torrefação, o trigo é moído, para que este possa aderir aos grãos de soja cozida reduzindo a umidade da superfície e minimizando a contaminação por bactérias durante o cultivo do *koji* (UMEDA, 1967).

2.6 FUNGO DO KOJI

O inóculo do *koji* (semente) pode ser produzido pela cultura do *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus sojae* sobre arroz cozido a vapor (processo japonês) ou na mistura de farinha de trigo ou farinha de soja (processo chinês). Esta é incubada por aproximadamente 72 horas sobre pequenas caixas ou bandejas em ambiente aquecido. Normalmente usa-se de 1%-2% de semente de *koji* como iniciador da fermentação. Uma outra alternativa é a utilização direta da cultura pura do microorganismo. Uma boa cultura de fungos deve ter alta atividade proteolítica e ser fácil de cultivar. YOKOTSUKA, (1960) afirmou que uma boa cultura de fungos deve dar a característica de

aroma e sabor para o molho de soja. Esta afirmação poderia implicar que o fungo é responsável parcialmente pelo sabor e aroma. O *koji* do molho de soja cultivado com *Aspergillus oryzae* apresenta um valor de pH baixo, baixo conteúdo de carboidratos, alta atividade de α -amilase, alta atividade de protease ácida, alta atividade de carboxipeptidase ácida e baixa atividade de poligalacturonase se comparado com o *koji* cultivado com *Aspergillus sojae* (TERADA et al., 1980, 1981). Adicionalmente, HAYASHI et al., (1981) relataram que o *koji* cultivado com *A. sojae* tem valor de pH mais alto porque produz menos ácido cítrico e mais carboidratos por causa do seu baixo consumo durante o cultivo do *koji*.

A espécie de fungos usada para a fermentação é selecionada com base nas seguintes características:

- a) Produzir um bom aroma ao produto final;
- b) Fácil e rápido crescimento;
- c) Alta atividade enzimática, especialmente a atividade proteolítica e hidrolítica para decompor a soja e o trigo;
- d) Ter conídeos curtos, o qual permite o cultivo mecânico dos materiais com maior espessura facilitando a aeração;
- e) Alta estabilidade genética;
- f) Produzir produtos finais com a cor desejada;
- g) Consumir uma pequena quantidade de carboidratos das matérias primas durante o cultivo do *koji*, para um melhor rendimento de álcool no *moromi*;
- h) Não produzir substâncias tóxicas, tais como aflatoxinas, ácido aspergílico e outros tipos das chamadas micotoxinas;
- i) Promover alto rendimento na prensagem do *moromi*.

2.7 FABRICAÇÃO DO KOJI

A palavra *koi* é uma abreviação da palavra “kabi-tachi” que significa um “florescer de fungos”. O *koi* é uma preparação para produção de enzimas pelo crescimento do *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus sojae* sobre soja, cereais ou outro material cozidos.

O principal propósito do *koi* é a utilização das suas enzimas amilolíticas e proteolíticas. Na fermentação do saque, o *koi* é usado como o malte na fabricação de cerveja ou *whiskey* para converter o amido em açúcares fermentescíveis. Na produção de *missô* e molho de soja, contudo, o *koi* não é usado somente para a conversão do amido, mas também para hidrólise dos polipeptídios das proteínas transformando-os em aminoácidos. A fabricação do *koi* tem uma tecnologia única que utiliza microorganismos cultivados em meio sólido de cereais para produção de enzimas.

Como anteriormente comentado, o *koi* tradicional é preparado com soja cozida e trigo torrado e moído onde são misturados esporos ou uma cultura pura do microorganismo *Aspergillus oryzae* e/ou *Aspergillus sojae*. Na produção industrial, a mistura é distribuída em bandejas, e empilhadas separadas uma das outras com um espaçamento de aproximadamente 10 cm (YONG & WOOD, 1974). O *koi* é resfriado duas vezes misturando o material manualmente quando a temperatura se eleva a 35 °C ou acima causada pelo crescimento dos fungos. YAMAMOTO, (1957) estudando a influência do crescimento do fungo concluiu que as temperaturas entre 30 °C e 35 °C tem sido indicadas, preferencialmente, para crescimento do micélio e prevenção contra o crescimento do *Bacillus*, um contaminante no início de estágio de cultura do *koi*. Uma menor temperatura, 20 °C-25 °C, é necessária antes e durante a produção de esporos quando a protease é produzida no *koi* (OHARA et al., 1959). A mudança de temperatura é preferida durante o cultivo do *koi*, mas é muito difícil manter esta alteração de temperatura em

processos manuais de fabricação. Com o desenvolvimento de um equipamento automatizado de cultivo de *koji*, já é possível cultivar o fungo em condições ideais desejadas, reduzindo o tempo de cultivo de 72 horas para 48 horas, aumentando a atividade enzimática e reduzindo a contaminação no *koji*.

As diretrizes básicas para o cultivo de *koji* são as seguintes:

- 1) Produzir o máximo possível de micélio e enzimas fúngicas;
- 2) Evitar a inativação das enzimas produzidas;
- 3) Minimizar o consumo de carboidratos nas matérias primas durante o cultivo do fungo;
- 4) Evitar o máximo a contaminação microbiológica nos materiais iniciais e durante o cultivo do fungo;
- 5) Diminuir o tempo de cultivo com o uso mínimo de água, eletricidade e combustível.

O estágio de fermentação do *koji* leva a ruptura enzimática das proteínas para peptídeos e aminoácidos pelas enzimas proteolíticas, especialmente as neutras e alcalinas. Amidos são hidrolisados para dissacarídeos e monossacarídeos pela α -amilase produzida pelo fungo. A máxima atividade proteolítica é a degradação máxima das proteínas insolúveis em solúveis transformando-as em polipeptídios, peptídeos e aminoácidos no *koji*, e alcançadas com a mistura de partes iguais de trigo e soja (YAMAMOTO, 1957). Há também, um rápido aumento nos açúcares redutores durante os estágios iniciais do crescimento do fungo. Isto é devido à atividade da invertase extracelular hidrolisando quantidades consideráveis de sacarose presentes nos grãos (YAMAMOTO, 1957).

A função das enzimas proteolíticas do *koji* durante a degradação das proteínas para aminoácidos é sumarizada na figura 2.7.1.

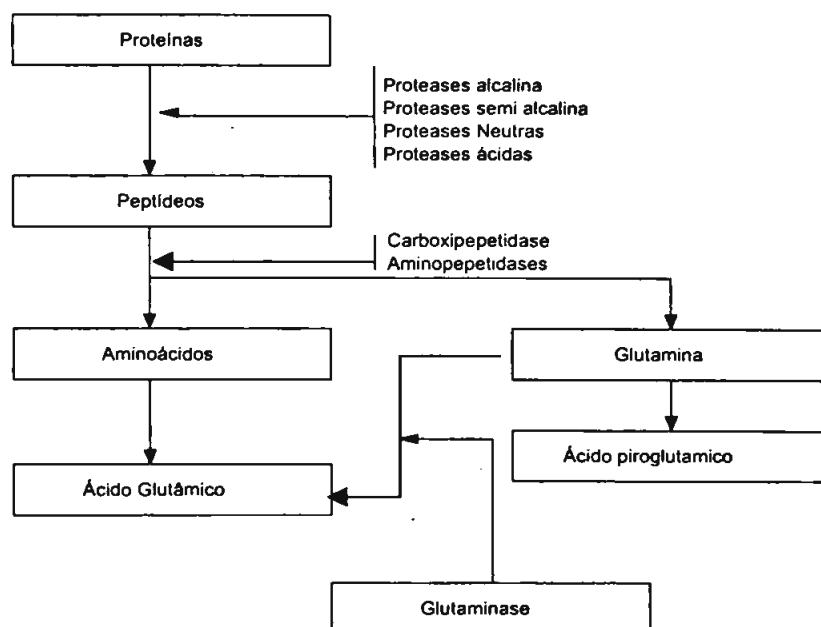


FIGURA 2.7.1.: Função das enzimas proteolíticas do fungo do *koji* na liberação de aminoácidos de proteínas. FONTE: STEINKRAUS, 1989.

O nível de contaminação no *koji* chega a um valor alto, cerca de $10^7 - 10^9$ ufc/g, este nível não constitui perigo à saúde. A principal bactéria contaminante do *koji* cultivado em bandejas de madeira, anos atrás, era do gênero *Bacillus* por causa da dificuldade em resfriar os materiais rapidamente. Embora, atualmente com os modernos equipamentos com sistemas automatizados de cultivo, a contaminação predominante seja a da bactéria do gênero *Micrococcus*, o qual é mais aeróbio e cresce a temperaturas inferiores a do *Bacillus*. Uma contaminação alta com *Bacillus* no *koji* não reduz somente a atividade proteolítica, mas também prejudica o sabor e o aroma. A presença de concentrações altas de *Micrococcus* abaixa o valor do pH, o que leva a digestão deficiente no *moromi*; adicionalmente, se as células mortas do *Micrococcus* permanecerem

no molho de soja, a sua filtração é dificultada. Há a possibilidade da redução da contaminação microbiana para 10^6 ufc/g, quando no início do cultivo de *koji* houver uma contagem bacteriana de 10^2 ufc/g ou menos nas matérias primas. Para evitar a contaminação bacteriana durante o cultivo do *koji*, os níveis de umidade dos materiais iniciais devem ser de 40%-50%, no máximo. Pela mesma razão, é aconselhável reduzir o nível de umidade da superfície dos grãos de soja cozido com o uso do trigo torrado e moído.

Há vários avanços na tecnologia de fermentação no Japão e as mais importantes foram o método de tratamento da soja e a automação do processo, particularmente na produção do *koji*. Os melhoramentos no método de tratamento são baseados no grau de hidrólise das proteínas da soja produzidos pelas proteases da espécie *Aspergillus*. O desenvolvimento de equipamentos automáticos de produção de *koji* deu condições para a produção máxima de enzima. No passado, o *koji* era produzido em bandejas de madeira, onde não se podia realizar o controle de temperatura e umidade para maximizar a produção de enzimas. O desenvolvimento do equipamento de cultivo automático do *koji*, não aumenta somente a produção de enzimas, mas também previne a contaminação por microorganismos indesejáveis que dão ao molho de soja um odor desagradável (FUKUSHIMA, 1985); além disto, diminui o tempo de cultivo de 72 horas para 48 horas. O controle de temperatura do equipamento de cultivo automático é realizado através de sistemas de ar refrigerado com umidificadores para manter o *koji* com a umidade ideal para o crescimento do fungo e a produção de enzimas.

2.8 PRINCIPAIS ENZIMAS PRODUZIDAS DURANTE A FABRICAÇÃO DO KOJI.

2.8.1 PROTEASES

As enzimas proteolíticas ocorrem em abundância na natureza e podem ser de origem animal (pepsina, renina, tripsina, quimiotripsina), vegetal (papaína, bromelina, ficina) ou microbiana (fúngica, bacteriana) (KLING, et al., 1982); (YAMAMOTO, 1975); (WHITAKER, 1994).

As enzimas proteolíticas são essenciais na fabricação de molho de soja, uma vez que degradam as proteínas das matérias primas em peptídeos e aminoácidos (NAKADAI, et al. 1972 a, b).

As proteases microbianas, de acordo com sua faixa de pH ótimo de atuação são divididas em alcalinas, neutras e ácidas (BERGKVIST, 1963); (FORGATY & GRIFFIN, 1974); (KEAY, 1971).

As proteases alcalinas são amplamente obtidas a partir de fungos e bactérias, são estáveis na faixa de pH de 5,0 a 10,0 e apresentam atuação ótima na faixa de pH de 9,5 a 10,5. São inibidas por diisopropilfluorofosfato (DFP) e não são inibidas pelo inibidor de tripsina da soja, agentes quelantes e sulfidrilas (FORGATY & GRIFFIN, 1974); (KEAY, 1971); (KELLY & FORGATY, 1976).

As proteases neutras têm pH ótimo de atuação entre 7,0 e 8,0 e são sensíveis a agentes quelantes, tais como EDTA e a o-fenantrolina, mas não são inibidas por DFP ou sulfidrilas. A estabilidade situa-se na faixa de pH entre 6,0 a 9,0 decrescendo rapidamente fora dela (FORGATY & GRIFFIN, 1974). SEKINE, (1972) mostrou que a inativação térmica destas enzimas ocorre a 55 °C sendo termicamente estáveis até 45 °C.

As proteases ácidas apresentam melhor atividade a valores baixos de pH entre 2,0 a 5,0 e são estáveis à ação de sulfidrilas, agentes quelantes, metais pesados e ao DFP. A estabilidade de

atuação está situada, na maior parte dos casos na faixa de 2,0 a 6,0 sendo rapidamente inativadas a valores maiores.

As principais aplicações das enzimas proteolíticas, na indústria de alimentos estão relacionadas à sua utilização na produção de molho de soja e outros produtos orientais fermentados, na produção de biscoitos, na melhoria da consistência da massa de pão, etc.

2.8.2 AMILASES

As amilases são enzimas que hidrolisam o amido e são classificadas em três grupos, considerando-se as formas de ação e diferentes produtos obtidos do amido, como a α -amilase, a β -amilase e a glicoamilase (YAMAMOTO, 1995). As amilases podem ser obtidas de animais, vegetais e microorganismos.

As amilases, de um modo geral, hidrolisam as ligações do tipo α -1,4 existentes no amido; as mais importantes são α -amilase, β -amilase e glicoamilase.

A α -amilase (α -1,4 glucan-4-gluconohidrolase), hidrolisa o amido de modo aleatório a partir das posições mais internas da cadeia polimérica. A α -amilase atua sobre a amilose do amido em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose, enquanto a segunda permite a formação de glicose e maltose. A hidrólise da amilopectina do amido pela α -amilase resulta em glicose, maltose e α -dextrinas limites. O pH de atividade máxima desta enzima situa-se entre 4,5 e 7,0, sendo que a estabilidade da mesma frente a este parâmetro é aumentada pela presença de Ca^{+2} no meio da reação (VITOLO, 2001).

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi verificar a influência da concentração inicial de inóculo, da proporção do meio de cultura soja:milho e soja:trigo, da temperatura e tempo de fermentação no crescimento microbiano e na atividade enzimática da primeira etapa de obtenção de molho de soja, *koji*.

Adicionalmente, realizou-se uma análise de custo parcial do molho de soja com base nos resultados obtidos nos experimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada neste trabalho foi a soja da variedade comercial UFV-18, o milho da variedade Zenica 8501 e o trigo comprado na zona cerealista de São Paulo. As variedades de soja e milho foram escolhidas por serem facilmente encontradas comercialmente e com custo acessível. Há diversas variedades de soja com altos teores de nitrogênio que estão sendo desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA)/Soja em Londrina, porém não eram ainda comercialmente viáveis no início deste trabalho.

4.1.1 TRATAMENTO DA SOJA

Uma quantidade de 10,0 g ou 12,0 g de soja da variedade UFV-18, conforme as proporções de matérias primas foi colocada em erlenmeyer de 250 ml e intumescida em 50,0 ml de água potável por 10 horas. Após este período a água foi escoada por aproximadamente 30 minutos. Os erlenmeyers foram tampados com tampão de algodão, com aproximadamente 10 gramas, encobertos com gaze e colocados em autoclave vertical modelo 103 da Fabbe-Primar. A soja foi cozida a pressão de 2 atm por 5 minutos (IRIE, 1977) e um rápido resfriamento após o tempo de cozimento.

4.1.2 TRATAMENTO DO MILHO E TRIGO

Cerca de 10,0 g ou 8,0 g de milho da variedade Zenica 8501 ou trigo foi torrado por 1 minuto a temperatura de 160 °C em pipoqueira America's Kitchen modificada para ter regulagem de temperatura. O

milho e o trigo foram resfriados até a temperatura ambiente e triturado em moinho de disco. A granulometria foi controlada pelos tamises de 20 e 30 mesh de modo que foi obtida uma amostra de 0% de retido em tamis de 20 mesh e 55% de retido em tamis 30 mesh. A amostra total foi utilizada nos ensaios (FUJITA, et al., 1977). O milho ou o trigo torrado e moído foi colocado em béquer de 250 ml e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C.

4.2 MICROORGANISMO

Neste trabalho foi empregada uma cultura de *Aspergillus oryzae* de uma cepa comercial.

A cultura de *Aspergillus oryzae* foi conservada em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) que tem a seguinte composição:

Infusão de batata	200,0g
Dextrose	20,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada qsp	1000,0 ml

No momento do uso, fundiu-se o ágar, resfriou-se a 45-50 °C e adicionou-se uma quantidade suficiente de solução aquosa de ácido tartárico a 10 % esterilizada para obter pH final 3,5 (SILVA, et al., 1997).

Para conservação das culturas puras, foram realizados repiques de dois em dois meses, colocando-se 8 ml de meio de cultura acima descrito, em tubos de ensaio de 180 mm x 15 mm. Os tubos foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos e resfriados inclinados para completa solidificação do meio de cultura. Após a solidificação a inoculação foi realizada com auxílio de uma alça metálica de platina. Uma vez inoculados, os tubos foram incubados a 30 °C por 5 dias e em seguida guardados em geladeira.

4.2.1 PREPARO DO INÓCULO

Em todos os ensaios foi realizado o preparo de uma suspensão concentrada de esporos a qual foi preparada da seguinte forma:

Em um erlenmeyer de 250 ml de capacidade foi colocado cerca de 50,0 ml de meio PDA, o qual foi fechado com rodilhão de algodão hidrófobo e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

A inoculação do meio contido no erlenmeyer foi feita a partir de um tubo de cultura pura preparada no item 4.2 no qual foi adicionado cerca de 3,0 ml de água destilada esterilizada. Os esporos foram suspensos com auxílio de uma alça metálica de platina. O conteúdo de cada tubo foi transferido para o erlenmeyer. A seguir, incubou-se o frasco, durante 5 dias a 30 °C. Após este período, em cada erlenmeyer foram adicionados 50,0 ml de solução de Tween 40, na concentração 15,0 mg/L, e mais um conjunto de pérolas de vidro previamente esterilizadas. Procedeu-se uma agitação manual por um minuto. Esta suspensão foi então, filtrada primeiramente através de uma gaze esterilizada e a seguir através de 1,0 g de lã de vidro esterilizada compactada em volume de 9,3 cm³ em um tubo de vidro de 2,3 cm de diâmetro previamente esterilizado (MARTINS, 1973). Homogeneizou-se o conteúdo deste erlenmeyer por meio de uma agitação vigorosa e retirou-se uma alíquota da suspensão para a contagem de esporos como descrito no item 4.2.2.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS NA SUSPENSÃO

A partir da alíquota da suspensão de esporos coletada, foi determinada a concentração de esporos da seguinte forma:

- a) A alíquota coletada foi diluída em tubo de ensaio na proporção 1:4 com água destilada;
- b) A amostra diluída foi homogeneizada por agitação em vórtice;
- c) Preparou-se a amostra em câmara de Neubauer 1/400 mm², composta por 2 reticulados;
- d) A câmara foi levada ao microscópio óptico e procedeu-se à contagem, utilizando-se uma lente de aumento de 400 vezes;
- e) A contagem foi realizada em 8 campos uniformemente distribuída por um dos reticulados da câmara,
- f) Repetiu-se a contagem para o segundo reticulado da câmara.

Dessa forma, foi contado um total de 16 campos, procurando-se manter o número total de esporos contados superior a 500, para se ter uma boa precisão nos resultados conforme recomendação de (DACIE & LEWIS, 1995). Cada campo possui uma área de 1/25 mm² e é composto por 16 campos maiores de 1/400 mm²

O cálculo de concentração de esporos na suspensão foi realizado da seguinte forma:

$$C_{\text{susp}} = \frac{D_a \times N}{V_{\text{campo}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

C_{susp} = concentração de esporos na suspensão (esporos/ml)

D_a = Fator de diluição ($D_a=5$)

N = número médio de esporos nos campos de 1/25 mm²

V_{campo} = volume do campo da área de 1/25 mm² e espessura de 0,1 mm de filme líquido ($V_{\text{campo}} = 4,0 \times 10^{-6}$ ml)

4.3 MEIOS DE CULTIVO PARA A FERMENTAÇÃO

Para a realização dos ensaios de fermentação, foram empregados os meios de cultivo com a seguinte composição:

TABELA 4.3.1: Meios de cultivo para fermentação (a)

Matéria Prima	Proporção	
	50:50	60:40
Soja	10,0 g	12,0 g
Milho	10,0 g	8,0g

TABELA 4.3.2: Meios de cultivo para fermentação (b)

Matéria Prima	Proporção	
	50:50	60:40
Soja	10,0 g	12,0 g
Trigo	10,0 g	8,0 g

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS DO KOJI

4.4.1 PREPARO DA AMOSTRA

Após o tempo de fermentação, três erlenmeyers com cerca de 20,0 g da amostra cada foram retirados da estufa Fabbe-Primar modelo 219 e a massa total individual foi triturada em liquidificador em velocidade média por um tempo de 30 segundos.

4.4.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DA AMOSTRA

Cerca de 1,0 g da amostra foi pesada em pesa-filtro de 44 mm de diâmetro e 45 mm de altura e colocado em estufa a 104 °C por 4 horas, após os quais, o pesa-filtro foi fechado ainda dentro da estufa

e transferido para um dessecador. Esperou-se atingir a temperatura ambiente e realizou-se uma pesagem. Novamente, a amostra foi colocada à temperatura de 104 °C por 1 hora para confirmar a estabilidade das pesagens. O pesa-filtro foi fechado ainda dentro da estufa e transferido para um dessecador. Esperou-se atingir a temperatura ambiente e realizou-se uma nova pesagem. Realizou-se o procedimento acima até atingir a estabilidade de peso das amostras. Calculou-se a porcentagem de umidade.

4.4.3 DETERMINAÇÃO DO pH DO KOJI

Cerca de 5,0 g da amostra foi pesada e colocada em béquer de 250 ml. Adicionou-se 100,0 ml de água destilada e aqueceu-se até a fervura em bico de Bunsen por 2 minutos. Resfriou-se e filtrou-se em papel (MEEI, Y.L., & CHENG, C.C 1996) . Então o pH foi medido a 20 °C diretamente em pHmetro digital Digimed Mod. DM20.

4.4.4 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

A determinação da massa micelial na cultura foi estimada pela determinação da quantidade de glucosamina (SAKURAI et al ., 1977).

4.4.4.1 REAGENTES

a) Solução de ácido sulfúrico a 60% (18,46N)

Diluiu-se 342,0 ml de ácido sulfúrico concentrado em cerca de 500 ml água destilada, resfriou-se e então completou-se o volume para 1000,0 ml com água destilada.

b) Solução de Hidróxido de Sódio 1,0N

Pesou-se 40,0 g de hidróxido de sódio e dissolveu-se em 500 ml de água destilada isenta de gás carbônico, resfriou-se e completou-se o volume para 1000,0 ml com água destilada isenta de gás carbônico em balão volumétrico.

c) Reagente de Ehrlich

Dissolveu-se 0,8 g de p-dimetilaminobenzaldeído em 30,0 ml de etanol e 30,0 ml de HCl concentrado em béquer de 100 ml e armazenou-se em geladeira.

d) Solução de acetilacetona a 2% (v/v)

Esta solução foi preparada momentos antes de ser utilizada. Em balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 2,0 ml de acetilacetona e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 0,5N para 100,0 ml em balão volumétrico.

e) Solução de Carbonato de Sódio 0,5N.

Pesou-se cerca de 26,5 g de carbonato de sódio, dissolveu-se e completou-se o volume com água destilada para 1000,0 ml em balão volumétrico .

4.4.4.2 PROCEDIMENTO

Pesou-se 0,5 g de amostra seca triturada em liquidificador, em um tubo de ensaio de 200 mm x 18 mm, adicionou-se 2,0 ml de ácido

sulfúrico a 60% e deixou-se em repouso por 24 horas a 25 °C. Após este período o tubo foi fechado com 4 camadas de “parafilm” e autoclavado a 1,0 kg/cm² por 1 hora. O tubo foi resfriado e a solução foi transferida quantitativamente para um erlenmeyer de 125 ml e diluída cuidadosamente em cerca de 18,5 vezes com água destilada. O erlenmeyer foi fechado com 4 camadas de “parafilm” e uma rolha de borracha e autoclavado a 1,0 kg/cm² por 1 hora. Resfriou-se a solução, neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 1,0 N (até pH=7,0), filtrou-se e diluiu-se para 100,0 ml em balão volumétrico. Pipetou-se volumetricamente 2,0 ml da solução diluída, colocou-se em tubo de Thurnberg e adicionou-se volumetricamente 2,0 ml de acetilacetona a 2% preparada momentos antes do uso. Aqueceu-se a 96 °C por 20 minutos, resfriou-se a temperatura ambiente, adicionou-se 20,0 ml de álcool etílico 96 °GL e 2,0 ml de reagente de Ehrlich. Deixou-se em repouso por 45-60 minutos e leu-se a absorbância a 530 nm contra um branco.

Uma curva de calibração com glucosamina foi feita para converter as leituras de absorbância em concentração.

4.4.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) PRESENTES NO MEIO DE CULTURA

Para esta determinação adaptou-se o método proposto por BITTMAN (1974), resultando no procedimento abaixo. Optou-se por esta metodologia para facilitar o controle do processo nas indústrias pois é um método relativamente rápido.

4.4.5.1 PREPARO DA AMOSTRA

Cerca de 10,0 g da amostra preparada no item 4.4.1 foi pesada em erlenmeyer de 500 ml e adicionou-se 200,0 ml de solução salina

a 1,0%. Deixou-se por 2 horas em agitador orbital a 100 rpm a 20 °C. Filtrou-se em papel Whatman n ° 1, transferiu-se e completou-se o volume com água destilada para 250,0 ml em balão volumétrico (CHENG & JIN, 1995). A partir de 1,0 ml da solução obtida mediu-se o teor de açúcares redutores expressos em teor de glicose. O resultado foi expresso em miligramas de glicose por grama de matéria seca (gms). O restante da solução foi usada para analisar a atividade enzimática das proteases e α -amilase.

4.4.5.2 REAGENTES

a) Reagente de Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Pesou-se 10,0 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, e dissolveu-se em 200,0 ml de solução de hidróxido de sódio 2,0N. Em cerca de 500,0 ml de água destilada, dissolveu-se 300,0 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio). Misturou-se as duas soluções e ajustou-se o volume com água destilada para 1000,0 ml em balão volumétrico.

4.4.5.3 PROCEDIMENTO DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Adicionou-se 1,0 ml da amostra obtida em 4.4.5.1 em tubo de ensaio 200 mm X 18 mm, 1,0 ml do reagente DNS e colocou-se em banho-maria em ebulição durante 5 minutos. Após este tempo resfriou-se rapidamente o tubo em banho de gelo, adicionou-se 10,0 ml de água destilada e leu-se a absorbância a 540 nm contra um branco.

A curva de calibração foi construída com solução de glicose aplicando-se o procedimento acima descrito. A solução de glicose padrão foi preparada a partir de glicose p.a. seca.

4.4.6 EXTRAÇÃO DE ENZIMAS PARA AS DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.

As enzimas do *koji* foram extraídas do meio de cultivo conforme procedimento descrito no item 4.4.5.1. O filtrado foi utilizado como solução enzimática para análises de atividades enzimáticas de α -amilase e proteases.

4.4.7 DETERMINAÇÃO DA α -AMILASE

Para a determinação das atividades da α -amilases foi empregado o método abaixo proposto por IADEROZA & BALDINI, (1991).

4.4.7.1 REAGENTES

a) Tampão fosfato dissódico 0,02M, pH 6,9 contendo 6 mM de NaCl.

Em um béquer de 250ml pesou-se 0,7 g de fosfato dissódico anidro e 0,035 g de cloreto de sódio. Dissolveu-se em água destilada, ajustou-se o pH para 6,9 com solução de ácido cítrico 0,1M, transferiu-se a solução para balão volumétrico de 100,0 ml e completou-se o volume com água destilada.

b) Solução de Amido a 1%

Pesou-se 1,0 g de amido solúvel (Merck) em béquer de 100ml, dissolveu-se em 50,0 ml de tampão fosfato dissódico 0,02M, pH 6,9, contendo 6mM de NaCl e aqueceu-se em

banho-maria a 70 °C por 10 minutos. Após este tempo resfriou-se a 20 °C, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água destilada.

c) Reagente de Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Pesou-se 10,0 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, e dissolveu-se em 200,0 ml de solução de hidróxido de sódio 2,0N. Em cerca de 500,0 ml de água destilada, dissolveu-se 300,0 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio). Misturou-se as duas soluções e ajustou-se o volume com água destilada para 1000,0 ml em balão volumétrico.

4.4.7.2 PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE α -AMILASE

A 0,5 ml de amostra, adicionou-se 0,5 ml de solução de amido solúvel a 1% e incubou-se a 25 °C durante 3 minutos. Adicionou-se 1,0 ml de reagente DNS e deixou-se em banho-maria em ebulição durante 5 minutos e resfriou-se a 25°C rapidamente em banho de gelo. Acrescentou-se 10,0 ml de água destilada e leu-se a absorbância a 540 nm contra um branco para cada amostra.

A curva de calibração foi construída com solução de maltose aplicando-se o procedimento acima descrito. A solução de maltose foi preparada a partir de maltose p.a. seca.

Uma unidade de atividade é definida com a atividade da enzima que libera 1 μ mol de grupos redutores, calculados como maltose, por minuto, a 25 °C.

4.4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS PROTEASES

A determinação da atividade proteolítica das amostras foi realizada conforme modificações da metodologia proposta por KUNITZ, (1947).

4.4.8.1 REAGENTES

a) Solução de Caseína do Leite a 1,5%

Pesou-se 1,5 g de caseína do leite e dissolveu-se em 60,0 ml de fosfato dissódico, misturando e aquecendo a 60 – 70 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, acertou-se o pH para 7,0 com solução de ácido cítrico 0,1M. Ajustou-se o volume para 100 ml em balão volumétrico com solução tampão de McIlvaine. Adicionou-se gotas de tolueno sobre a superfície e armazenou-se a 5 °C. A solução é estável por 1 semana.

b) Solução de fosfato dissódico 0,2M

Pesou-se 71,0 g de fosfato dissódico anidro, dissolveu-se e completou-se o volume para 1000,0 ml em balão volumétrico com água destilada.

c) Solução de ácido cítrico 0,1M

Pesou-se 21,0 g de ácido cítrico monohidratado, dissolveu-se e completou-se o volume para 1000,0 ml em balão volumétrico com água destilada.

d) Solução Tampão McIlvaine

Acertou-se o pH de 100 ml da solução de fosfato dissódico 0,2M para pH 7,0 com solução de ácido cítrico 0,1M.

e) Ácido Tricloroacético 0,4M (TCA)

Pesou-se 65,4 g de ácido tricloroacético, dissolveu-se e completou-se o volume em balão volumétrico para 1000 ml.

f) Solução Padrão de Tirosina

Pesou-se 200,0 mg de L-Tirosina pura, dissolveu-se em balão volumétrico de 1000 ml com HCl 0,05M. Pipetou-se volumetricamente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 ml desta solução, colocou-se em respectivos balões volumétricos de 10,0 ml, completou-se o volume com HCl 0,05M. As concentrações das soluções padrões ficaram 20,0, 40,0, 60,0, 80,0 e 100,0 µg/ml.

4.4.8.2 PROCEDIMENTO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES

Adicionou-se volumetricamente 1,0 ml de solução de caseína a 1,5% e 1,0 ml de água destilada a um tubo de ensaio de 200 mm x 18 mm e levou-se a um banho-maria a 35 °C. Após 5 minutos adicionou-se volumetricamente 1,0 ml de solução enzimática. Após 10 minutos, adicionou-se 3,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,4M para cessar a reação. Deixou-se em repouso por 30 minutos e filtrou-se em papel Whatman 42. Fez-se um branco para cada amostra adicionando o TCA antes da solução enzimática e fez-se a leitura da absorbância a 280 nm. Uma curva de calibração com tirosina foi feita para converter as leituras em unidades de atividade.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ g de tirosina nas condições especificadas.

4.5 PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS

Para um melhor entendimento das condições dos ensaios, apresentamos na tabela 4.5.1, um resumo dos ensaios que foram realizados em replicas de três.

Tabela 4.5.1: Condições dos experimentos

Ensaio No.	Inóculo Esporos/gms	Quantidade de Matéria Prima (g)			Temperatura (°C)
		Soja	Milho	Trigo	
1	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	30
2	10 ⁸	10,0	10,0	0	30
3	10 ⁶	10,0	10,0	0	30
4	10 ⁴	10,0	10,0	0	30
5	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	35
6	10 ¹⁰	12,0	8,0	0	35
7	10 ¹⁰	10,0	0	10,0	35
8	10 ¹⁰	12,0	0	8,0	35
9	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	30
10	10 ¹⁰	12,0	8,0	0	30
11	10 ¹⁰	10,0	0	10,0	30
12	10 ¹⁰	12,0	0	8,0	30
13	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	25
14	10 ¹⁰	12,0	8,0	0	25
15	10 ¹⁰	10,0	0	10,0	25
16	10 ¹⁰	12,0	0	8,0	25
17	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	35/25

Continuação

Ensaio No.	Inóculo Esporos/gms	Quantidade de Matéria Prima (g)			Temperatura (°C)
		Soja	Milho	Trigo	
18	10 ¹⁰	12,0	8,0	0	35/25
19	10 ¹⁰	10,0	0	10,0	35/25
20	10 ¹⁰	12,0	0	8,0	35/25
21	10 ¹⁰	10,0	10,0	0	30/25
22	10 ¹⁰	12,0	8,0	0	30/25
23	10 ¹⁰	10,0	0	10,0	30/25
24	10 ¹⁰	12,0	0	8,0	30/25

4.5.1 COMENTÁRIOS SOBRE AS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS DA TABELA 4.5.1

Nos ensaios de números 1 a 4 utilizamos somente o meio com soja e milho na proporção de 50:50 uma vez que o estudo visou a utilização destas matérias primas na fabricação do *koji*. A temperatura utilizada foi a de 30 °C devido orientação do fornecedor da cepa para uma melhor produção das enzimas. Nas tabelas 6.1.1 a 6.1.4 e figuras 6.1.1 a 6.1.8 estão expostos os resultados experimentais destes ensaios.

Nos ensaios números 5 a 16 inclusive, variamos as concentrações das matérias primas e a temperatura, mantendo-se fixa a concentração de inóculo e o tempo de fermentação de 56 horas. As matérias primas utilizadas foram soja e milho e soja e trigo nas proporções 50:50 e 60:40. As temperaturas estudadas foram de 35 °C, 30 °C, 25 °C Nas tabelas 6.2.1 a 6.2.12 e figuras de 6.2.1 a 6.2.24 estão expostos os resultados experimentais destes ensaios.

Nos ensaios 17 a 24 estudou-se a fermentação em duas etapas contínuas de temperaturas na seqüência:

- a) 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas.
- b) 30 °C por 24 horas seguidas 25 °C por mais 32 horas.

As matérias primas e suas proporções foram as mesmas utilizadas nos ensaios de 5 a 16. Nas tabelas 6.2.13 a 6.2.20 e figuras 6.2.25 a 6.2.40 estão expostos os resultados experimentais destes ensaios.

4.6 ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Para realização dos ensaios escolheu-se um *Aspergillus oryzae* para produção de *koji* em 48 horas segundo o fornecedor da cepa. Contudo, para verificar se a informação do fornecedor estava correta, a fermentação foi realizada em 56 horas.

Para analisar a influência da concentração de inóculo de *Aspergillus oryzae* sobre a produção de protease e α -amilase em meio de cultura com soja e milho na proporção 50:50 foi elaborada a tabela 7.1.1 na pág. 90 . Os dados das atividades enzimáticas foram convertidos em produtividade. A produtividade média (P_m) obtida em cada ensaio deu uma idéia de velocidade média de formação de um dado produto ou produtos e foi calculada pela expressão descrita abaixo:

$$P_m = \frac{E_t - E_i}{t_t - t_i} \quad (U/gms.h) \quad \text{Equação 2}$$

onde:

P_m = Produtividade média

E_i = Atividade enzimática na hora zero

E_t = Atividade enzimática na hora da amostragem

t_i = tempo inicial de fermentação

t_t = tempo de fermentação na hora da amostragem

5. ENSAIO PADRÃO DE FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação foram realizados conforme o esquema apresentado na figura 5.1.

O preparo do meio de cultivo foi realizado em erlenmeyer de 250 ml. Adicionou-se o milho ou trigo à soja cozida nas proporções descritas nas tabelas 4.3.1 e 4.3.2 e misturou-se vigorosamente. A cada frasco inoculou-se 1ml de solução de esporos conforme obtido no item 4.2.1. Os frascos então foram colocados em estufa em temperatura controlada (vide 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3).

Dentro das proporções de soja e trigo ou soja e milho, foi escolhida a 60:40 para compensar o fato de se utilizar soja em grão.

O andamento das fermentações foi seguido através de determinações da variação da atividade enzimática de proteases e α -amilase, concentração de açúcares redutores, teor de umidade, pH e crescimento micelial em função do tempo de fermentação. Os ensaios foram feitos em réplicas de três em um total de 24 frascos por ensaio.

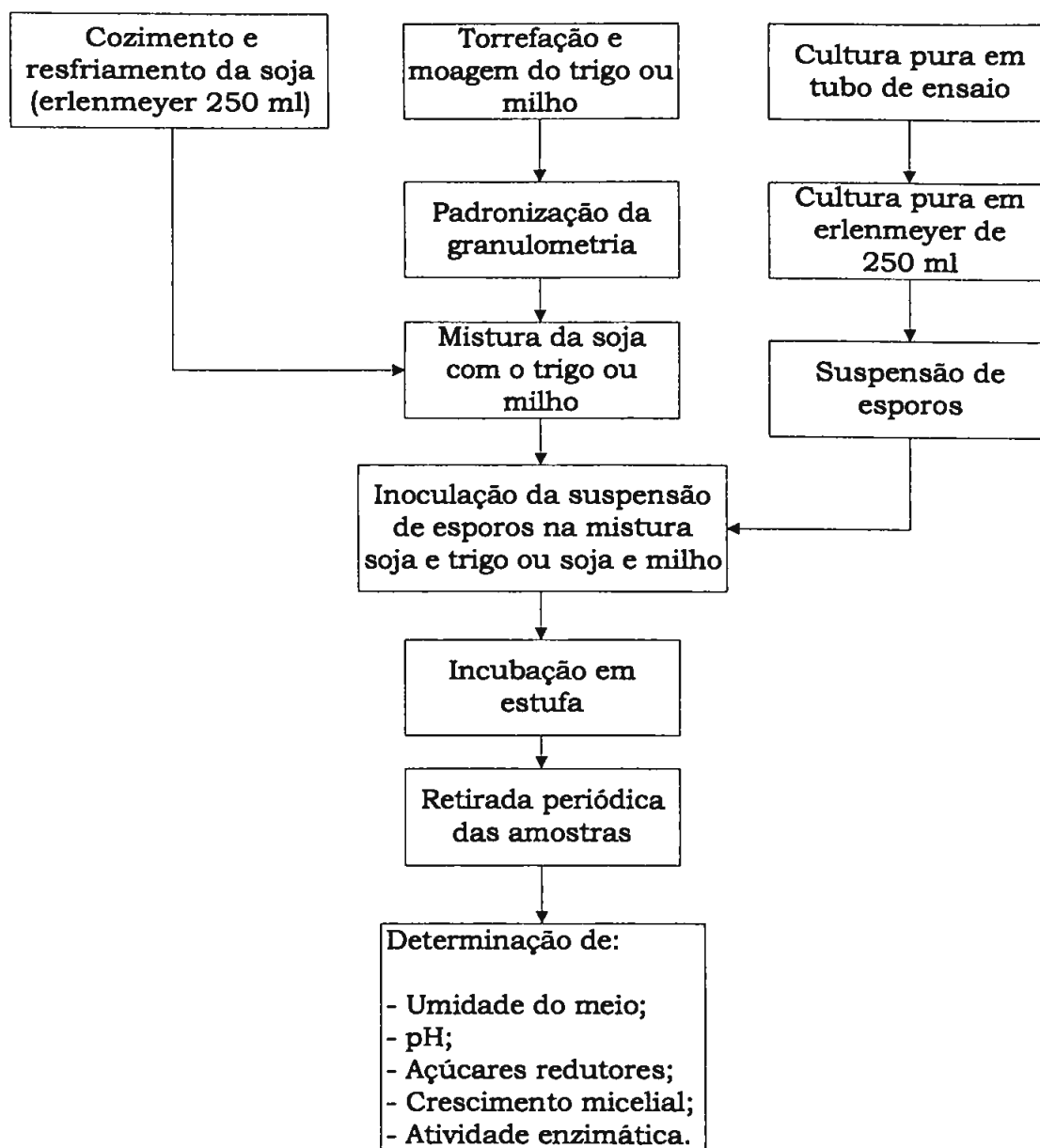


FIGURA 5.1. Fluxograma de ensaio padrão de fermentação

5.1 SEQUÊNCIA DOS ENSAIOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS NO CULTIVO DO KOJI

5.1.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO

O inóculo foi preparado conforme os itens 4.2.1 e 4.2.2 nas concentrações de 10^{10} , 10^8 , 10^6 e 10^4 esporos por grama de matéria seca (gms), inoculado sobre a mistura de soja e milho na proporção 50:50 e colocado em estufa a 30°C.

5.1.2 EFEITO DA PROPORÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA

As proporções de soja e milho ou soja e trigo utilizadas para os ensaios foram de 50:50 e 60:40 em relação às matérias primas. Nestes ensaios utilizou somente a concentração ideal de inóculo determinada no ensaio do item 5.1.1.

5.1.3 EFEITO DA TEMPERATURA E TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Para verificação do efeito da temperatura e tempo na produção de enzimas foram estudadas as seguintes temperaturas, 25 °C, 30 °C, 35 °C em um tempo de 56 horas. Também foram realizados ensaios em duas etapas contínuas de temperaturas na seqüência:

- a) 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por 32 horas.
- b) 30 °C por 24 horas seguidas 25 °C por 32 horas

Todos os ensaios foram realizados com as misturas anteriormente definidas no item 5.1.2

6. RESULTADOS

TABELA 6.1.1.1: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 1.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glicosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,53 $\pm$ 0,02	42,85 $\pm$ 0,45	9,43 $\pm$ 0,40
8	0,32 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	35,30 $\pm$ 0,91	6,68 $\pm$ 0,01	45,10 $\pm$ 0,53	10,39 $\pm$ 0,63
12	0,53 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	85,74 $\pm$ 1,00	6,50 $\pm$ 0,04	48,14 $\pm$ 0,54	23,61 $\pm$ 0,55
24	1,47 $\pm$ 0,05	19,11 $\pm$ 0,50	162,36 $\pm$ 0,85	6,22 $\pm$ 0,03	47,04 $\pm$ 0,49	46,95 $\pm$ 0,64
32	2,99 $\pm$ 0,47	118,04 $\pm$ 1,40	222,40 $\pm$ 0,92	6,21 $\pm$ 0,03	45,31 $\pm$ 0,53	50,03 $\pm$ 0,74
36	4,80 $\pm$ 0,59	957,15 $\pm$ 1,27	217,70 $\pm$ 0,84	6,16 $\pm$ 0,03	45,90 $\pm$ 0,48	68,49 $\pm$ 1,00
48	7,27 $\pm$ 0,37	1486,12 $\pm$ 3,61	499,33 $\pm$ 1,10	6,59 $\pm$ 0,01	46,84 $\pm$ 0,47	63,62 $\pm$ 1,12
56	10,87 $\pm$ 0,90	1480,70 $\pm$ 11,68	632,56 $\pm$ 1,00	6,52 $\pm$ 0,01	46,52 $\pm$ 0,49	62,03 $\pm$ 0,83

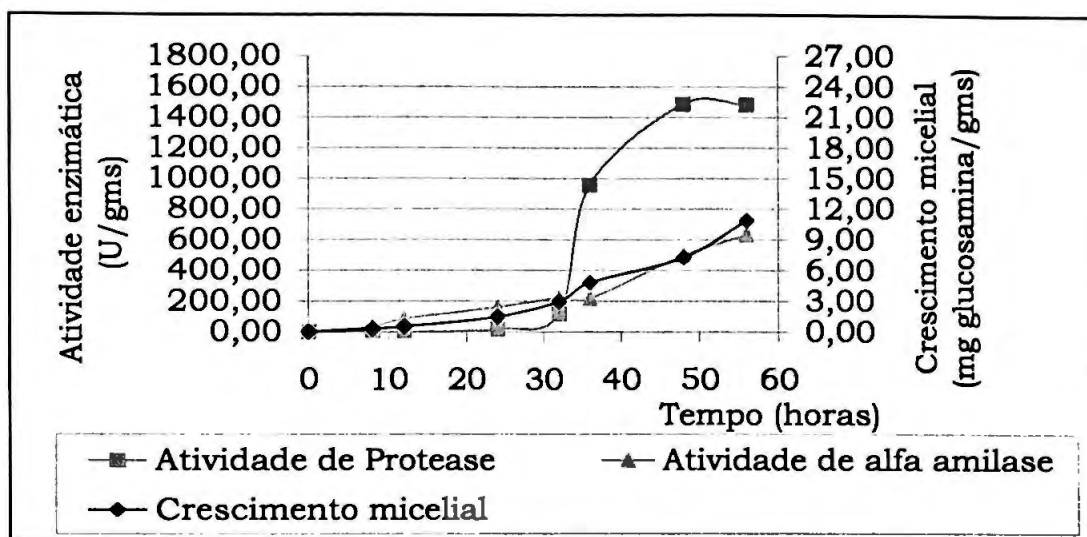


FIGURA 6.1.1: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no.1, onde a concentração de inóculo foi de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

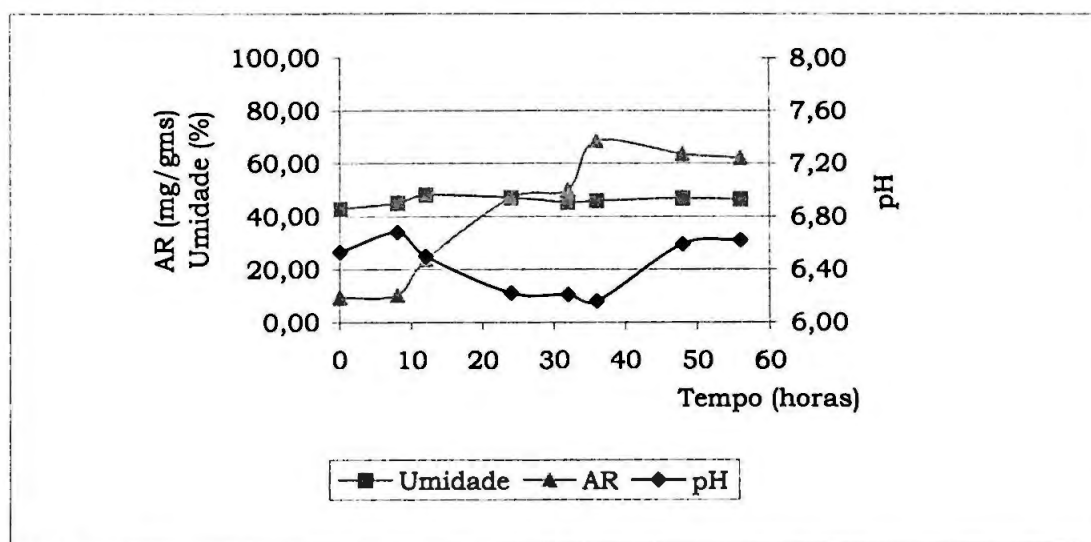


FIGURA 6.1.2: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 1, onde a concentração de inóculo foi de 10^{10} esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

TABELA 6.1.2: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^8 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 2.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,02	42,96 $\pm$ 0,49	9,15 $\pm$ 0,34	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,55 $\pm$ 0,03	47,63 $\pm$ 0,55	10,17 $\pm$ 0,66	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,53 $\pm$ 0,02	44,68 $\pm$ 0,45	9,83 $\pm$ 0,49	
24	0,09 $\pm$ 0,01	12,70 $\pm$ 0,85	27,90 $\pm$ 0,93	6,49 $\pm$ 0,01	42,98 $\pm$ 0,59	26,59 $\pm$ 0,88	
32	1,18 $\pm$ 0,06	79,06 $\pm$ 2,81	99,71 $\pm$ 0,69	6,22 $\pm$ 0,03	45,41 $\pm$ 0,60	46,66 $\pm$ 0,73	
36	1,97 $\pm$ 0,20	781,77 $\pm$ 2,40	140,82 $\pm$ 0,65	6,22 $\pm$ 0,01	43,76 $\pm$ 0,49	58,40 $\pm$ 0,70	
48	6,24 $\pm$ 0,39	1064,82 $\pm$ 5,01	178,95 $\pm$ 0,66	6,46 $\pm$ 0,01	48,33 $\pm$ 0,57	58,58 $\pm$ 0,76	
56	6,29 $\pm$ 0,31	1405,39 $\pm$ 9,42	465,90 $\pm$ 1,07	6,59 $\pm$ 0,02	49,23 $\pm$ 0,57	62,61 $\pm$ 0,99	

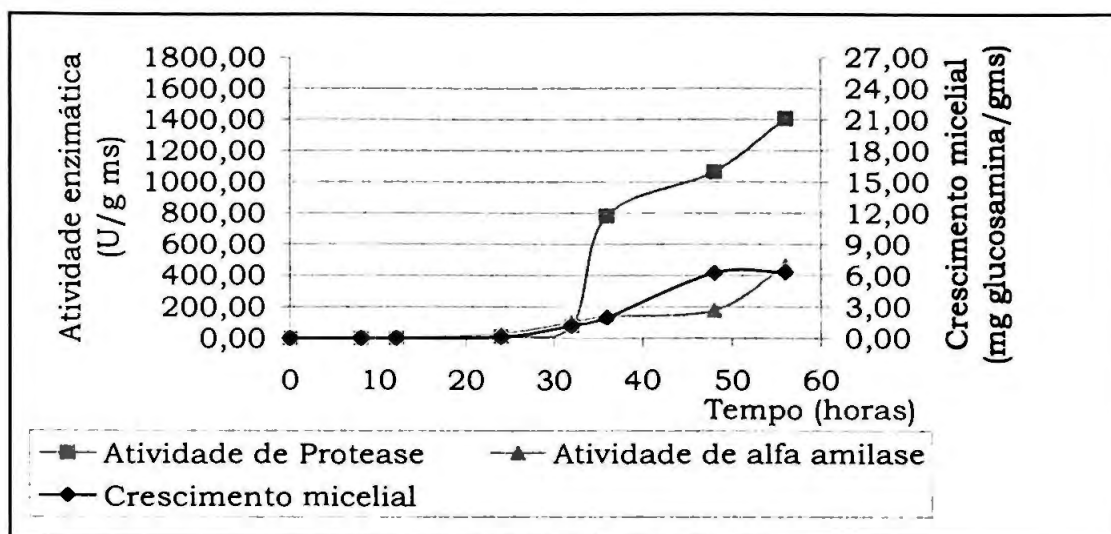


FIGURA 6.1.3: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no.2, onde a concentração de inóculo foi de 10^8 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

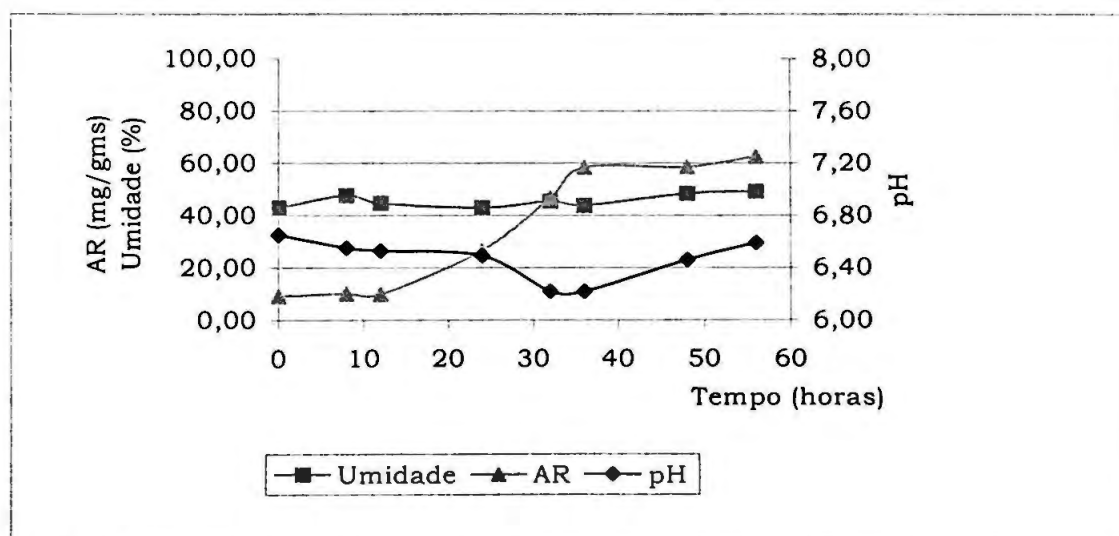


FIGURA 6.1.4: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 2, onde a concentração de inóculo foi de 10^8 esporos /gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

TABELA 6.1.3: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^6 esporos/gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 3.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,01	42,58 $\pm$ 0,48	9,35 $\pm$ 0,58
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,56 $\pm$ 0,01	45,94 $\pm$ 0,56	9,15 $\pm$ 0,45
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,49 $\pm$ 0,01	46,62 $\pm$ 0,56	16,51 $\pm$ 0,66
24	0,00 $\pm$ 0,00	9,30 $\pm$ 0,44	0,00 $\pm$ 0,00	6,44 $\pm$ 0,03	46,37 $\pm$ 0,57	10,69 $\pm$ 0,86
32	0,40 $\pm$ 0,11	25,12 $\pm$ 0,44	47,98 $\pm$ 0,69	6,35 $\pm$ 0,04	46,44 $\pm$ 0,47	28,33 $\pm$ 0,80
36	0,85 $\pm$ 0,05	117,18 $\pm$ 1,24	97,03 $\pm$ 0,87	6,23 $\pm$ 0,02	48,23 $\pm$ 0,58	61,12 $\pm$ 0,84
48	3,73 $\pm$ 0,18	654,32 $\pm$ 5,49	108,32 $\pm$ 0,85	6,26 $\pm$ 0,01	49,08 $\pm$ 0,46	60,49 $\pm$ 0,81
56	4,67 $\pm$ 0,27	1083,46 $\pm$ 7,93	328,05 $\pm$ 1,00	6,29 $\pm$ 0,02	50,23 $\pm$ 0,48	61,75 $\pm$ 0,89

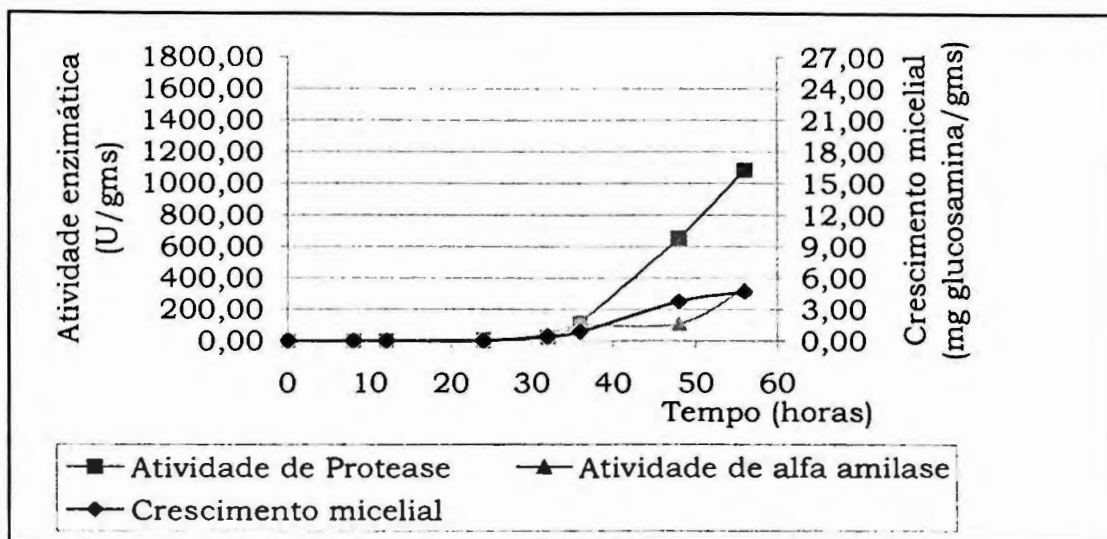


FIGURA 6.1.5: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 3, onde a concentração de inóculo foi de 10^6 esporos /gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

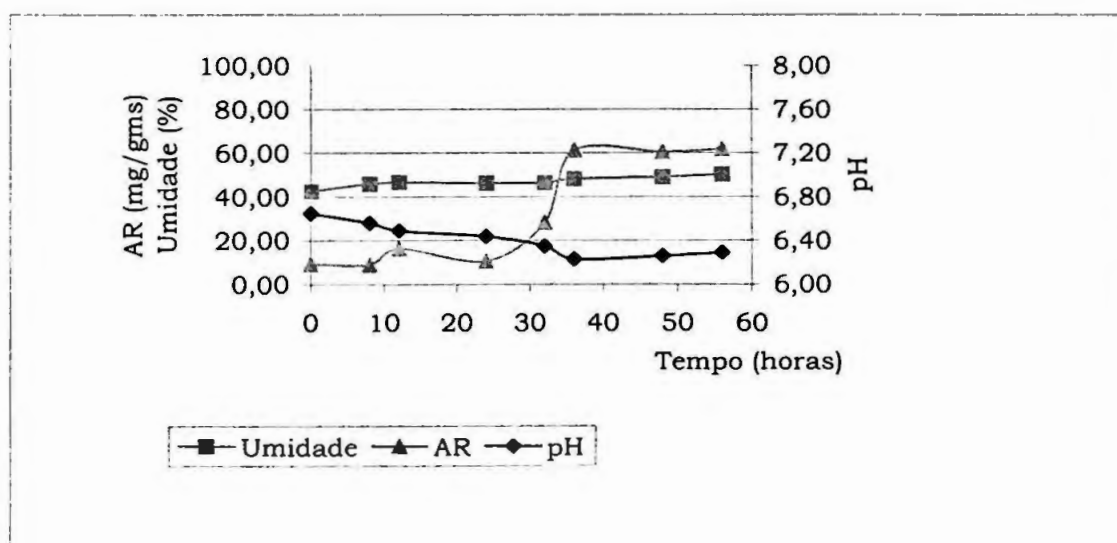


FIGURA 6.1.6: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 3, onde a concentração de inóculo foi de 10^6 esporos /gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50

TABELA 6.1.4: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio do efeito da concentração inicial de inóculo de 10^4 esporos em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50. Ensaio 4 .

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,90 $\pm$ 0,02	43,95 $\pm$ 0,55	9,30 $\pm$ 0,21	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,57 $\pm$ 0,01	47,91 $\pm$ 0,46	9,43 $\pm$ 0,29	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,52 $\pm$ 0,01	49,75 $\pm$ 0,48	7,48 $\pm$ 0,36	
24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,54 $\pm$ 0,01	45,24 $\pm$ 0,55	10,62 $\pm$ 0,53	
32	0,39 $\pm$ 0,08	6,24 $\pm$ 0,10	44,04 $\pm$ 0,46	6,59 $\pm$ 0,01	46,78 $\pm$ 0,40	16,99 $\pm$ 0,45	
36	0,96 $\pm$ 0,10	24,63 $\pm$ 0,73	67,74 $\pm$ 0,62	6,46 $\pm$ 0,01	47,16 $\pm$ 0,64	49,36 $\pm$ 0,51	
48	3,86 $\pm$ 0,08	122,39 $\pm$ 0,90	85,36 $\pm$ 0,76	6,12 $\pm$ 0,01	49,05 $\pm$ 0,49	58,63 $\pm$ 0,39	
56	4,09 $\pm$ 0,12	748,33 $\pm$ 4,47	194,94 $\pm$ 1,04	6,25 $\pm$ 0,01	49,56 $\pm$ 0,51	65,37 $\pm$ 0,51	

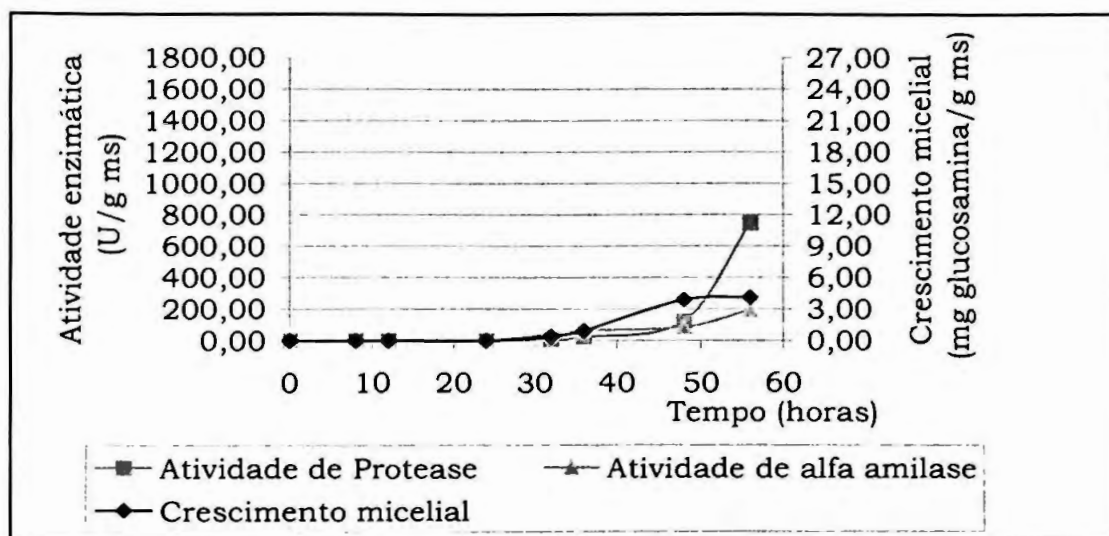


FIGURA 6.1.7: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 4, onde a concentração de inóculo foi de 10^4 esporos /gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

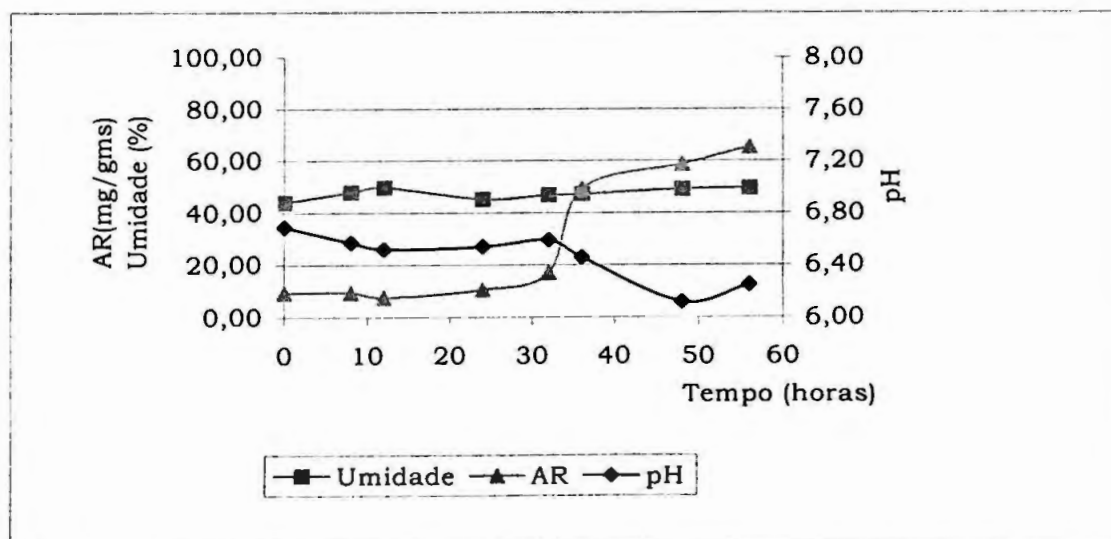


FIGURA 6.1.8: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 4, onde a concentração de inóculo foi de 10^4 esporos /gms em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50

TABELA 6.2.1: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 5.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,01	43,56 $\pm$ 0,48	9,35 $\pm$ 0,29	
8	0,35 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,00	38,02 $\pm$ 0,42	6,70 $\pm$ 0,03	45,73 $\pm$ 0,41	14,42 $\pm$ 0,39	
12	1,34 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,00	90,56 $\pm$ 0,70	6,61 $\pm$ 0,03	46,48 $\pm$ 0,40	24,34 $\pm$ 0,49	
24	1,92 $\pm$ 0,16	41,30 $\pm$ 0,54	125,63 $\pm$ 0,74	6,50 $\pm$ 0,03	46,86 $\pm$ 0,67	49,52 $\pm$ 0,39	
32	5,55 $\pm$ 0,30	147,85 $\pm$ 0,63	146,12 $\pm$ 0,88	6,84 $\pm$ 0,01	49,11 $\pm$ 0,66	52,32 $\pm$ 0,45	
36	14,51 $\pm$ 0,39	992,72 $\pm$ 2,75	185,19 $\pm$ 0,98	6,87 $\pm$ 0,01	51,38 $\pm$ 0,45	59,95 $\pm$ 0,54	
48	16,12 $\pm$ 0,42	1335,70 $\pm$ 6,75	390,30 $\pm$ 1,09	7,37 $\pm$ 0,03	55,53 $\pm$ 0,50	73,67 $\pm$ 0,59	
56	20,57 $\pm$ 0,67	1351,34 $\pm$ 5,99	582,02 $\pm$ 1,31	6,83 $\pm$ 0,01	54,25 $\pm$ 0,54	29,39 $\pm$ 0,53	

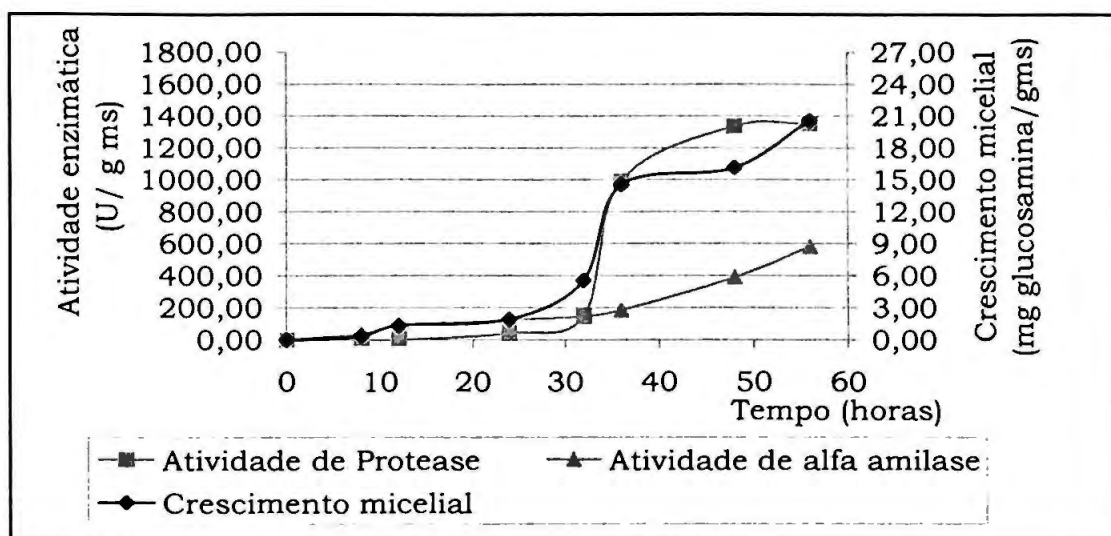


FIGURA 6.2.1: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 5 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

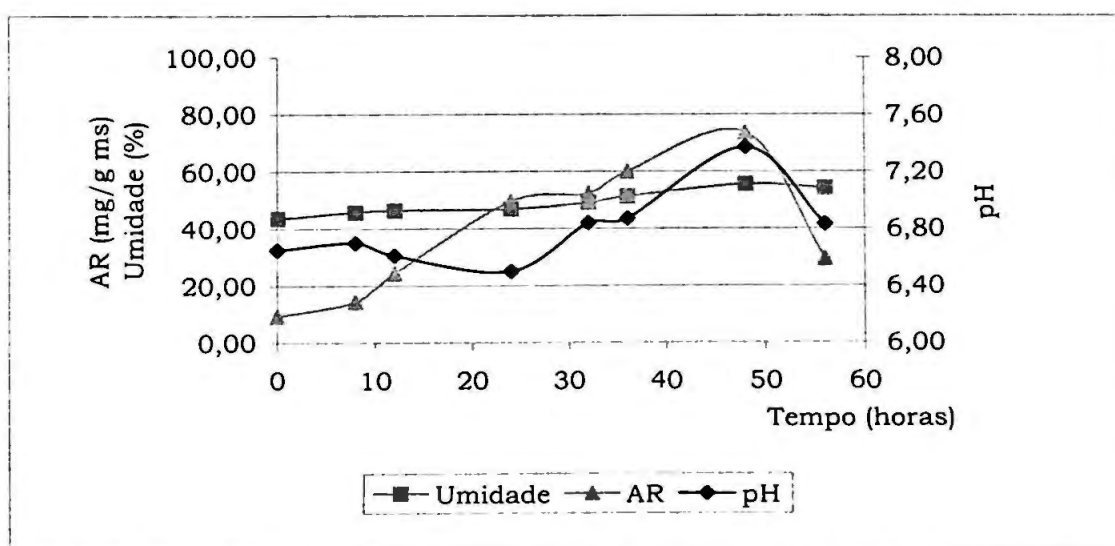


FIGURA 6.2.2: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 5 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms

TABELA 6.2.2: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 6.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,64 $\pm$ 0,01	43,82 $\pm$ 0,34	9,23 $\pm$ 0,48	
8	0,99 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	37,26 $\pm$ 0,41	6,94 $\pm$ 0,01	49,18 $\pm$ 0,50	23,31 $\pm$ 0,49	
12	1,32 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00	88,49 $\pm$ 0,45	6,67 $\pm$ 0,01	49,09 $\pm$ 0,46	33,58 $\pm$ 0,49	
24	1,82 $\pm$ 0,06	48,64 $\pm$ 0,59	139,85 $\pm$ 0,63	6,71 $\pm$ 0,01	49,37 $\pm$ 0,58	61,19 $\pm$ 0,73	
32	8,23 $\pm$ 0,19	180,41 $\pm$ 1,82	166,41 $\pm$ 0,84	6,92 $\pm$ 0,02	52,61 $\pm$ 0,42	45,13 $\pm$ 0,64	
36	13,86 $\pm$ 0,31	1304,48 $\pm$ 5,02	261,41 $\pm$ 1,53	6,84 $\pm$ 0,03	51,82 $\pm$ 0,53	47,27 $\pm$ 0,49	
48	15,96 $\pm$ 0,29	1267,25 $\pm$ 4,55	582,87 $\pm$ 1,25	7,45 $\pm$ 0,01	54,45 $\pm$ 0,43	51,12 $\pm$ 0,66	
56	19,82 $\pm$ 0,37	1251,14 $\pm$ 4,12	626,30 $\pm$ 1,66	7,11 $\pm$ 0,01	56,69 $\pm$ 0,45	34,07 $\pm$ 0,44	

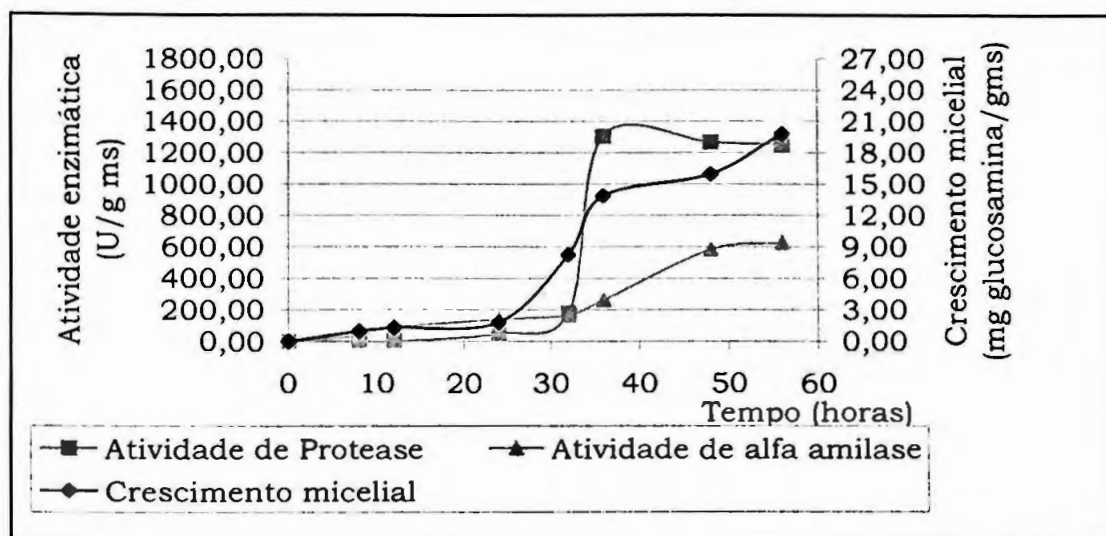


FIGURA 6.2.3: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 6 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

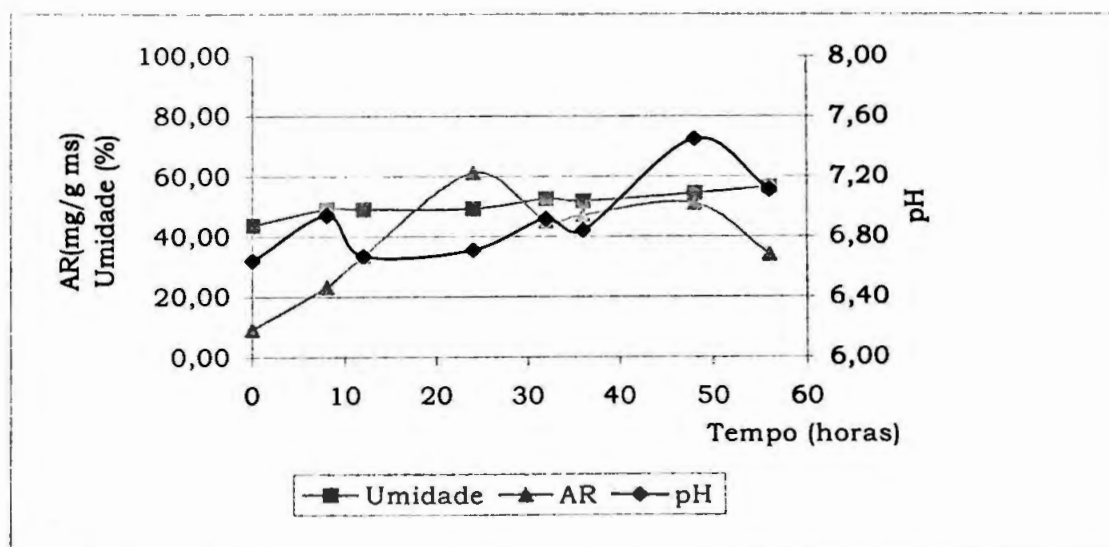


FIGURA 6.2.4: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 6 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.3: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 7.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α-amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,68 ± 0,01	42,63 ± 0,55	9,25 ± 0,45	
8	0,88 ± 0,05	0,00 ± 0,00	40,96 ± 0,35	6,74 ± 0,03	45,70 ± 0,56	14,27 ± 0,41	
12	1,58 ± 0,07	0,00 ± 0,00	91,96 ± 0,43	6,75 ± 0,02	44,84 ± 0,49	47,10 ± 0,50	
24	3,82 ± 0,15	23,30 ± 0,25	155,43 ± 0,63	6,63 ± 0,03	45,86 ± 0,57	91,14 ± 0,53	
32	5,58 ± 0,18	93,37 ± 0,35	271,37 ± 0,76	6,47 ± 0,01	46,93 ± 0,65	99,08 ± 0,47	
36	10,89 ± 0,31	991,61 ± 0,91	372,15 ± 1,37	6,65 ± 0,01	50,45 ± 0,55	72,84 ± 0,64	
48	19,79 ± 0,40	1090,16 ± 5,79	537,16 ± 1,84	6,94 ± 0,01	53,21 ± 0,52	82,70 ± 0,51	
56	23,60 ± 0,50	1135,04 ± 4,14	622,81 ± 1,17	6,70 ± 0,01	54,11 ± 0,44	46,41 ± 0,45	

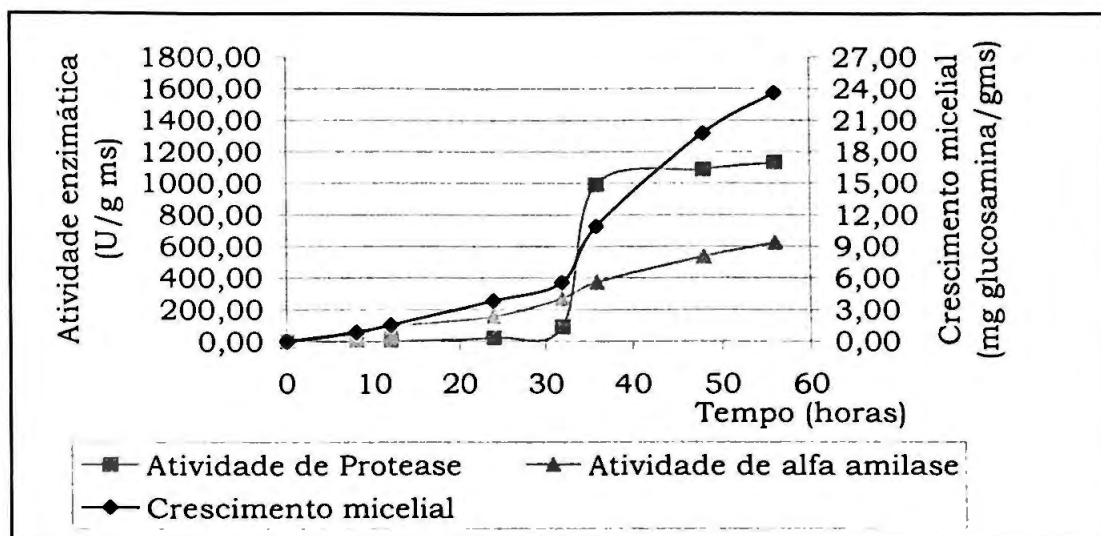


FIGURA 6.2.5: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 7 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

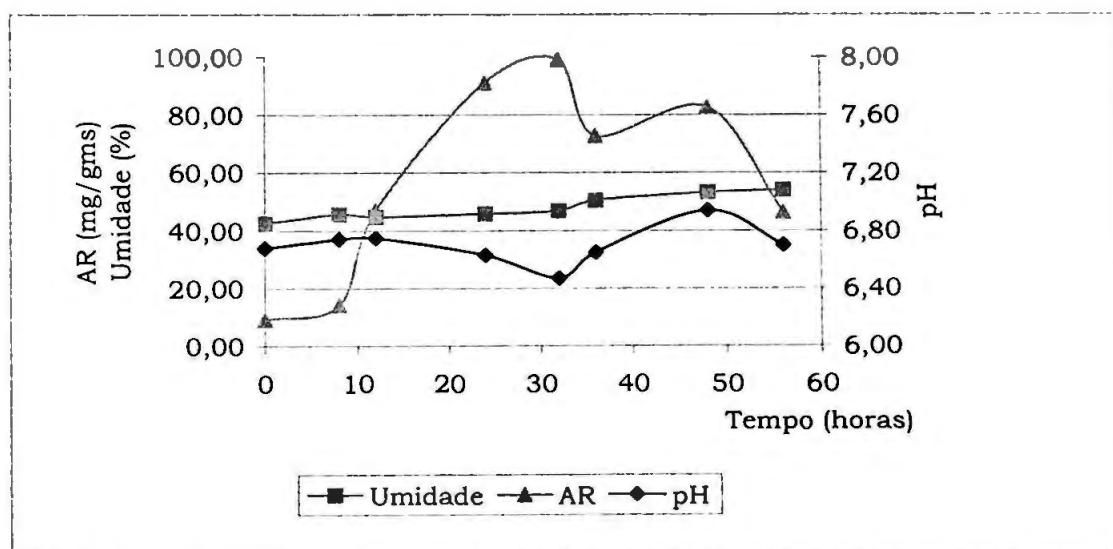


FIGURA 6.2.6: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 7 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.4: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 35 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 8.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α-amilase (U/gms)			
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,67 ± 0,01	44,05 ± 0,69	9,16 ± 0,33
8	0,99 ± 0,05	0,00 ± 0,00	38,21 ± 0,36	6,71 ± 0,01	47,79 ± 0,54	15,23 ± 0,36
12	1,27 ± 0,04	0,00 ± 0,00	90,19 ± 0,38	6,71 ± 0,01	48,09 ± 0,50	22,30 ± 0,57
24	6,52 ± 0,06	30,10 ± 0,48	143,87 ± 0,38	6,44 ± 0,01	48,66 ± 0,64	88,30 ± 0,77
32	9,86 ± 0,10	114,63 ± 0,50	317,34 ± 1,01	6,39 ± 0,01	54,29 ± 0,53	90,70 ± 1,09
36	17,04 ± 0,28	1329,19 ± 6,79	349,96 ± 1,20	6,67 ± 0,02	54,48 ± 0,48	57,09 ± 0,44
48	23,79 ± 0,49	1221,21 ± 4,25	511,72 ± 1,44	7,03 ± 0,04	57,52 ± 0,45	64,45 ± 0,39
56	24,68 ± 0,46	1334,17 ± 4,24	663,05 ± 1,09	6,76 ± 0,02	58,08 ± 0,61	26,03 ± 0,62

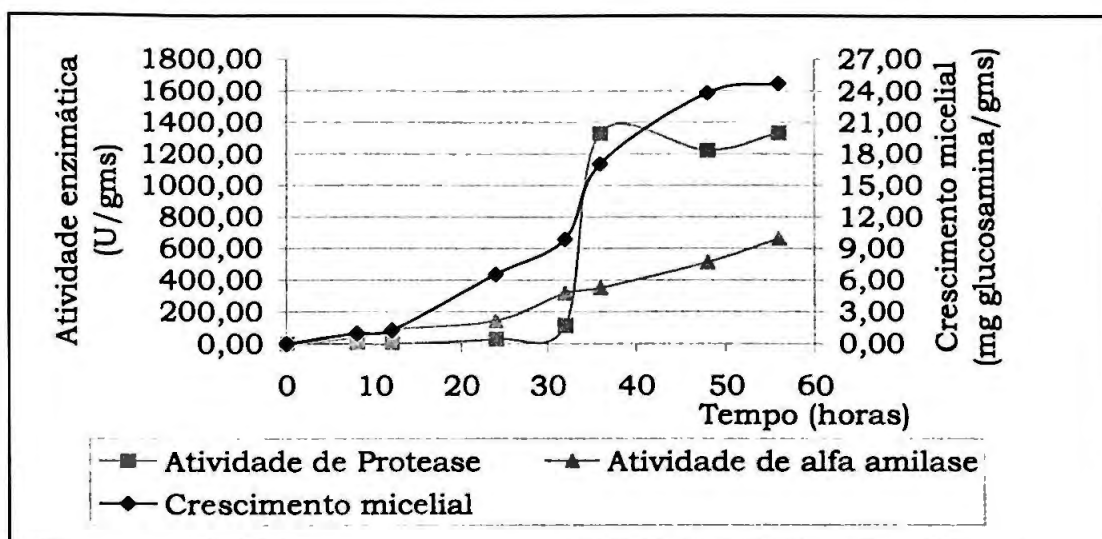


FIGURA 6.2.7: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 8 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

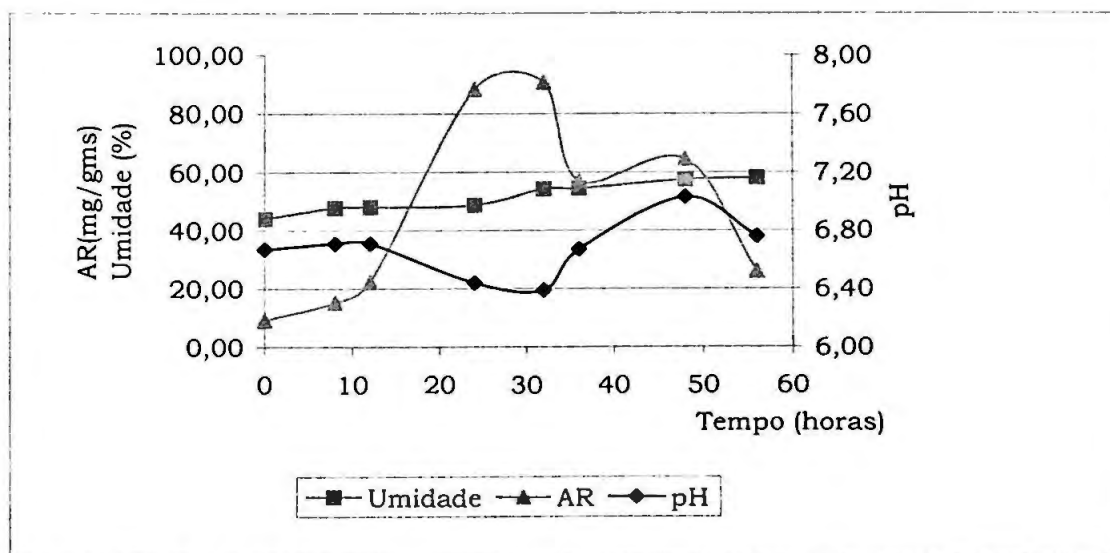


FIGURA 6.2.8: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 8 em temperatura de 35 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.5: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 9

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,02	43,38 $\pm$ 0,52	9,20 $\pm$ 0,31
8	0,30 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	37,89 $\pm$ 0,50	6,54 $\pm$ 0,01	46,49 $\pm$ 0,33	9,94 $\pm$ 0,43
12	0,55 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,00	82,35 $\pm$ 0,75	6,57 $\pm$ 0,01	46,81 $\pm$ 0,34	23,84 $\pm$ 0,54
24	1,58 $\pm$ 0,09	19,14 $\pm$ 0,14	159,65 $\pm$ 0,81	6,63 $\pm$ 0,02	47,52 $\pm$ 0,37	46,83 $\pm$ 0,57
32	2,82 $\pm$ 0,10	113,56 $\pm$ 0,91	223,25 $\pm$ 1,19	6,36 $\pm$ 0,02	47,80 $\pm$ 0,50	50,89 $\pm$ 0,51
36	4,13 $\pm$ 0,07	956,67 $\pm$ 1,80	219,39 $\pm$ 0,92	6,33 $\pm$ 0,03	48,34 $\pm$ 0,53	68,48 $\pm$ 0,64
48	8,42 $\pm$ 0,41	1489,41 $\pm$ 4,02	527,54 $\pm$ 1,00	6,33 $\pm$ 0,01	48,48 $\pm$ 0,39	62,91 $\pm$ 0,54
56	10,95 $\pm$ 0,61	1497,28 $\pm$ 4,43	622,34 $\pm$ 1,61	6,52 $\pm$ 0,01	50,04 $\pm$ 0,57	62,83 $\pm$ 0,62

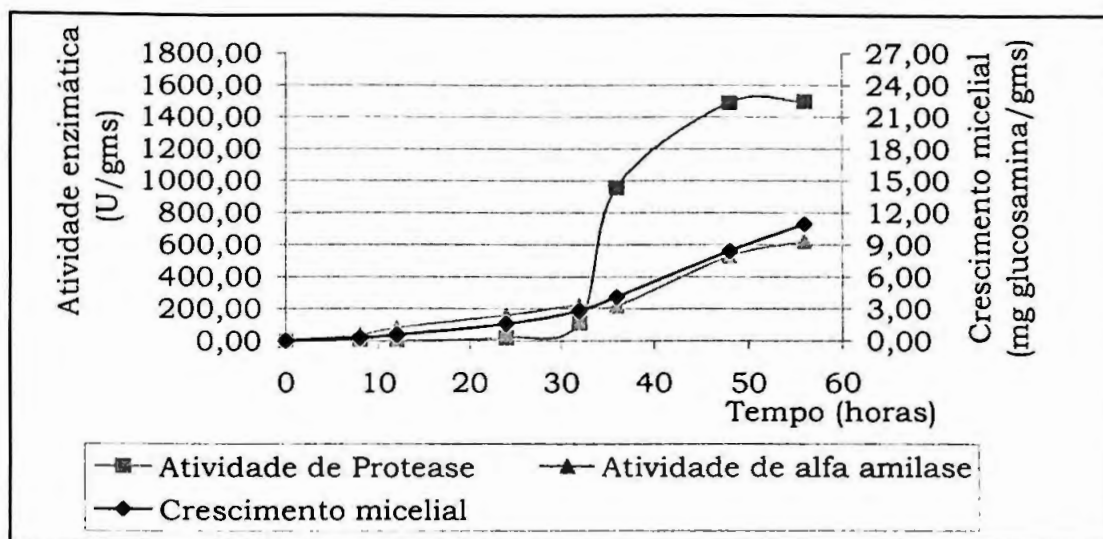


FIGURA 6.2.9: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 9 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

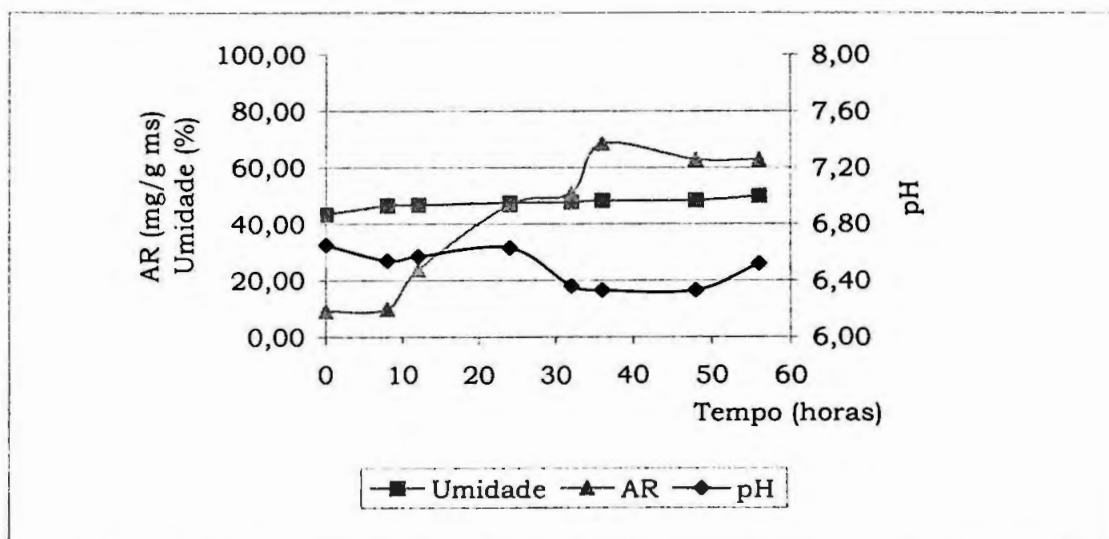


FIGURA 6.2.10: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 9 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

TABELA 6.2.6: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 10.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,64 $\pm$ 0,01	44,25 $\pm$ 0,45	9,36 $\pm$ 0,18
8	0,55 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	35,32 $\pm$ 0,39	6,66 $\pm$ 0,02	49,58 $\pm$ 0,57	25,63 $\pm$ 0,31
12	1,04 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	80,23 $\pm$ 0,88	6,64 $\pm$ 0,02	49,68 $\pm$ 0,61	44,51 $\pm$ 0,44
24	1,69 $\pm$ 0,11	20,72 $\pm$ 0,23	146,32 $\pm$ 0,88	6,66 $\pm$ 0,01	49,01 $\pm$ 0,43	47,48 $\pm$ 0,58
32	3,72 $\pm$ 0,07	157,23 $\pm$ 0,73	203,08 $\pm$ 1,04	6,42 $\pm$ 0,03	50,65 $\pm$ 0,47	41,97 $\pm$ 0,46
36	6,24 $\pm$ 0,09	1338,39 $\pm$ 4,51	217,83 $\pm$ 1,03	6,37 $\pm$ 0,02	51,42 $\pm$ 0,47	47,92 $\pm$ 0,54
48	9,69 $\pm$ 0,13	1553,45 $\pm$ 5,04	497,90 $\pm$ 0,94	6,37 $\pm$ 0,01	51,83 $\pm$ 0,57	48,90 $\pm$ 0,53
56	11,32 $\pm$ 0,11	1575,53 $\pm$ 6,20	633,16 $\pm$ 1,30	6,35 $\pm$ 0,01	53,82 $\pm$ 0,66	54,12 $\pm$ 0,51

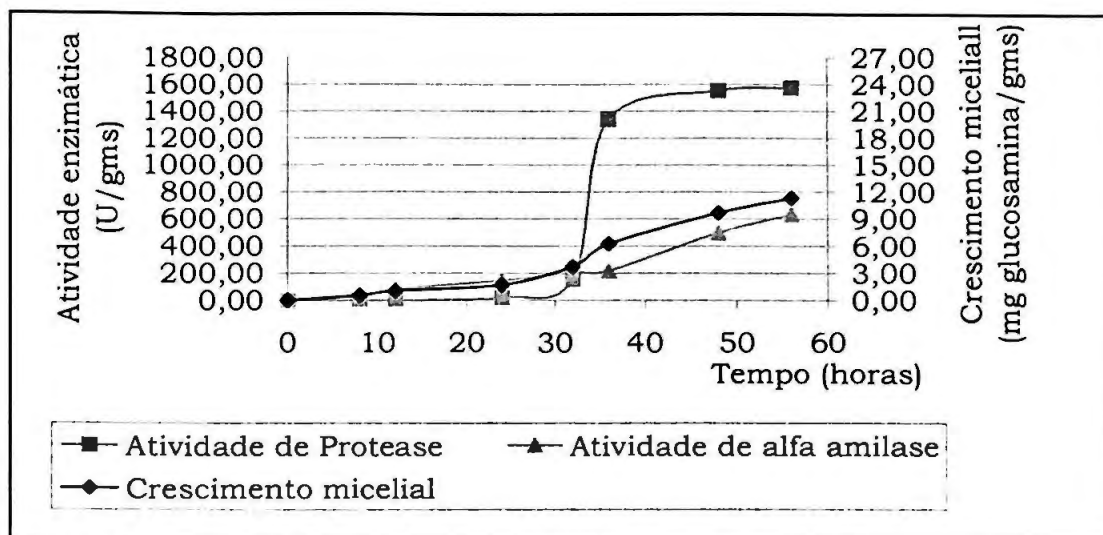


FIGURA 6.2.11: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 10 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

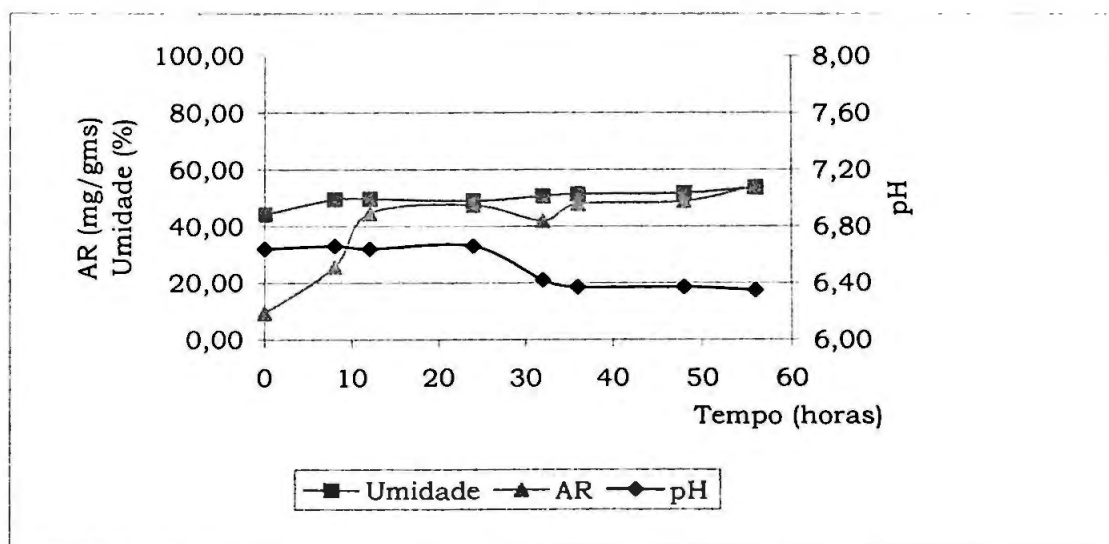


FIGURA 6.2.12: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 10 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

TABELA 6.2.7: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 11.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,69 $\pm$ 0,03	42,35 $\pm$ 0,43	9,13 $\pm$ 0,26
8	0,29 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	38,99 $\pm$ 0,48	6,66 $\pm$ 0,02	47,31 $\pm$ 0,69	15,58 $\pm$ 0,43
12	0,45 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,00	84,32 $\pm$ 0,74	6,62 $\pm$ 0,01	45,56 $\pm$ 0,42	24,01 $\pm$ 0,44
24	1,90 $\pm$ 0,05	21,84 $\pm$ 0,18	169,55 $\pm$ 0,78	6,58 $\pm$ 0,03	46,39 $\pm$ 0,43	58,24 $\pm$ 0,48
32	5,59 $\pm$ 0,23	96,03 $\pm$ 0,56	266,41 $\pm$ 0,98	6,43 $\pm$ 0,01	47,62 $\pm$ 0,36	76,62 $\pm$ 0,58
36	6,77 $\pm$ 0,11	787,82 $\pm$ 2,63	333,80 $\pm$ 1,08	6,36 $\pm$ 0,01	48,80 $\pm$ 0,66	78,51 $\pm$ 0,63
48	12,46 $\pm$ 0,40	1279,12 $\pm$ 4,53	576,78 $\pm$ 1,33	6,36 $\pm$ 0,01	49,55 $\pm$ 0,46	74,23 $\pm$ 0,61
56	13,52 $\pm$ 0,76	1324,11 $\pm$ 5,10	656,94 $\pm$ 1,59	6,33 $\pm$ 0,02	50,20 $\pm$ 0,33	70,23 $\pm$ 0,61

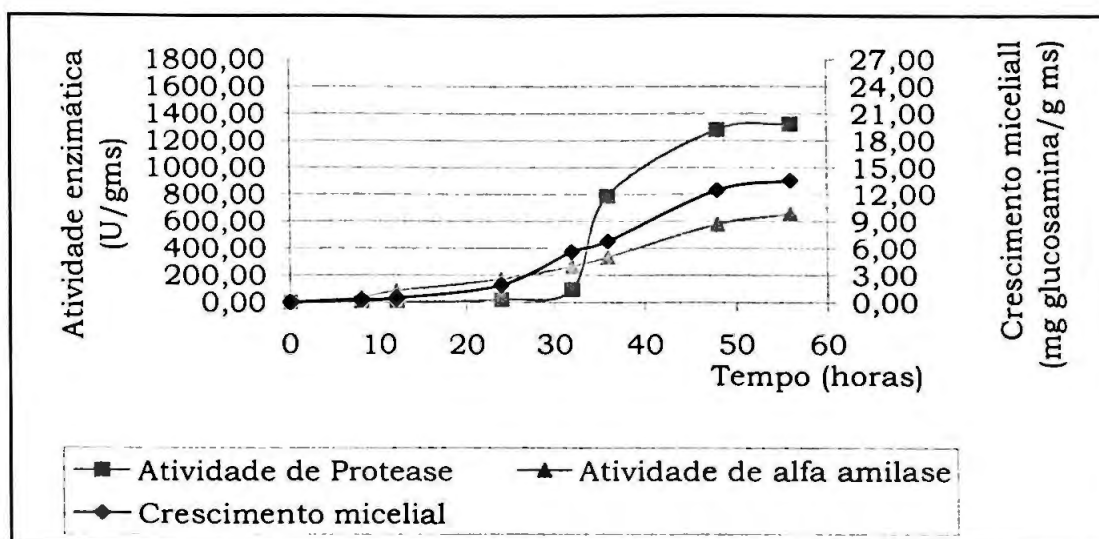


FIGURA 6.2.13: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 11 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

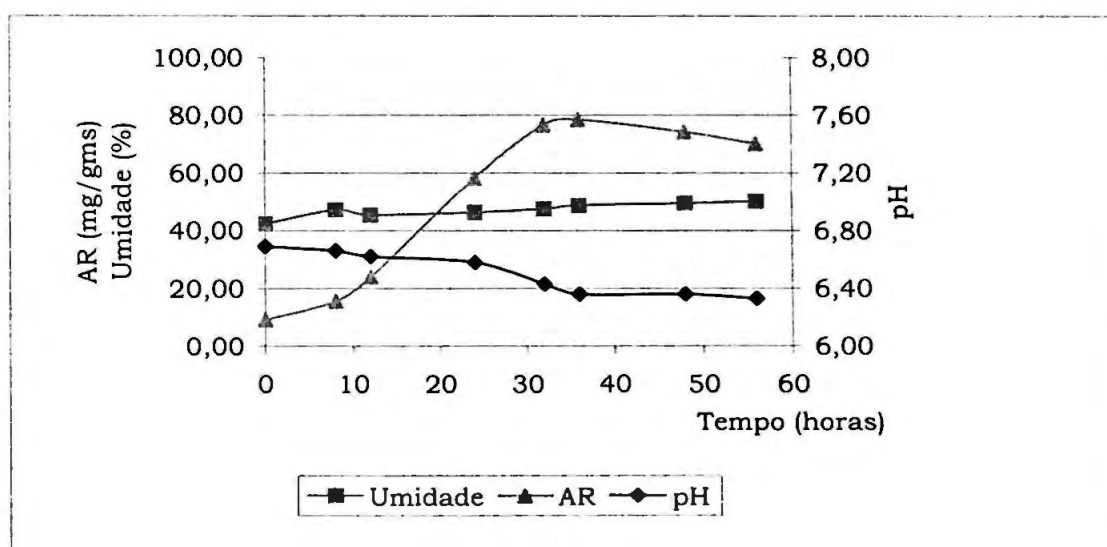


FIGURA 6.2.14: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 11 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.8: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 30 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 12.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,69 $\pm$ 0,01	43,86 $\pm$ 0,58	9,15 $\pm$ 0,13
8	0,76 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00	37,88 $\pm$ 0,41	6,73 $\pm$ 0,02	48,37 $\pm$ 0,46	17,42 $\pm$ 0,29
12	0,71 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	83,53 $\pm$ 0,44	6,65 $\pm$ 0,03	47,69 $\pm$ 0,43	21,56 $\pm$ 0,36
24	2,66 $\pm$ 0,06	16,04 $\pm$ 0,18	156,32 $\pm$ 0,66	6,66 $\pm$ 0,02	48,65 $\pm$ 0,44	61,15 $\pm$ 0,41
32	7,59 $\pm$ 0,12	34,82 $\pm$ 0,21	206,68 $\pm$ 0,75	6,39 $\pm$ 0,03	50,10 $\pm$ 0,57	70,08 $\pm$ 0,38
36	10,02 $\pm$ 0,44	919,00 $\pm$ 2,01	258,19 $\pm$ 0,81	6,27 $\pm$ 0,03	50,78 $\pm$ 0,59	71,18 $\pm$ 0,33
48	12,29 $\pm$ 0,43	1427,44 $\pm$ 4,30	321,94 $\pm$ 1,20	6,27 $\pm$ 0,01	51,73 $\pm$ 0,46	61,40 $\pm$ 0,43
56	13,25 $\pm$ 0,51	1467,62 $\pm$ 4,92	641,85 $\pm$ 1,89	6,32 $\pm$ 0,03	53,60 $\pm$ 0,43	55,95 $\pm$ 0,44

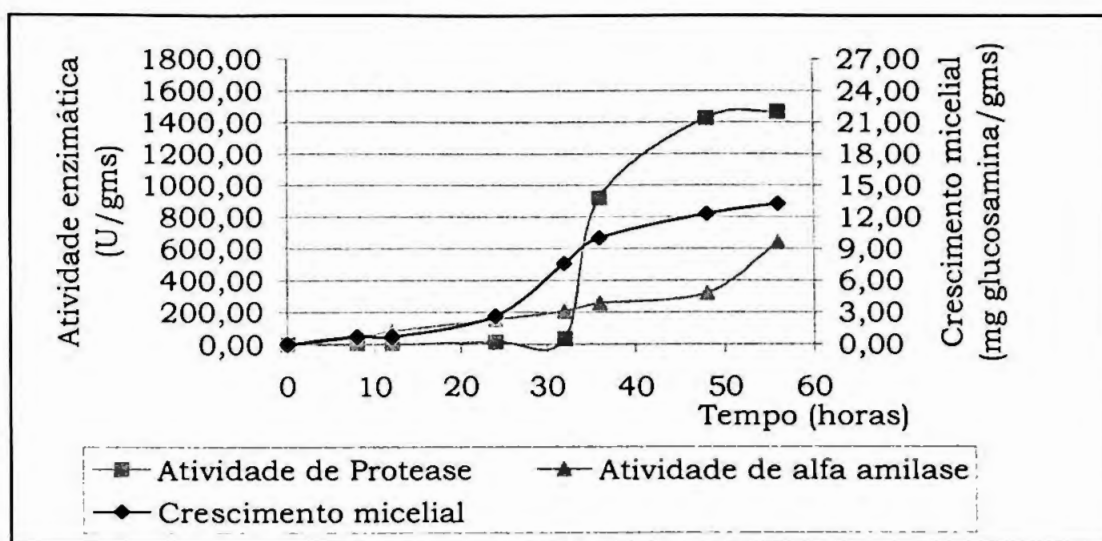


FIGURA 6.2.15: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 12 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

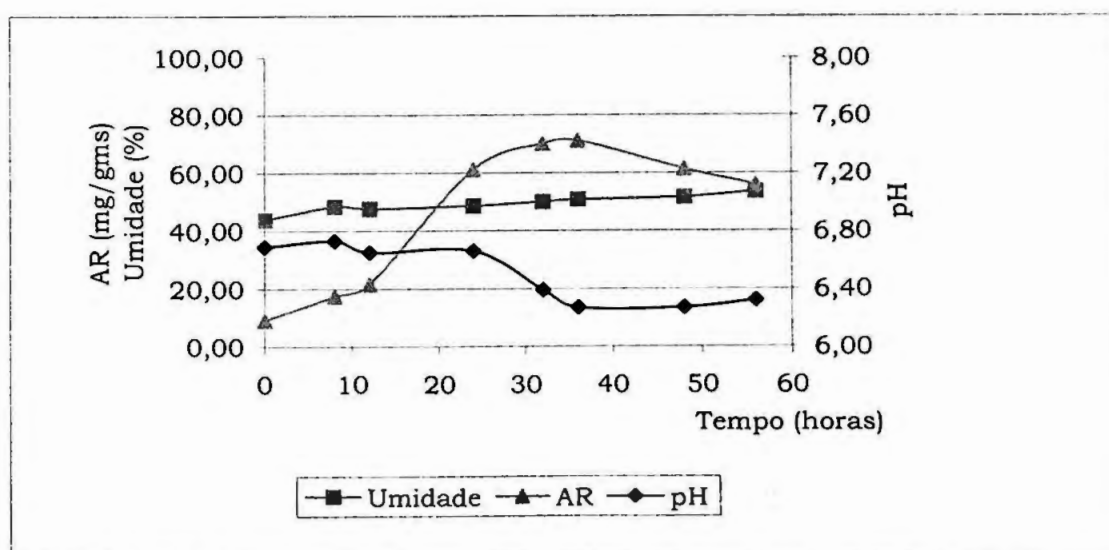


FIGURA 6.2.16: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 12 em temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.9: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 13.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg g/ glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,68 $\pm$ 0,01	43,35 $\pm$ 0,48	9,18 $\pm$ 0,29
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,50 $\pm$ 0,01	45,75 $\pm$ 0,45	13,47 $\pm$ 0,35
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	25,56 $\pm$ 0,28	6,48 $\pm$ 0,04	44,31 $\pm$ 0,48	14,04 $\pm$ 0,29
24	0,00 $\pm$ 0,00	11,02 $\pm$ 0,17	40,86 $\pm$ 0,43	6,45 $\pm$ 0,03	44,63 $\pm$ 0,50	12,17 $\pm$ 0,25
32	0,61 $\pm$ 0,05	34,43 $\pm$ 0,41	98,84 $\pm$ 0,88	6,38 $\pm$ 0,01	46,60 $\pm$ 0,61	16,80 $\pm$ 0,37
36	0,72 $\pm$ 0,04	450,23 $\pm$ 0,46	140,75 $\pm$ 1,07	6,35 $\pm$ 0,01	46,51 $\pm$ 0,45	23,54 $\pm$ 0,32
48	0,77 $\pm$ 0,02	514,23 $\pm$ 0,95	158,54 $\pm$ 1,07	6,38 $\pm$ 0,03	45,37 $\pm$ 0,42	22,84 $\pm$ 0,47
56	1,32 $\pm$ 0,02	509,09 $\pm$ 1,09	162,03 $\pm$ 1,03	6,40 $\pm$ 0,01	45,49 $\pm$ 0,44	25,20 $\pm$ 0,36

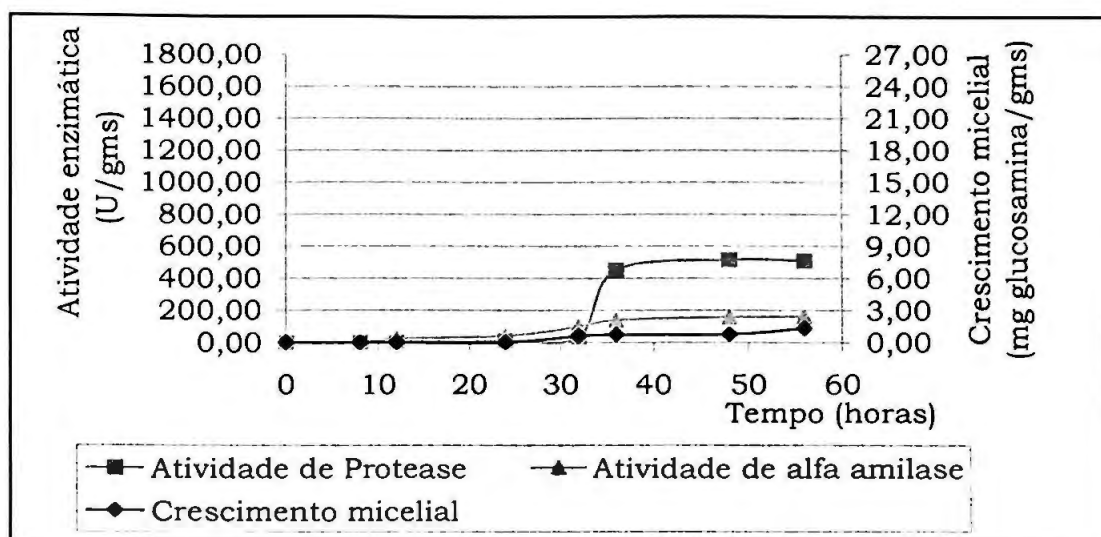


FIGURA 6.2.17: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 13 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

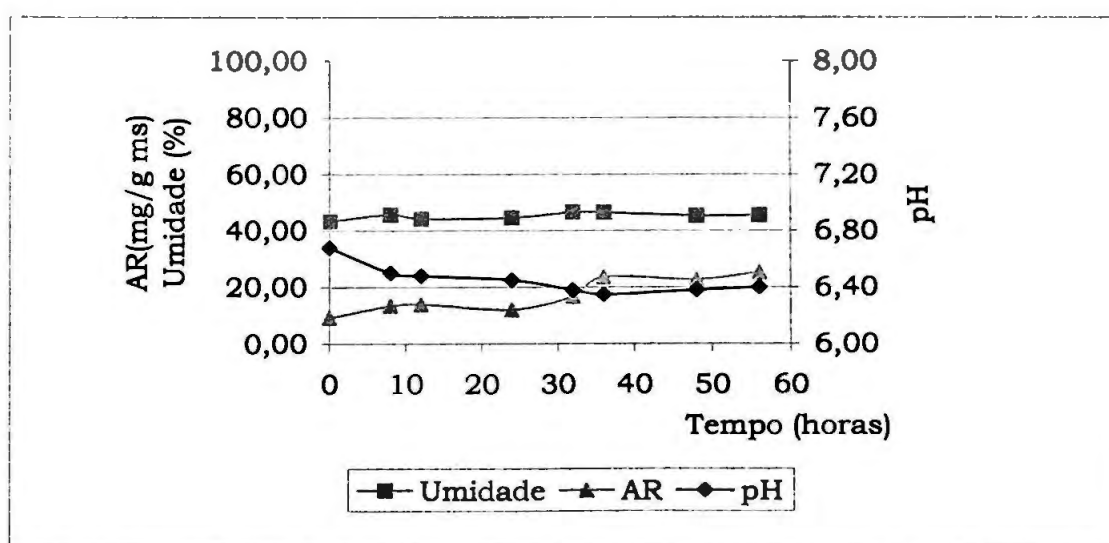


FIGURA 6.2.18: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 13 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

TABELA 6.2.10: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 14.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,70 $\pm$ 0,03	44,52 $\pm$ 0,39	9,56 $\pm$ 0,10	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,56 $\pm$ 0,03	49,72 $\pm$ 0,52	20,88 $\pm$ 0,20	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	23,71 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,01	49,01 $\pm$ 0,47	24,79 $\pm$ 0,37	
24	0,00 $\pm$ 0,00	20,28 $\pm$ 0,19	36,84 $\pm$ 0,37	6,55 $\pm$ 0,01	48,50 $\pm$ 0,52	19,34 $\pm$ 0,18	
32	2,26 $\pm$ 0,09	91,72 $\pm$ 0,80	130,39 $\pm$ 0,90	6,48 $\pm$ 0,01	48,52 $\pm$ 0,62	38,81 $\pm$ 0,31	
36	3,28 $\pm$ 0,21	776,55 $\pm$ 1,86	131,52 $\pm$ 0,72	6,50 $\pm$ 0,03	50,48 $\pm$ 0,40	48,48 $\pm$ 0,51	
48	3,57 $\pm$ 0,10	640,70 $\pm$ 1,40	181,82 $\pm$ 0,61	6,51 $\pm$ 0,02	49,49 $\pm$ 0,68	34,43 $\pm$ 0,28	
56	4,87 $\pm$ 0,06	621,40 $\pm$ 1,31	201,91 $\pm$ 0,55	6,39 $\pm$ 0,01	49,78 $\pm$ 0,50	38,52 $\pm$ 0,38	

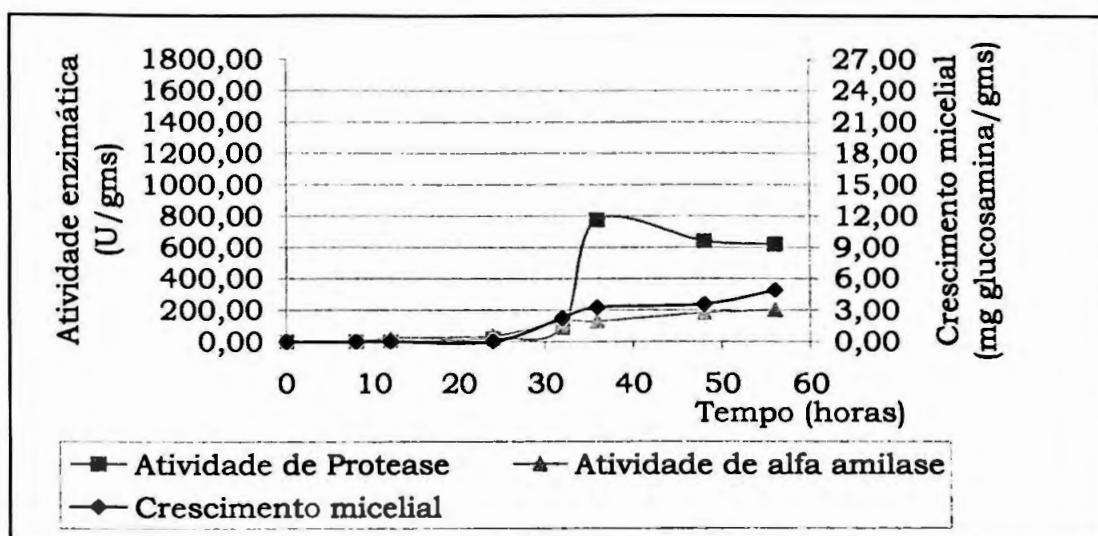


FIGURA 6.2.19: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 14 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de 10^{10} esporos /gms.

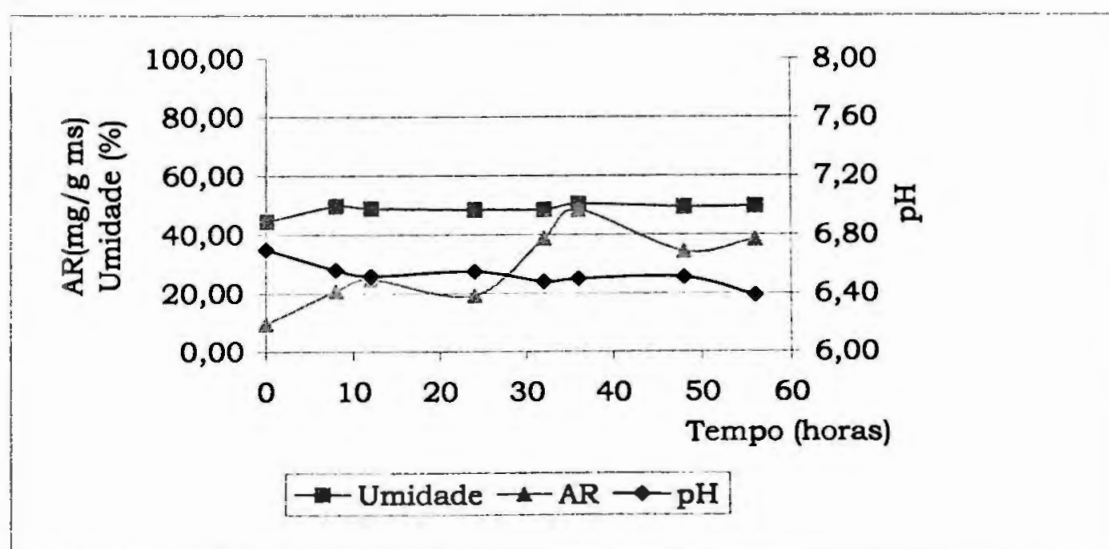


FIGURA 6.2.20: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 14 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.11: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 15.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,03	41,98 $\pm$ 0,56	9,05 $\pm$ 0,22	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,62 $\pm$ 0,01	44,98 $\pm$ 0,47	22,27 $\pm$ 0,29	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	24,26 $\pm$ 0,26	6,59 $\pm$ 0,03	44,43 $\pm$ 0,49	22,70 $\pm$ 0,25	
24	0,00 $\pm$ 0,00	22,10 $\pm$ 0,23	39,67 $\pm$ 0,37	6,55 $\pm$ 0,02	44,94 $\pm$ 0,58	56,00 $\pm$ 0,43	
32	1,56 $\pm$ 0,02	50,99 $\pm$ 0,42	177,14 $\pm$ 0,66	6,53 $\pm$ 0,01	46,11 $\pm$ 0,47	77,28 $\pm$ 0,59	
36	1,85 $\pm$ 0,05	450,23 $\pm$ 0,62	216,86 $\pm$ 0,82	6,49 $\pm$ 0,03	46,96 $\pm$ 0,42	78,54 $\pm$ 0,61	
48	1,93 $\pm$ 0,06	501,31 $\pm$ 0,61	303,53 $\pm$ 0,87	6,52 $\pm$ 0,01	47,59 $\pm$ 0,46	45,77 $\pm$ 0,63	
56	4,61 $\pm$ 0,07	523,31 $\pm$ 0,51	341,74 $\pm$ 0,81	6,59 $\pm$ 0,03	46,48 $\pm$ 0,48	43,95 $\pm$ 0,68	

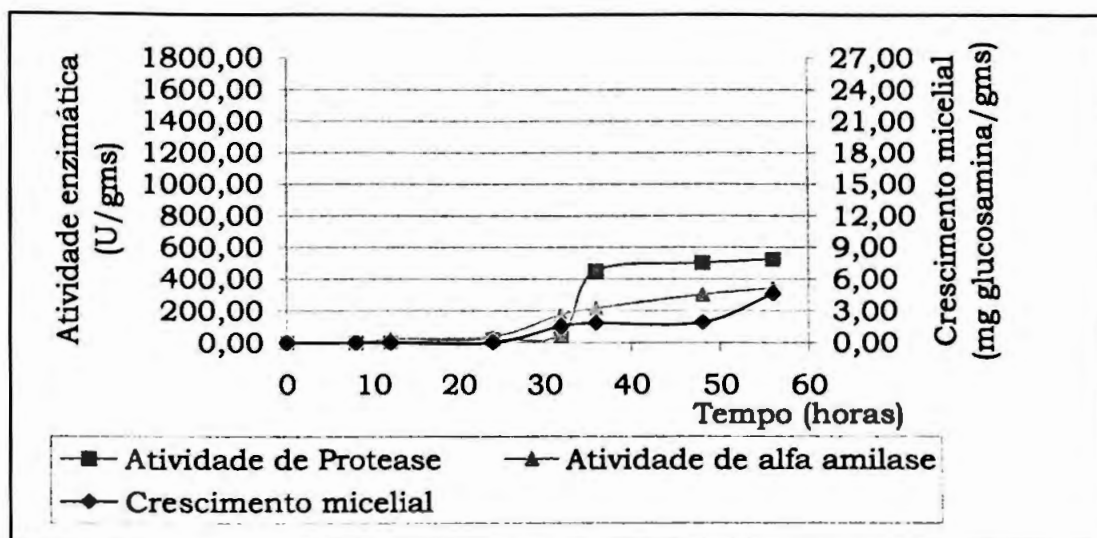


FIGURA 6.2.21: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 15 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 1×10^{10} esporos /gms.

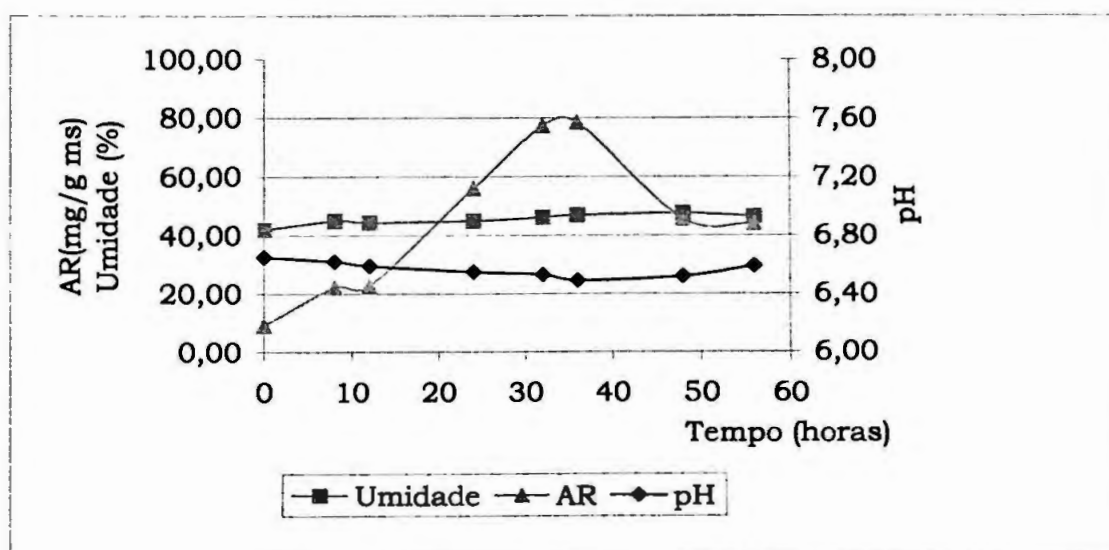


FIGURA 6.2.22: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 15 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.12: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio realizado à temperatura de 25 °C com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 16.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores mg/gms	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,68 $\pm$ 0,01	44,62 $\pm$ 0,46	9,26 $\pm$ 0,12	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,02	50,58 $\pm$ 0,38	34,31 $\pm$ 0,40	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	24,95 $\pm$ 0,27	6,61 $\pm$ 0,02	48,88 $\pm$ 0,53	32,21 $\pm$ 0,21	
24	1,20 $\pm$ 0,06	23,48 $\pm$ 0,29	35,74 $\pm$ 0,46	6,58 $\pm$ 0,02	46,77 $\pm$ 0,46	44,26 $\pm$ 0,42	
32	1,45 $\pm$ 0,07	58,95 $\pm$ 0,43	157,77 $\pm$ 0,96	6,53 $\pm$ 0,02	51,96 $\pm$ 0,43	78,08 $\pm$ 0,53	
36	2,50 $\pm$ 0,10	563,98 $\pm$ 0,98	260,17 $\pm$ 1,01	6,50 $\pm$ 0,02	49,41 $\pm$ 0,49	58,42 $\pm$ 0,64	
48	2,63 $\pm$ 0,12	548,62 $\pm$ 0,80	277,41 $\pm$ 0,92	6,52 $\pm$ 0,01	50,34 $\pm$ 0,46	44,50 $\pm$ 0,45	
56	3,01 $\pm$ 0,10	520,78 $\pm$ 0,69	288,63 $\pm$ 0,97	6,60 $\pm$ 0,01	48,40 $\pm$ 0,41	44,32 $\pm$ 0,48	

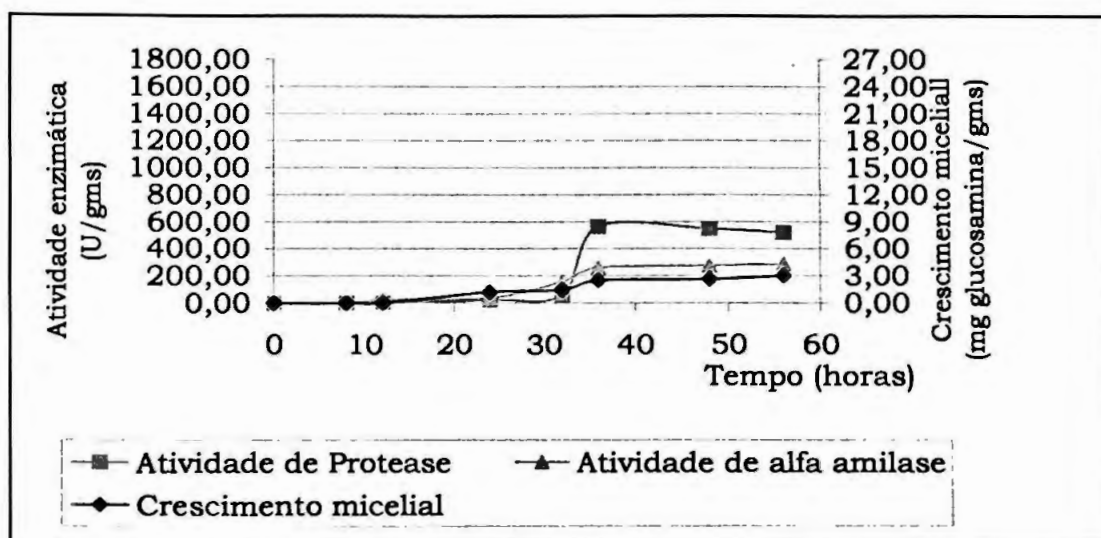


FIGURA 6.2.23: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 16 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

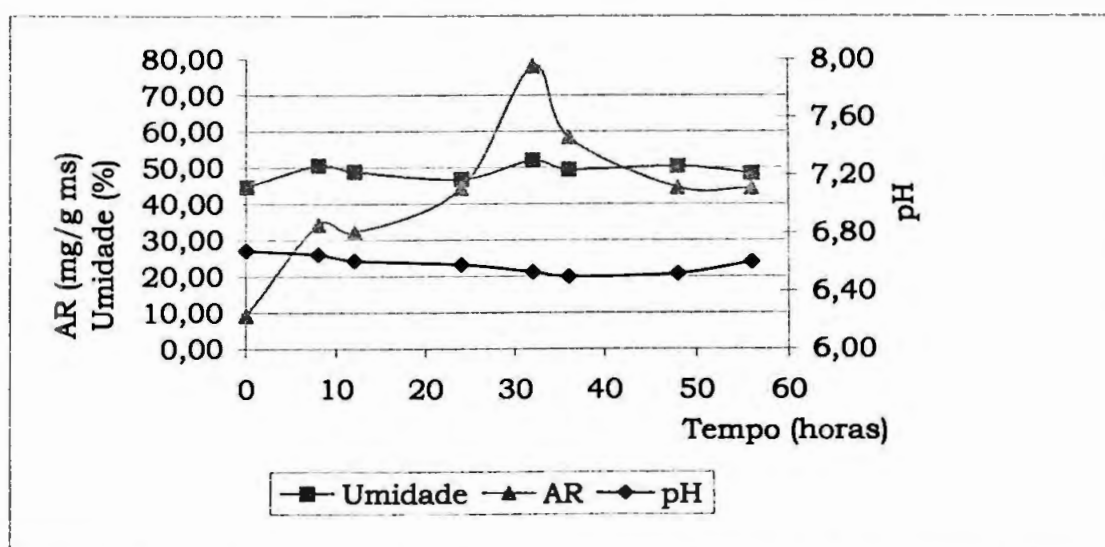


FIGURA 6.2.24: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 16 em temperatura de 25 °C em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.13: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25°C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 17.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α-amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,60 ± 0,01	42,39 ± 0,49	9,46 ± 0,22	
8	0,37 ± 0,03	0,00 ± 0,00	38,02 ± 0,39	6,58 ± 0,02	43,08 ± 0,42	13,98 ± 0,45	
12	1,41 ± 0,05	0,00 ± 0,00	83,54 ± 0,77	6,66 ± 0,01	42,89 ± 0,43	23,25 ± 0,54	
24	1,83 ± 0,04	15,21 ± 0,10	127,53 ± 0,69	6,28 ± 0,03	42,46 ± 0,45	49,09 ± 0,50	
32	2,78 ± 0,08	112,93 ± 0,53	131,87 ± 0,89	6,23 ± 0,01	43,71 ± 0,44	52,92 ± 0,48	
36	3,05 ± 0,10	895,73 ± 2,03	165,06 ± 0,73	6,31 ± 0,01	43,63 ± 0,56	51,34 ± 0,52	
48	6,64 ± 0,06	1335,23 ± 4,13	245,28 ± 0,69	6,61 ± 0,03	45,27 ± 0,62	51,62 ± 0,45	
56	6,86 ± 0,05	1367,44 ± 3,74	422,78 ± 0,77	6,44 ± 0,03	44,71 ± 0,71	37,47 ± 0,39	

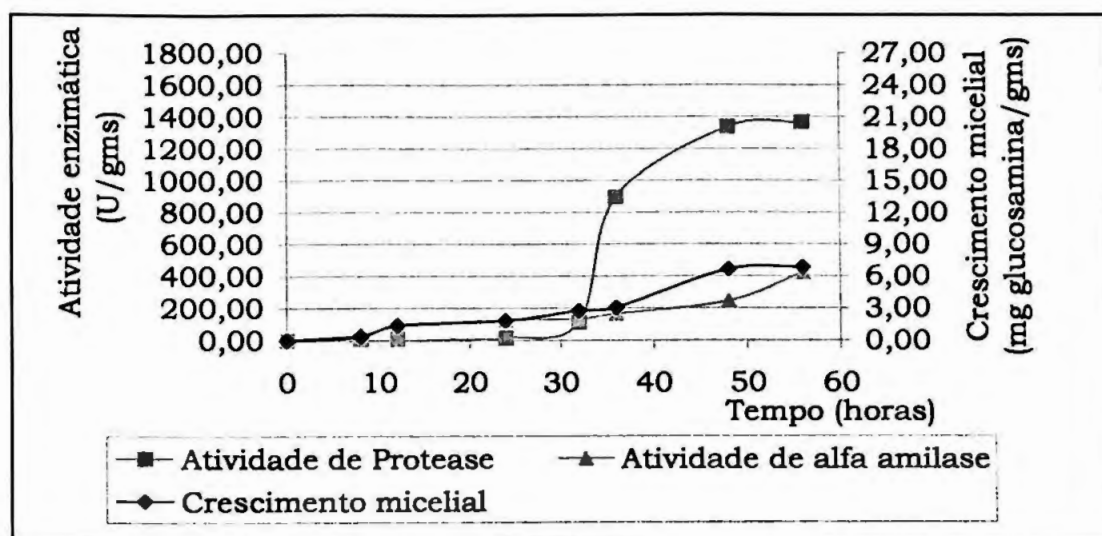


FIGURA 6.2.25: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 17 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

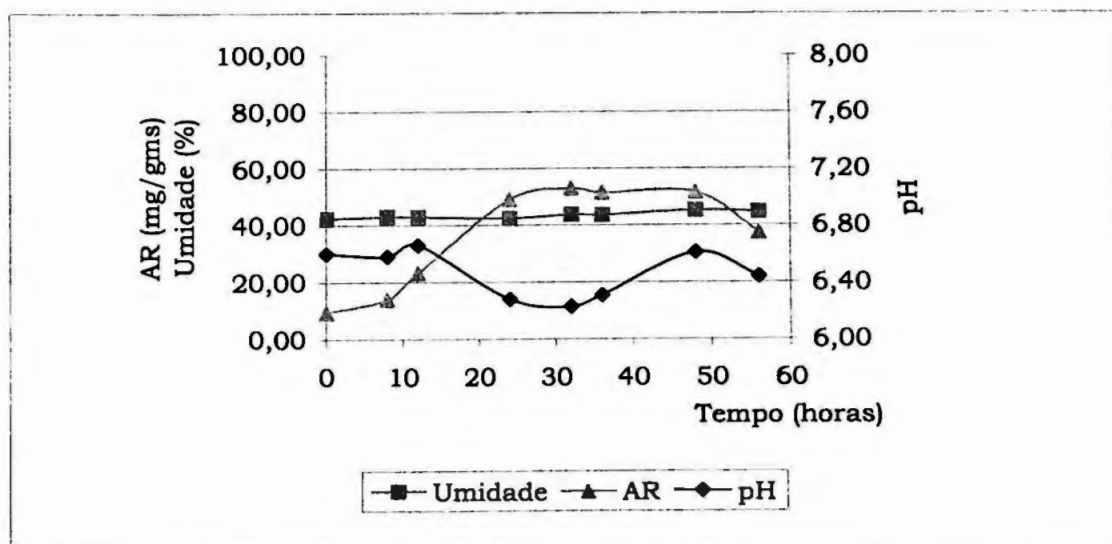


FIGURA 6.2.26: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 17 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.14: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 18.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	Atividade de α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,68 $\pm$ 0,01	44,56 $\pm$ 0,42	9,94 $\pm$ 0,26
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	37,48 $\pm$ 0,36	6,69 $\pm$ 0,03	44,97 $\pm$ 0,45	23,00 $\pm$ 0,35
12	0,54 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	89,25 $\pm$ 0,54	6,60 $\pm$ 0,03	45,98 $\pm$ 0,41	34,39 $\pm$ 0,36
24	1,14 $\pm$ 0,06	47,02 $\pm$ 0,48	140,29 $\pm$ 0,88	6,39 $\pm$ 0,01	45,52 $\pm$ 0,52	62,59 $\pm$ 1,10
32	3,90 $\pm$ 0,48	104,23 $\pm$ 0,97	166,82 $\pm$ 0,75	6,24 $\pm$ 0,01	46,77 $\pm$ 0,50	57,06 $\pm$ 0,56
36	3,18 $\pm$ 0,35	975,93 $\pm$ 1,55	169,08 $\pm$ 0,89	6,27 $\pm$ 0,01	47,64 $\pm$ 0,51	58,02 $\pm$ 0,60
48	8,63 $\pm$ 0,30	1014,03 $\pm$ 1,62	293,35 $\pm$ 0,85	6,79 $\pm$ 0,01	48,28 $\pm$ 0,44	52,57 $\pm$ 0,61
56	10,25 $\pm$ 0,39	1401,48 $\pm$ 4,98	432,92 $\pm$ 1,15	6,81 $\pm$ 0,03	47,11 $\pm$ 0,46	54,02 $\pm$ 0,66

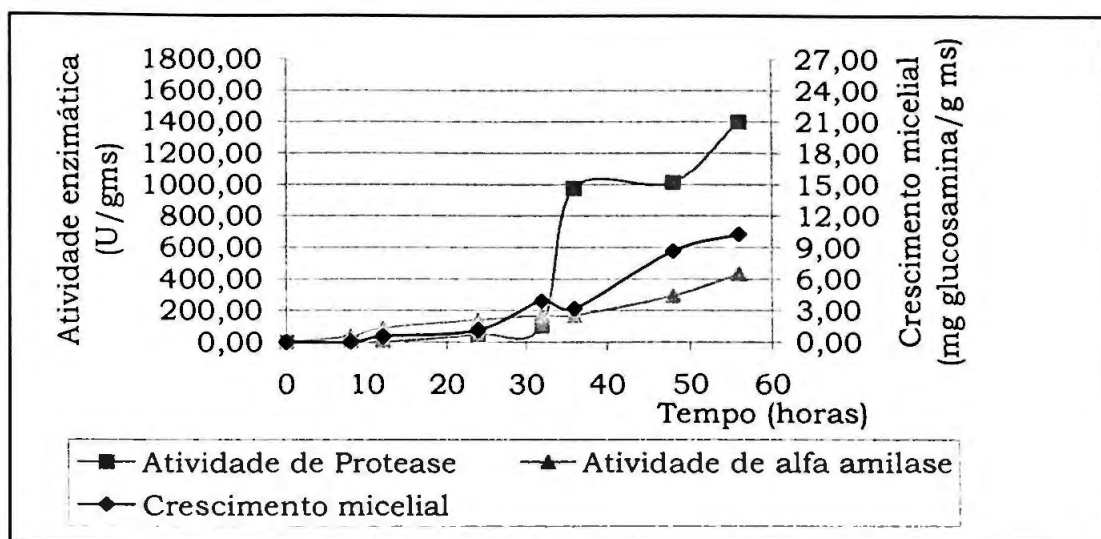


FIGURA 6.2.27: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 18 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

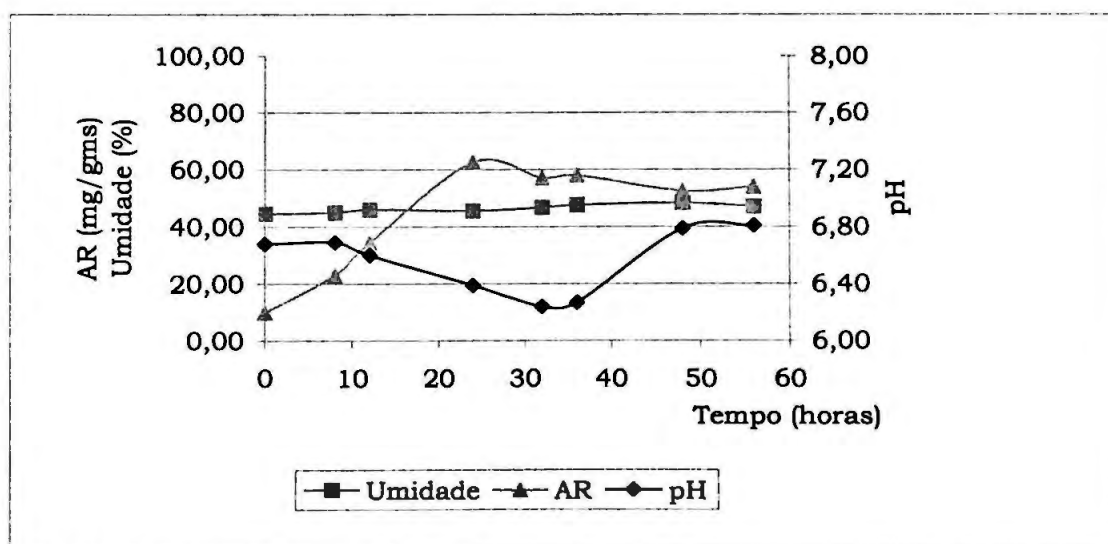


FIGURA 6.2.28: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 18 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.15: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 19.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina /gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,64 $\pm$ 0,03	41,82 $\pm$ 0,49	9,18 $\pm$ 0,07	
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	38,02 $\pm$ 0,47	6,69 $\pm$ 0,03	43,36 $\pm$ 0,51	14,33 $\pm$ 0,16	
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	93,54 $\pm$ 0,82	6,59 $\pm$ 0,02	44,21 $\pm$ 0,55	46,41 $\pm$ 0,43	
24	1,53 $\pm$ 0,04	11,12 $\pm$ 0,39	157,53 $\pm$ 1,06	6,40 $\pm$ 0,03	44,50 $\pm$ 0,54	94,90 $\pm$ 0,87	
32	4,17 $\pm$ 0,05	26,53 $\pm$ 0,77	226,06 $\pm$ 0,65	6,75 $\pm$ 0,03	44,21 $\pm$ 0,17	99,44 $\pm$ 0,80	
36	5,96 $\pm$ 0,12	303,49 $\pm$ 0,93	427,43 $\pm$ 0,89	6,37 $\pm$ 0,03	44,55 $\pm$ 0,55	82,89 $\pm$ 0,85	
48	12,08 $\pm$ 0,60	505,09 $\pm$ 1,51	485,90 $\pm$ 0,61	6,59 $\pm$ 0,03	47,84 $\pm$ 0,45	76,42 $\pm$ 0,89	
56	13,47 $\pm$ 0,40	1031,25 $\pm$ 4,53	542,58 $\pm$ 0,93	6,51 $\pm$ 0,02	48,35 $\pm$ 0,55	72,45 $\pm$ 0,98	

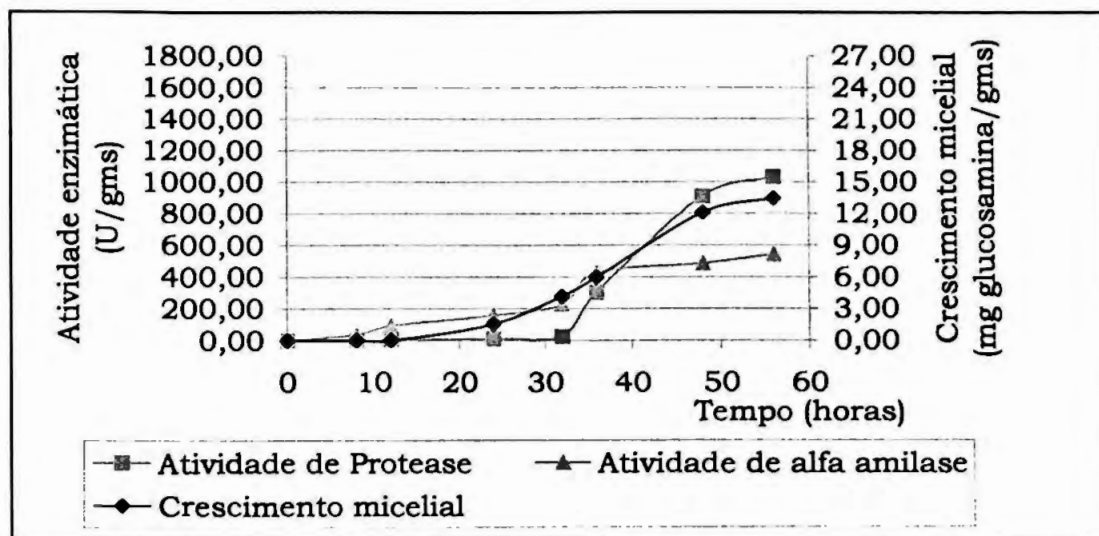


FIGURA 6.2.29: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

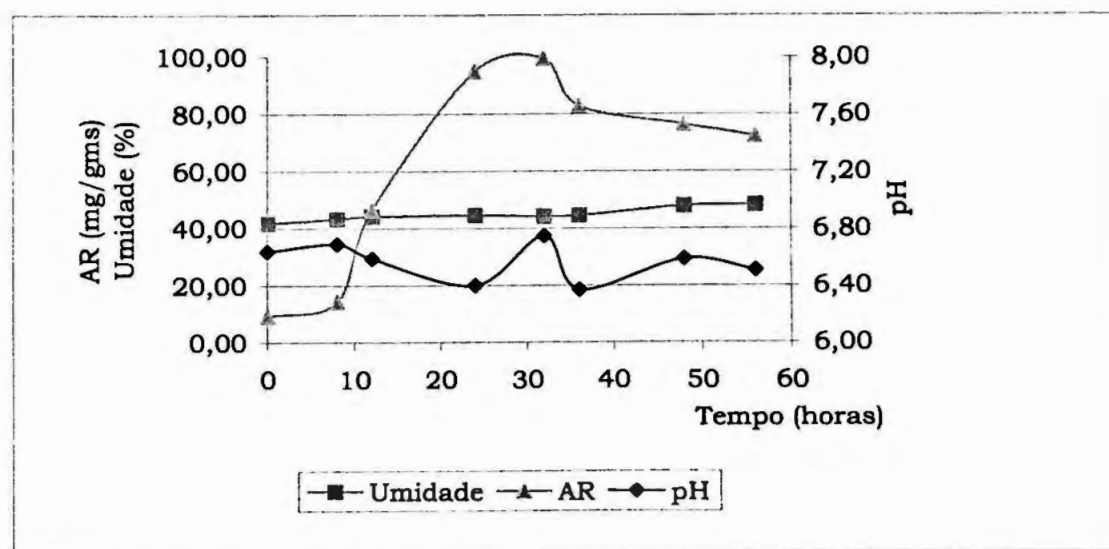


FIGURA 6.2.30: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 19 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.16: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 20.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,71 $\pm$ 0,03	46,41 $\pm$ 0,43	9,19 $\pm$ 0,16	
8	0,95 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,00	38,05 $\pm$ 0,43	6,67 $\pm$ 0,02	46,15 $\pm$ 0,56	15,64 $\pm$ 0,15	
12	1,35 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,00	89,95 $\pm$ 0,74	6,74 $\pm$ 0,01	47,74 $\pm$ 0,41	21,12 $\pm$ 0,26	
24	5,56 $\pm$ 0,05	6,24 $\pm$ 0,09	145,86 $\pm$ 0,96	6,41 $\pm$ 0,03	47,75 $\pm$ 0,56	90,77 $\pm$ 0,85	
32	6,38 $\pm$ 0,13	39,76 $\pm$ 0,40	263,32 $\pm$ 1,21	6,38 $\pm$ 0,03	46,95 $\pm$ 0,40	88,47 $\pm$ 0,75	
36	7,58 $\pm$ 0,32	484,88 $\pm$ 1,35	274,57 $\pm$ 1,10	6,40 $\pm$ 0,04	47,99 $\pm$ 0,59	81,25 $\pm$ 0,82	
48	11,67 $\pm$ 0,61	488,84 $\pm$ 1,16	493,43 $\pm$ 1,15	6,66 $\pm$ 0,01	49,32 $\pm$ 0,43	63,75 $\pm$ 0,81	
56	14,31 $\pm$ 0,56	1127,53 $\pm$ 3,31	547,62 $\pm$ 1,21	6,90 $\pm$ 0,02	48,84 $\pm$ 0,66	63,00 $\pm$ 0,66	

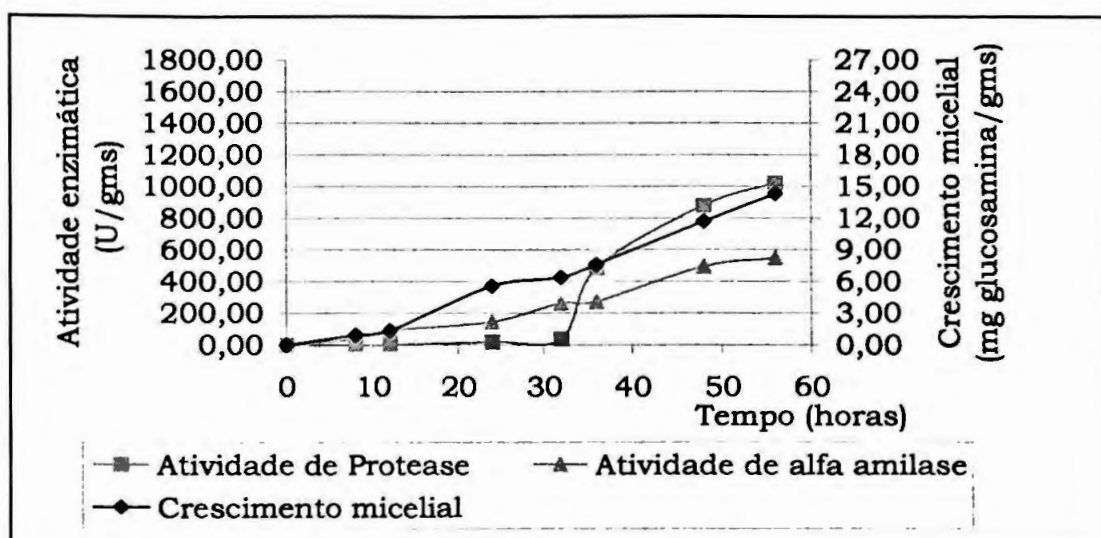


FIGURA 6.2.31: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 20 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

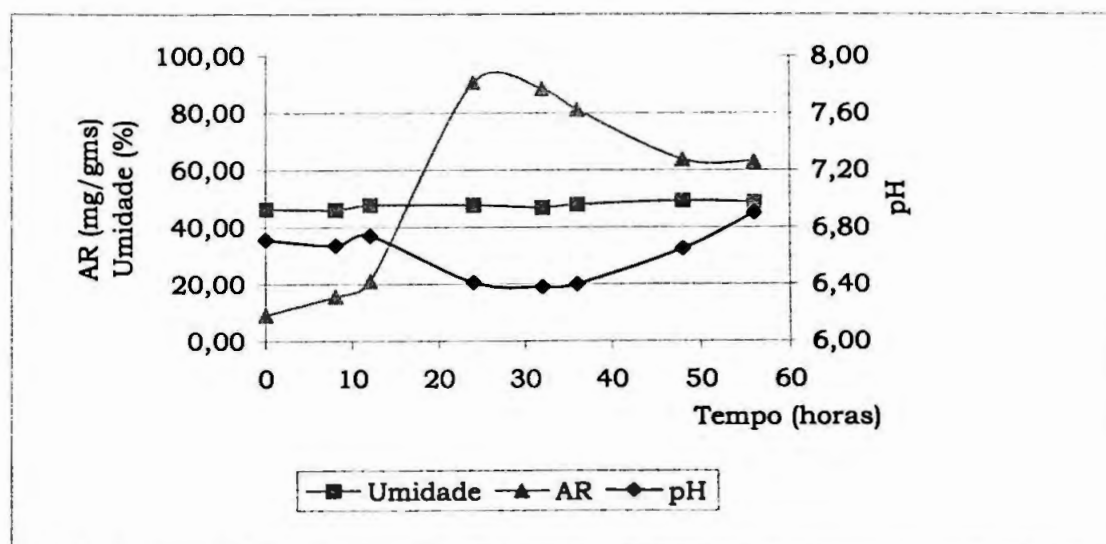


FIGURA 6.2.32: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 20 em temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos/gms.

TABELA 6.2.17: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 21.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares	
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			Redutores (mg/gms)	
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,62 $\pm$ 0,01	43,65 $\pm$ 0,48	9,20 $\pm$ 0,29	
8	0,32 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,00	36,98 $\pm$ 0,40	6,58 $\pm$ 0,01	44,21 $\pm$ 0,55	9,54 $\pm$ 0,30	
12	0,60 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	87,56 $\pm$ 0,31	6,77 $\pm$ 0,03	45,44 $\pm$ 0,42	23,25 $\pm$ 0,42	
24	1,78 $\pm$ 0,04	19,30 $\pm$ 0,24	165,45 $\pm$ 1,12	6,88 $\pm$ 0,01	46,71 $\pm$ 0,52	45,72 $\pm$ 0,55	
32	2,95 $\pm$ 0,05	119,01 $\pm$ 0,64	118,24 $\pm$ 1,00	6,46 $\pm$ 0,01	47,23 $\pm$ 0,46	43,61 $\pm$ 0,63	
36	3,36 $\pm$ 0,06	1252,64 $\pm$ 2,31	228,36 $\pm$ 1,20	6,53 $\pm$ 0,01	47,16 $\pm$ 0,44	54,99 $\pm$ 0,46	
48	7,07 $\pm$ 0,17	1469,45 $\pm$ 3,59	633,07 $\pm$ 0,93	6,66 $\pm$ 0,01	48,07 $\pm$ 0,52	57,34 $\pm$ 0,46	
56	9,51 $\pm$ 0,11	1509,00 $\pm$ 2,85	641,77 $\pm$ 1,22	6,46 $\pm$ 0,01	50,15 $\pm$ 0,43	59,36 $\pm$ 0,45	

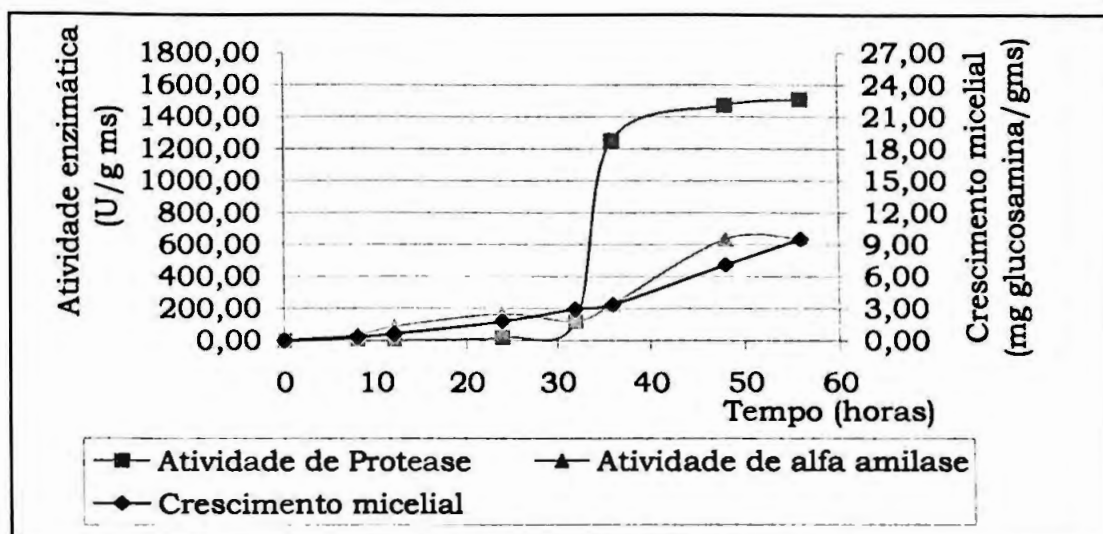


FIGURA 6.2.33: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 21 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

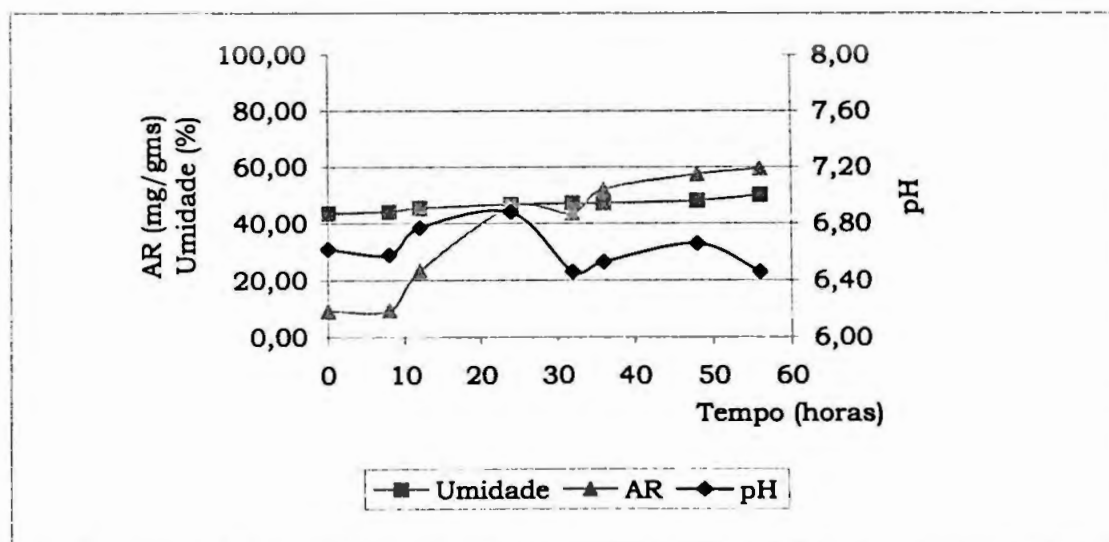


FIGURA 6.2.34: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 21 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.18: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 22

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gm)	Atividade de α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,69 $\pm$ 0,01	44,69 $\pm$ 0,48	9,32 $\pm$ 0,19
8	0,48 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00	36,78 $\pm$ 0,40	6,65 $\pm$ 0,03	49,89 $\pm$ 0,44	26,71 $\pm$ 0,24
12	0,98 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	82,12 $\pm$ 0,52	6,72 $\pm$ 0,01	48,86 $\pm$ 0,45	45,54 $\pm$ 0,51
24	1,75 $\pm$ 0,05	25,04 $\pm$ 0,15	149,32 $\pm$ 0,78	6,67 $\pm$ 0,02	49,34 $\pm$ 0,47	48,00 $\pm$ 0,48
32	2,70 $\pm$ 0,11	146,98 $\pm$ 0,85	128,42 $\pm$ 0,82	6,93 $\pm$ 0,03	51,85 $\pm$ 0,48	51,72 $\pm$ 0,43
36	4,14 $\pm$ 0,10	1333,89 $\pm$ 4,84	251,39 $\pm$ 0,92	6,56 $\pm$ 0,01	49,80 $\pm$ 0,56	55,74 $\pm$ 0,48
48	6,31 $\pm$ 0,24	1507,76 $\pm$ 5,32	629,98 $\pm$ 1,01	6,83 $\pm$ 0,03	52,43 $\pm$ 0,47	56,58 $\pm$ 0,55
56	10,11 $\pm$ 0,23	1599,12 $\pm$ 4,69	681,86 $\pm$ 1,12	6,65 $\pm$ 0,03	55,92 $\pm$ 0,46	58,32 $\pm$ 0,55

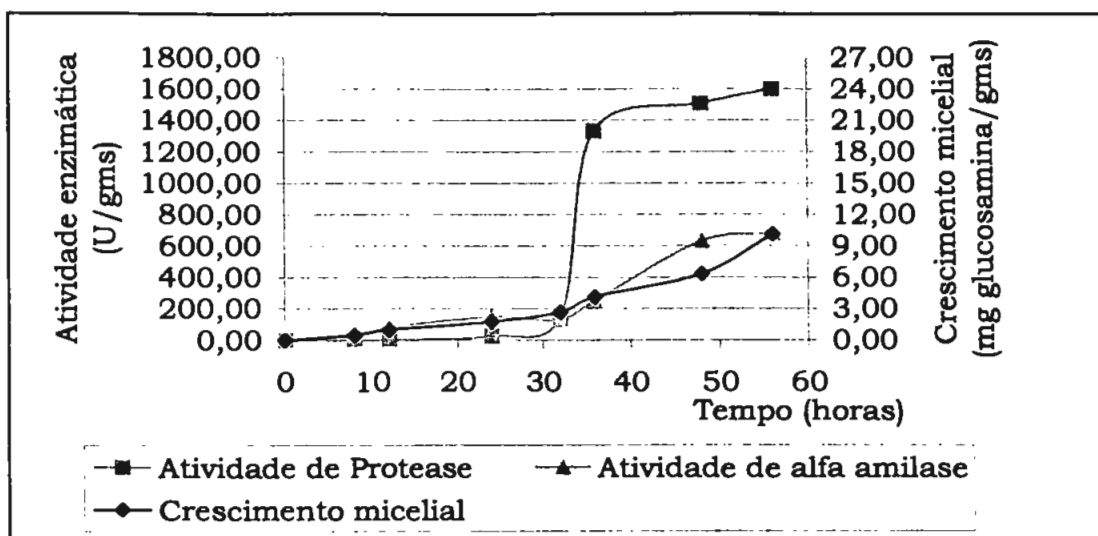


FIGURA 6.2.35: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 22 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

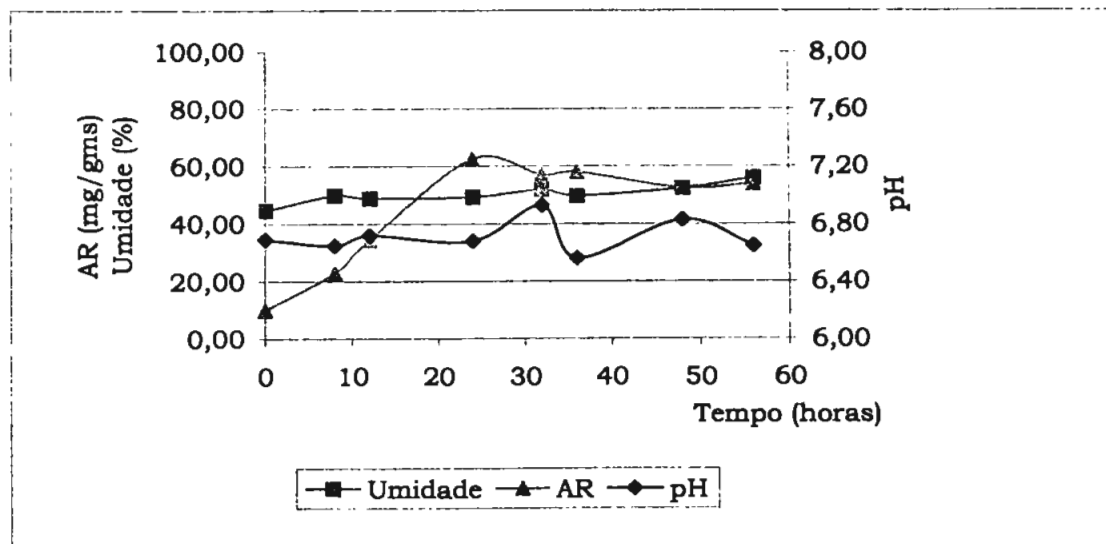


FIGURA 6.2.36: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 22 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e milho na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.19: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 23.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α -amilase (U/gms)			
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,65 $\pm$ 0,03	42,05 $\pm$ 0,48	9,31 $\pm$ 0,26
8	0,31 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00	39,79 $\pm$ 0,42	6,67 $\pm$ 0,01	46,12 $\pm$ 0,57	15,32 $\pm$ 0,40
12	0,55 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00	86,32 $\pm$ 0,83	6,81 $\pm$ 0,01	45,66 $\pm$ 0,42	23,53 $\pm$ 0,42
24	1,83 $\pm$ 0,05	10,66 $\pm$ 0,31	172,55 $\pm$ 0,87	6,81 $\pm$ 0,02	48,25 $\pm$ 0,48	59,96 $\pm$ 0,51
32	2,41 $\pm$ 0,26	121,07 $\pm$ 0,85	275,04 $\pm$ 1,06	6,72 $\pm$ 0,02	47,87 $\pm$ 0,55	81,49 $\pm$ 0,59
36	5,95 $\pm$ 0,68	1208,87 $\pm$ 3,08	508,99 $\pm$ 1,58	6,52 $\pm$ 0,01	47,44 $\pm$ 0,47	87,18 $\pm$ 0,62
48	10,38 $\pm$ 0,56	1463,04 $\pm$ 3,29	851,38 $\pm$ 1,98	6,75 $\pm$ 0,03	49,87 $\pm$ 0,58	82,23 $\pm$ 0,72
56	11,85 $\pm$ 0,40	1497,35 $\pm$ 3,61	892,33 $\pm$ 1,64	6,51 $\pm$ 0,02	47,12 $\pm$ 0,59	79,65 $\pm$ 0,81

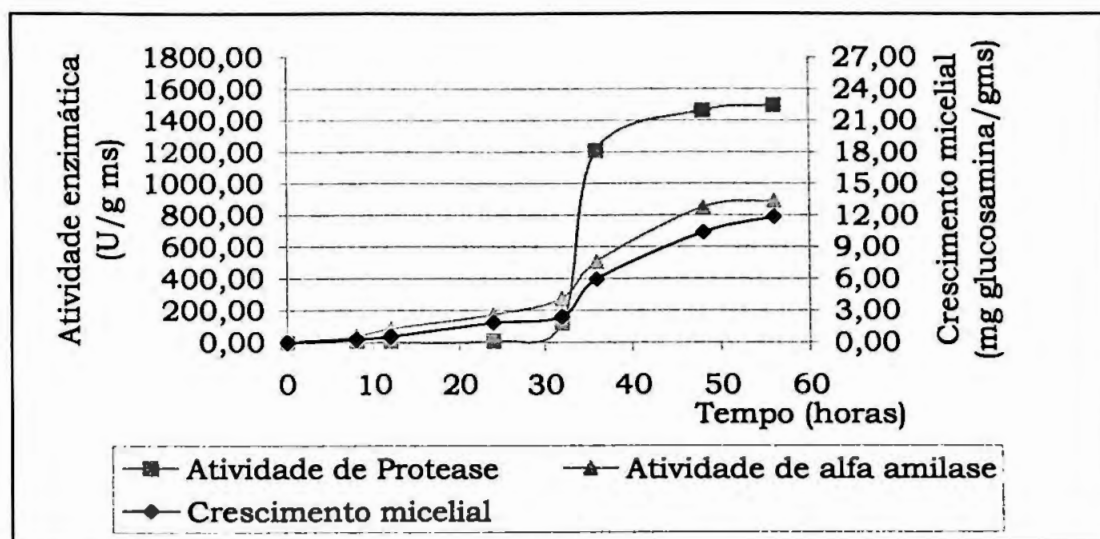


FIGURA 6.2.37: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 23 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

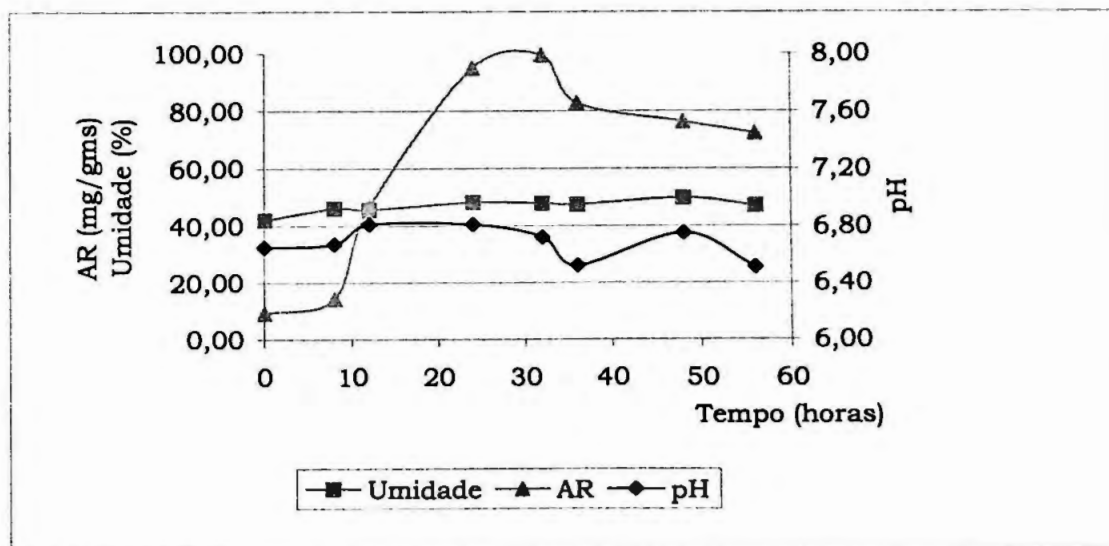


FIGURA 6.2.38: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 23 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 50:50 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

TABELA 6.2.20: Média das réplicas dos resultados experimentais obtidos em tempos diferentes no ensaio contínuo realizado à temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas com meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10¹⁰ esporos /gms. Ensaio 24.

Tempo (horas)	Crescimento Micelial (mg glucosamina/gms)	Atividade de		pH	Umidade (%)	Açúcares Redutores (mg/gms)
		Protease (U/gms)	α-amilase (U/gms)			
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,68 ± 0,01	44,96 ± 0,52	9,23 ± 0,11
8	0,75 ± 0,05	0,00 ± 0,00	38,52 ± 0,38	6,59 ± 0,02	48,82 ± 0,48	18,21 ± 0,23
12	0,78 ± 0,05	0,00 ± 0,00	83,12 ± 0,86	6,78 ± 0,01	48,42 ± 0,54	22,36 ± 0,27
24	2,89 ± 0,05	18,51 ± 0,33	159,32 ± 0,72	6,65 ± 0,02	50,01 ± 0,43	62,14 ± 0,64
32	6,47 ± 0,23	86,26 ± 0,87	280,74 ± 1,19	6,72 ± 0,01	48,38 ± 0,43	70,01 ± 0,74
36	9,91 ± 0,25	1315,66 ± 3,39	598,96 ± 1,64	6,54 ± 0,01	49,28 ± 0,43	78,07 ± 0,66
48	12,01 ± 0,46	1509,37 ± 4,86	894,68 ± 1,77	6,61 ± 0,02	51,47 ± 0,43	75,23 ± 0,75
56	12,32 ± 0,45	1578,35 ± 3,69	964,22 ± 1,39	6,67 ± 0,02	55,66 ± 0,5	73,65 ± 0,76

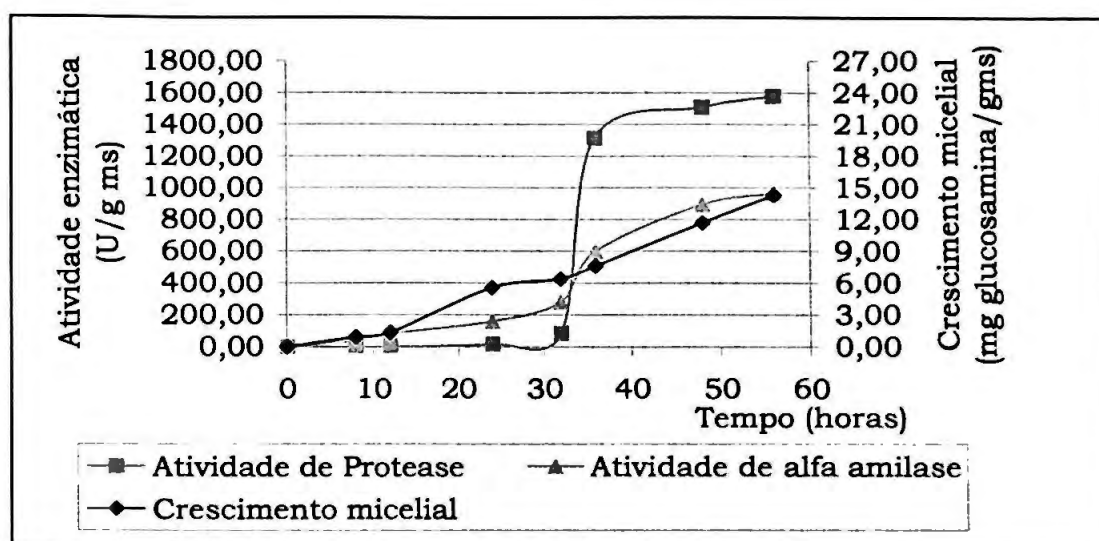


FIGURA 6.2.39: Variação das atividades enzimáticas; protease, α -amilase e crescimento micelial com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 24 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

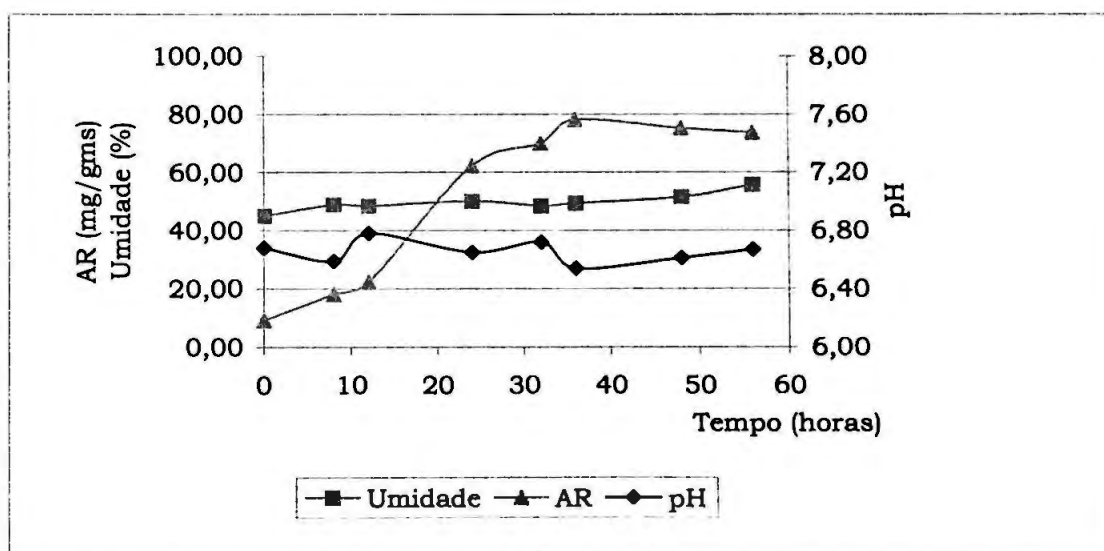


FIGURA 6.2.40: Variação da umidade, açúcares redutores, pH com o tempo de fermentação. Resultados do ensaio no. 24 em temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 32 horas em meio de cultura soja e trigo na proporção 60:40 e concentração de inóculo de 10^{10} esporos /gms.

7. DISCUSSÃO

7.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.

Na tabela 7.1.1 e figuras 7.1.1 e 7.1.2, pode-se observar que não houve diferença sensível na produtividade média enzimática em 56 horas para valores iguais ou maiores que 10^8 esporos/gms. Para a produtividade média de α -amilase nas mesmas condições esta diferença foi de 3,0 U/gms.h. Contudo se tomarmos por base o tempo de fermentação final de 48 horas, utilizado nas indústrias de molho de soja, a produtividade média passa a ser afetada tanto para a protease como para α -amilase. Nestas 48 horas, comparando as produtividades médias enzimáticas quando se usa uma concentração de esporos iniciais de 10^{10} e 10^8 esporos/gms, a diferença de produtividade média enzimática de protease e α -amilase passa a ser 8,78U/gms.h e 6,67U/gms.h respectivamente.

TABELA 7.1.1: Variação da produtividade média (P_m) em função da concentração inicial de esporos no inóculo e do tempo. Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

Ensaio No	Concentração Inóculo (esporos/gms)	Tempo (horas)	P_m Protease (U/gms.h)	P_m α -amilase (U/gms.h)	Ensaio No	Concentração Inóculo (esporos/gms)	Tempo (horas)	P_m Protease (U/gms.h)	P_m α -amilase (U/gms.h)
1	10^{10}	0	0,00	0,00	3	10^6	0	0,00	0,00
		8	0,00	4,41			8	0,00	0,00
		12	0,00	7,15			12	0,00	0,00
		24	0,80	6,77			24	0,39	0,00
		32	3,69	6,95			32	0,79	1,50
		36	26,59	6,06			36	3,26	2,72
		48	30,96	10,40			48	13,63	2,26
		56	26,44	11,30			56	19,35	5,86
2	10^8	0	0,00	0,00	4	10^4	0	0,00	0,00
		8	0,00	0,00			8	0,00	0,00
		12	0,00	0,00			12	0,00	0,00
		24	0,53	1,16			24	0,00	0,00
		32	2,47	3,12			32	0,19	1,38
		36	21,72	3,91			36	0,68	1,88
		48	22,18	3,73			48	2,55	1,78
		56	25,10	8,32			56	13,36	3,48

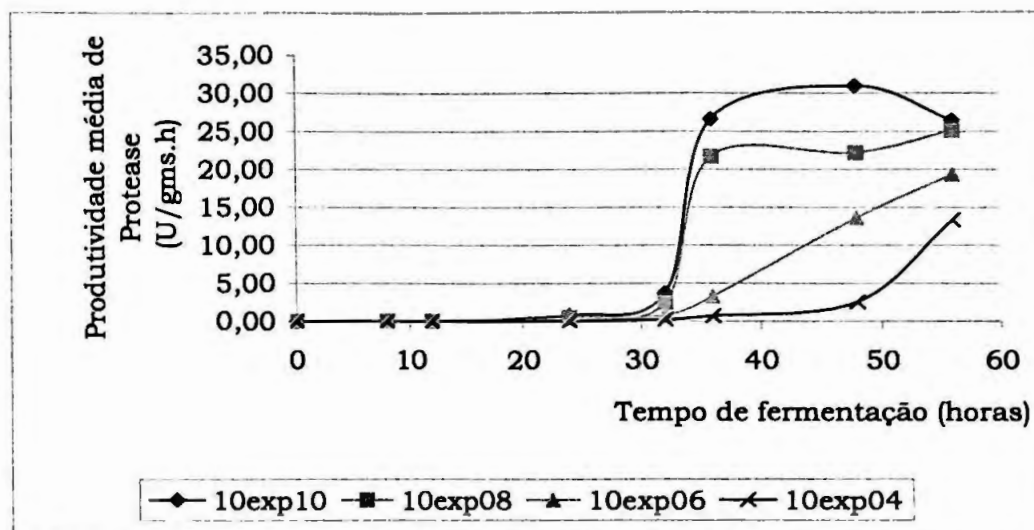


FIGURA 7.1.1: Variação da produtividade enzimática de protease com o tempo de fermentação e concentração de inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms. Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

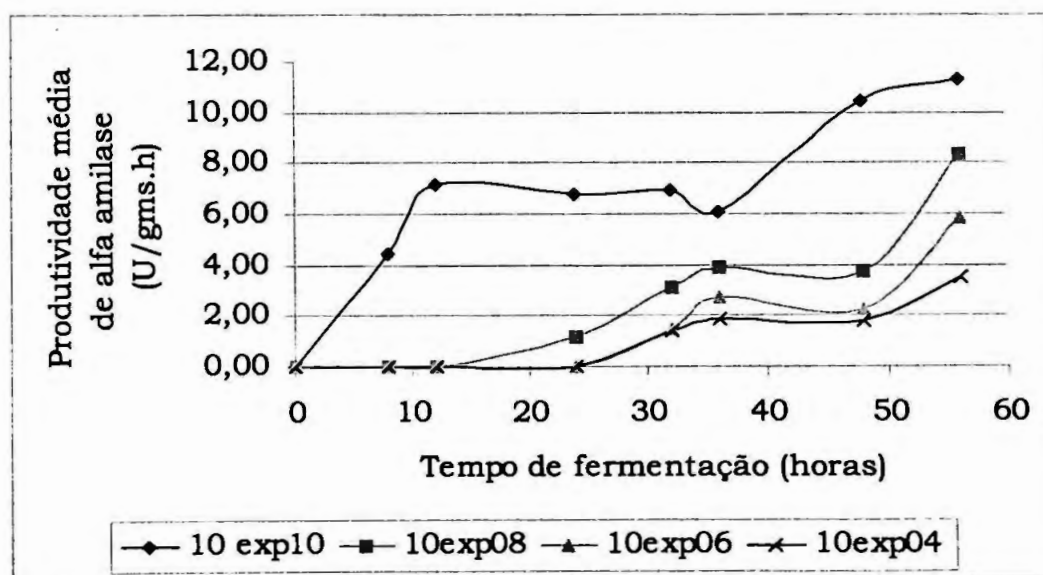


FIGURA 7.1.2: Variação da produtividade enzimática de α -amilase com o tempo de fermentação e concentração de inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms. Temperatura de 30 °C em meio de cultura soja e milho na proporção 50:50.

7.1.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICELIAL

A figura 7.1.1.1 mostra o crescimento micelial em função do tempo. O crescimento micelial quando se utilizou a concentração de inóculo inicial de 10^{10} esporos/gms foi maior que em outras concentrações iniciais, porém após 48 horas de fermentação o crescimento micelial foi similar ao da concentração de inóculo de 10^8 esporos/gms. Para as concentrações de inóculo iniciais de 10^6 e 10^4 esporos/gms o crescimento micelial foi bem abaixo quando comparado com os valores obtidos nas duas primeiras concentrações.

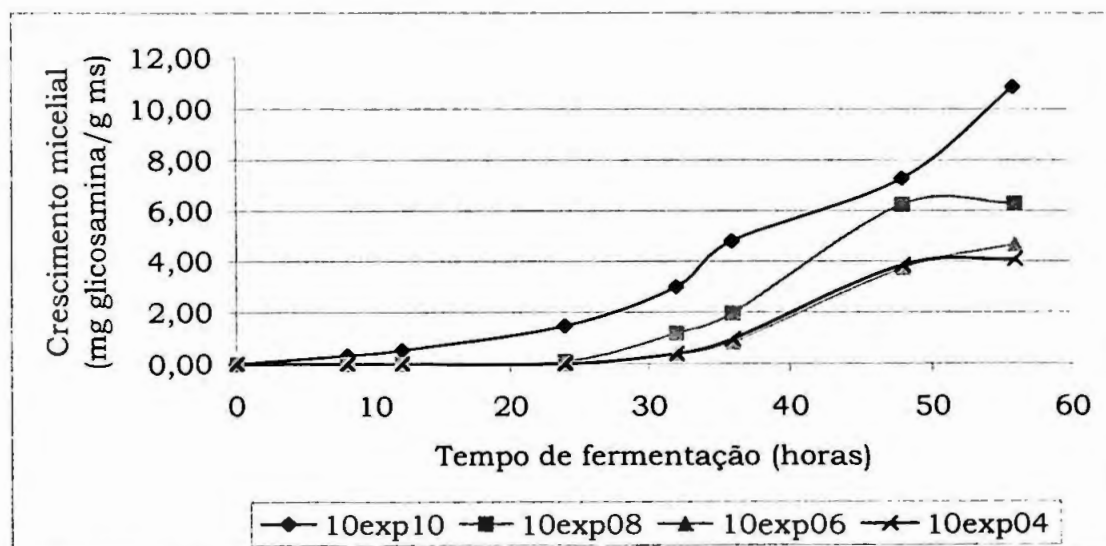


FIGURA 7.1.1.1: Variação do crescimento micelial utilizando concentração inicial de inóculo de 10^{10} esporos/gms 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms com o tempo de fermentação. Meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e temperatura de 30°C .

7.1.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A produção de açúcares redutores no processo de fabricação de *koji* é resultante de duas etapas. Na primeira, o complexo enzimático produzido pelo *Aspergillus oryzae*, hidrolisa o amido gelatinizado (α -amido) proveniente do milho ou trigo, sendo o produto desta reação os açúcares redutores. Na segunda etapa, os açúcares fermentescíveis formados são consumidos pelo microorganismo para a formação de material celular, metabólitos e para sua subsistência.

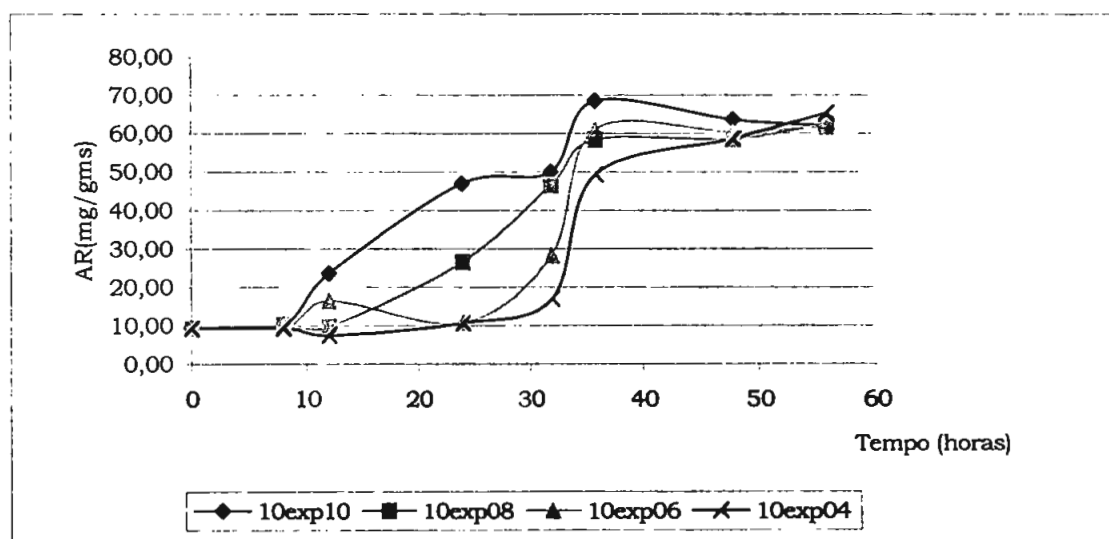


FIGURA 7.1.2.1: Variação da formação de açúcares redutores utilizando concentração inicial de inoculo de 10^{10} esporos/gms, 10^8 esporos/gms, 10^6 esporos/gms, 10^4 esporos/gms com o tempo de fermentação. Meio de cultura soja e milho na proporção 50:50 e temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na etapa inicial da fermentação há uma rápida produção de açúcares redutores no meio de cultura, devido à velocidade de hidrólise do amido gelatinizado ser maior que a velocidade do consumo de açúcares. No gráfico 7.1.2.1, mostra que após 36 horas de fermentação a produção de açúcares chega ao máximo seguido de uma pequena queda, enquanto que nas outras concentrações de esporos os valores são menores. Este fato é coerente com o gráfico

7.1.1.1 em que foram observados um maior e mais uniforme crescimento micelial.

A formação dos açúcares fermentescíveis na etapa do *koji* é importante para que eles sejam metabolizados por *Lactobacillus* na etapa do *moromi* produzindo cerca de 1% de ácido láctico e outros ácidos orgânicos. Estes açúcares também serão consumidos pelas leveduras para a produção de 2%-4% de etanol e compostos menores (SATO, S., 2001). Além da ação antimicrobiana dos ácidos e do etanol teremos a produção futura de ésteres responsáveis pelo aroma e sabor no molho de soja.

Tomando-se por base o processo de produção de *koji* de 48 horas escolheu-se a concentração de inóculo inicial de 10^{10} esporos/gms para dar continuidade aos ensaios referentes ao efeito da temperatura tempo e do meio de cultura na produção do *koji*. Esta escolha está relacionada à maior produtividade média de α -amilase e de protease, assim como a maior quantidade de açúcares redutores formados.

7.2 EFEITO DA TEMPERATURA E DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM 48 HORAS DE FERMENTAÇÃO

Para o estudo do efeito da temperatura e do meio de cultura na produção de enzimas proteolíticas e amilolíticas adotamos as condições finais da página anterior.

7.2.1. Análise de Produção de Enzimas

O efeito da temperatura e meio de cultura na produtividade média fixando o tempo de fermentação de 48 horas pode ser observado através da tabela 7.2.1.1 e figuras 7.2.1.1 e 7.2.1.2. A análise das figuras 7.2.1.1 e 7.2.1.2 nos permitiu comparar a produtividade média das proteases e α -amilase entre os ensaios utilizando os meios de cultivos soja e milho na proporção 50:50 e 60:40 ou soja e trigo nas mesmas proporções . As temperaturas utilizadas nos ensaios foram, recapitulando:

- a) Temperatura de 25 °C por 48 horas de fermentação ensaio (ensaios 13 a 16);
- b) Temperatura de 30 °C por 48 horas de fermentação (ensaios 9 a 12);
- c) Temperatura de 35 °C por 48 horas de fermentação (ensaios 5 a 8);
- d) Temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas de 25 °C por mais 24 horas (30/25) (ensaios 20 a 24);
- e) Temperatura de 35 °C por 24 horas seguidas de 25 °C por mais 24 horas (35/25) (ensaios 17 a 20);.

A temperatura dos ensaios 13 a 16 (tabela 4.5.1) apresentou os piores resultados para a produtividade média das enzimas

proteolíticas e amilolíticas quando comparadas com as outras temperaturas em todos os meios de cultivo. Na temperatura dos ensaios 17 a 20, o meio de cultivo soja e trigo influenciou a produtividade enzimática média das proteases. Segundo MAIORANO, (1982) é importante que a quantidade de energia fornecida ao microorganismo esteja em um certo intervalo para que o mesmo possa crescer e se reproduzir adequadamente e que as macromoléculas que compõe as células não sejam inativadas ou destruídas por exceder a quantidade de calor necessária. Os resultados das temperaturas estudadas nos ensaios 17 a 20 e 13 a 16 indicam que se está trabalhando em temperaturas não ideais para a atividade metabólica no processo.

As melhores temperaturas para a produtividade enzimática média de protease foram as dos ensaios 9 a 12 e 21 a 24 sendo que os meios de cultivo não influenciaram na produtividade média.

Para a produtividade enzimática média da α -amilase a melhor temperatura foi a dos ensaios 21 a 24 com os meios de cultivo contendo trigo. Este resultado está de acordo com TAZAKI & WATANABE, (1969) e OHARA, et al. (1959). MERCIER & FEILLET, (1975) mostrou que após tratamento térmico do trigo a 170°C, o índice de gelatinização foi 2% maior que a do milho devido ao fato das diferenças de porosidade dos grãos. O maior índice de gelatinização, torna o trigo mais suscetível à ação da α -amilase e isto pode explicar a maior produtividade enzimática média da α -amilase e uma maior formação de açúcares redutores como pode ser vista na figuras 7.2.1.2 e 7.2.3.1. Outro fator que contribui para a melhor produção de amilases fúngicas são os fosfatos (WINDISH & MAHTRE, 1965) e estes estão em maior quantidade na matéria prima trigo, cerca de 204 mg/100g contra 165 mg/100g de milho.

Na temperatura dos ensaios 17 a 20, o meio de cultivo, soja e trigo, influenciou a produtividade enzimática média das proteases.

TABELA 7.2.1.1: Efeito da temperatura e meio de cultura na produtividade no tempo de fermentação de 48 horas .

Meio de Cultura	Temperatura (°C)	CM ₄₈ (mg glucosamina/gms)	AR mg/gms	PAP ₄₈ (U/gms.h)	PAAM ₄₈ (U/gms.h)
Soja:Milho 50:50	35/25	6,64	51,20	27,82	5,11
	35	16,12	73,67	27,83	8,13
	30/25	7,07	57,34	30,61	13,19
	30	8,42	62,91	31,03	10,99
	25	0,77	22,84	10,71	3,30
Soja:Milho 60:40	35/25	8,63	52,57	21,13	6,11
	35	15,96	51,12	26,40	12,14
	30/25	6,31	56,58	31,41	13,12
	30	9,69	48,90	32,36	10,37
	25	3,57	34,43	13,35	3,79
Soja:Trigo 50:50	35/25	12,08	76,42	10,52	10,12
	35	19,74	82,70	22,71	11,19
	30/25	10,38	82,23	30,48	17,74
	30	12,46	74,23	26,65	12,02
	25	1,93	45,77	10,44	6,32
Soja:Trigo 60:40	35/25	11,67	63,75	10,18	10,28
	35	23,79	64,45	25,44	10,66
	30/25	12,01	75,23	31,45	18,64
	30	12,29	61,40	29,74	6,71
	25	2,63	44,50	11,43	5,78

Onde:

PAP₄₈ Produtividade de Protease em 48 horas

PAAM₄₈ Produtividade de α -Amilase em 48 horas

CM₄₈ Crescimento micelial em 48 horas

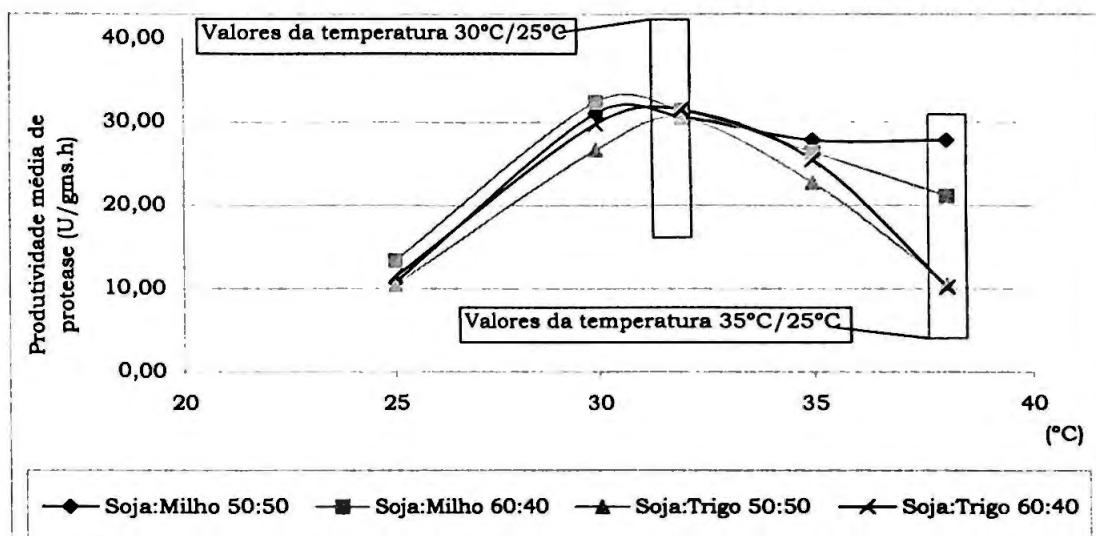


FIGURA 7.2.1.1: Efeito da temperatura e do meio de cultura na produtividade enzimática média (Pm) de protease. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.

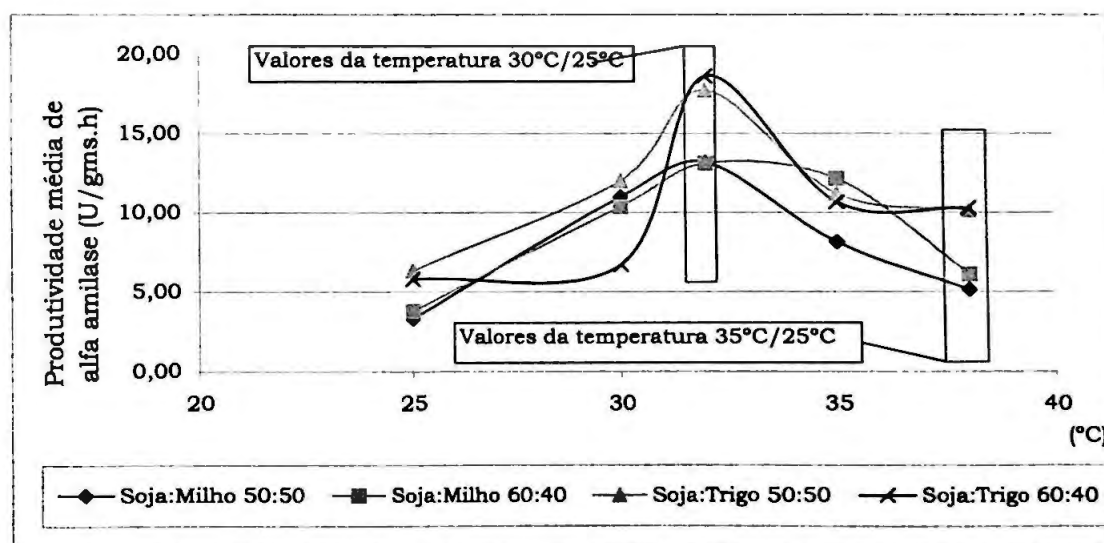


FIGURA 7.2.1.2: Efeito da temperatura e do meio de cultura na produtividade enzimática média (Pm) de α -amilase. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.

7.2.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICELIAL

Em processos industriais para a produção de *koji* as condições de temperatura de crescimento micelial é muito importante para evitar a contaminação do *koji* por *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* etc. A contaminação por *Bacillus* provoca o alto consumo de carboidratos formando-se ácido butírico e amônia produzindo mau cheiro. Esta contaminação afeta também o crescimento do *Aspergillus oryzae*. A contaminação do *koji* por *Streptococcus* e *Micrococcus* causa um abaixamento de pH anormal, sendo que o pH normal é de 6,2 a 7,0 (MORI, 1993). Para a diminuição da contaminação bacteriana o controle da temperatura é essencial. Quando a temperatura de fabricação do *koji* é de 25 °C e constante, torna-se perigoso o crescimento do *Micrococcus* especialmente se a umidade da soja cozida for alta. Se a temperatura for 35 °C haverá maior velocidade de crescimento do *Aspergillus oryzae*, porém se a umidade inicial do *koji* for alta, esta temperatura causa uma contaminação, principalmente por *Bacillus* (MORI, 1993).

No experimento, a melhor temperatura de crescimento micelial foi a de 35 °C, com os meios de cultivo contendo trigo como pode ser observado na figura 7.2.2.1, porém a melhor temperatura de produção de protease e amilase foi de 30 °C e as temperaturas combinadas de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 24 horas durante o período de fermentação. A temperatura menos favorável para o crescimento micelial e de produtividade enzimática média foi a de temperatura de 25 °C

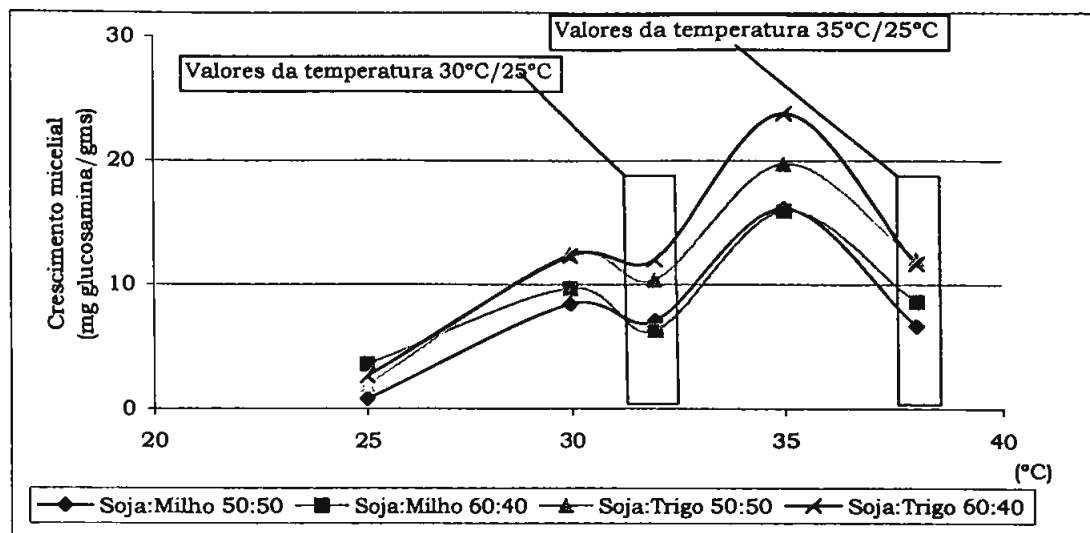


FIGURA 7.2.2.1 Efeito da temperatura e do meio de cultura no crescimento micelial.. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.

7.2.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A melhor produção de açúcares redutores foi obtida no ensaio que se combinou a temperatura de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 24 horas em meios de cultivo contendo trigo como pode ser visto na figura 7.2.3.1. MAIORANO, (1982), MARTINS, (1973), MEEI & CHENG, (1996) verificaram que a produção de açúcares redutores chega a um máximo em torno de 24 horas de fermentação e então declinam rapidamente durante o passar do tempo. Nos nossos ensaios, os açúcares redutores chegam ao máximo em 36 horas, mas entre o tempo de fermentação de 12 horas e 24 horas observou-se uma produção significativa destes açúcares. O rápido declínio dos açúcares redutores não foi observado neste trabalho e provavelmente este fato está ligado ao metabolismo da espécie de *Aspergillus oryzae* utilizado nos ensaios.

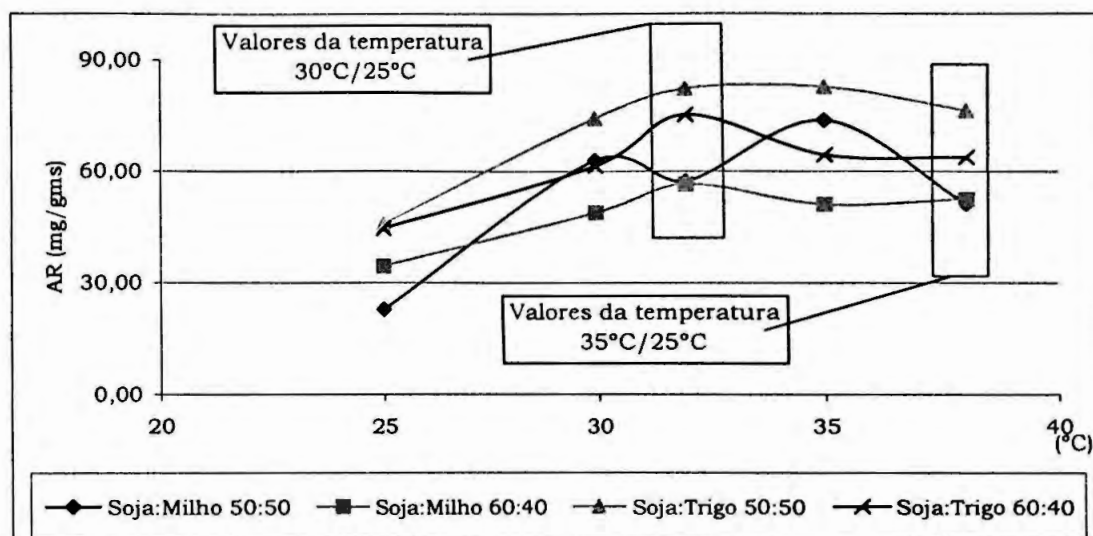


FIGURA 7.2.3.1: Efeito da temperatura e do meio de cultura sobre a produção de açúcares redutores. Meios de cultivos, soja e milho 50:50, soja e milho 60:40, soja e trigo 50:50, soja e trigo 60:40.

7.2.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM DADOS DA LITERATURA.

7.2.4.1 Matéria prima

A maior parte da soja utilizada no Japão para fabricação do molho de soja é proveniente dos Estados Unidos e Brasil. Quanto ao trigo, este é proveniente dos Estados Unidos e Canadá (MORI, 1993). As composições químicas médias da soja e trigo proveniente dos Estados Unidos e Brasil são dados nas tabelas 7.2.4.1 e 7.2.4.2.

O milho não é utilizado nos processos japonês de produção de molho de soja. Esta matéria prima é utilizada somente no Brasil e sua composição química é dada na tabela 7.2.4.3

Comparando as composições químicas das matérias primas, estas são bastante similares.

TABELA 7.2.4.1 : Composição química média da soja

País	Umidade	Proteína	Gordura	Açúcares	Cinzas
Estados Unidos*	12,0%	36,1%	19,0%	17,4%	4,7%
Brasil**	11,0%	38,0%	19,0%	23,0%	5,0%

* FONTE: MORI, 1993;

** www.cnpso.embrapa.br/progmesa.htm

TABELA 7.2.4.2 : Composição química média do trigo

País	Umidade	Proteína	Gordura	Carboidratos	Cinzas
Estados Unidos*	-	12,8%	2,5%	70,0%	2,0
Brasil**	-	14,2%	1,8%	68,8%	-

* FONTE: MORI, 1993

** FONTE: BALDINI, 1981

TABELA 7.2.4.3 : Composição química média do milho

País	Umidade	Proteína	Gordura	Carboidratos	Cinzas
Brasil*	-	9,8%	4,9%	70,1%	-

* FONTE: BALDINI, 1981

7.2.4.2 Análises

Segundo MORI (1993), o maior crescimento micelial se dá a uma temperatura de 35 °C seguido do crescimento na temperatura de 30 °C; a atividade de protease e pH utilizando como matéria prima soja ou soja desengordurada e trigo na proporção 50:50, temperatura de 30°C e tempo de fermentação de 48 horas foram em torno de 1100 U/gms e pH entre 6,2 e 7,0. Nos ensaios realizados a atividade de protease e pH utilizando as matérias primas soja:trigo e soja:milho na proporção 50:50 foram 1279,12 U/gms e 1489,41 U/gms respectivamente e pH entre 6,23 e 7,45. Segundo o autor acima

mentionado a atividade de α -amilase ideal é de 16,000 a 32,000 U/gms determinada pelo método de Wolhgemuth a 40°C por 30 minutos, o qual é baseado na estimativa do tempo em que a cor do complexo iodo-amido diminui. Este valor não pode ser comparado com os dos experimentos devido à metodologia de análise e as unidades serem diferentes.

MEEI & CHENG (1996), utilizaram como matéria prima soja desengordurada e farinha de trigo e obtiveram um conteúdo de açúcares redutores em torno de 20 mg/gms a uma temperatura de 30 °C em tempo de fermentação de 48 horas. Nos nossos ensaios realizados os valores utilizando as matérias primas soja:trigo e soja:milho na proporção 50:50 foram 74,23 mg/gms e 62,91 mg/gms respectivamente. Esta diferença pode ter sido causada pelas diferença na matéria prima ou pela diferença nas condições de tratamento da matéria prima.

7.3 DETERMINAÇÃO DO CUSTO DE MOLHO DE SOJA NO PRESENTE ESTUDO

Para verificar o melhor custo de produção de molho de soja a etapa do *moromi* foi realizada em nosso laboratório. Os *koji* foram produzidos com as proporções das diferentes matérias primas utilizadas nos ensaios. A temperatura utilizada para a produção foi a de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por mais 24 horas. Após este tempo, adicionou-se salmoura a 23% ao *koji* formando se assim o *moromi* e deixou-se fermentar por 4 meses. Os *moromi* foram filtrados obtendo-se os molhos de soja correspondentes as diferentes proporções de matérias primas. Uma análise de proteína total foi realizada nos molhos obtendo-se os resultados mostrados na tabela 7.3.1.

TABELA 7.3.1: Resultados das análises de proteína total dos molhos de soja obtidos no experimento.

Matéria Prima	Proporção de Matéria Prima	Nitrogênio Total (%)	Proteína* (%)
Soja e Milho	50:50	1,25	7,19
	60:40	1,30	7,48
Soja e Trigo	50:50	1,40	8,05
	60:40	1,44	8,28

* A quantidade de proteína foi obtida multiplicando o nitrogênio total (T.N) pelo fator 5,75 (fator utilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para proteínas de soja). O teor de T.N foi obtido por Kjeldhal.

A análise de proteína foi escolhida, pois é um dos fatores primordiais para avaliar a qualidade do molho de soja. Um molho de soja de boa qualidade contém 1,5-1,8% (gramas/volume) de nitrogênio total, 3,0-5,0% de açúcares redutores (principalmente glicose), 2,0-2,5% de etanol, 1,0-1,5% de glicerol, 1,0-2,0% de ácidos orgânicos (predominantemente ácido lático), pH de 4,7-4,8, e 17,0-18,0% de sal (YOKOTSUKA, 1986).

7.3.1 PREÇOS MÉDIOS DAS MATÉRIAS PRIMAS

Para a determinação do custo parcial de produção do molho de soja foram considerados apenas os custos das matérias primas utilizadas na produção do *koji*. Fatores como mão de obra, encargos sociais, água, sal, energia elétrica, material de embalagem etc, não foram considerados neste estudo, pois o objetivo principal foi na área de produção de *koji*.

Para realizar os custos envolvidos, uma média de preços de 12 meses (de junho de 2001 a junho de 2002) das matérias primas foi tomada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2001). Os preços da soja e do trigo foram baseados no mercado do Estado do Paraná e o milho no mercado de São Paulo.

TABELA 7.3.1.1: Tabela de custo de preparação do *koi* utilizando uma proporção de soja e milho 50:50

Matéria Prima	Quantidade	Preço/kg	R\$/lote
	(kg)	*	
Soja em grão	500,00	0,44	220,00
Milho em grão	500,00	0,21	105,00
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,2	500,00	100,00
	1000,20		425,00

TABELA 7.3.1.2: Tabela de custo de preparação do *koi* utilizando uma proporção de soja e milho 60:40

Matéria Prima	Quantidade	Preço/kg	R\$/lote
	(kg)	*	
Soja em grão	600,00	0,44	264,00
Milho em grão	400,00	0,21	84,00
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,20	500,00	100,00
	1000,20		448,00

* US\$ Comercial (R\$/US\$) em maio de 2003: 2,9656. Fonte Guia Financeiro v.15, n..26.

TABELA 7.3.1.3: Tabela de custo de preparação do *koji* utilizando uma proporção de soja e trigo 50:50

Matéria Prima	Quantidade (kg)	Preço/kg	R\$/lote
Soja em grão	500,00	0,44	220,00
Trigo em grão	500,00	0,28	140,00
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,20	500,00	100,00
	1000,20		460,00

TABELA 7.3.1.4: Tabela de custo de preparação do *Koji* utilizando uma proporção de soja e trigo 60:40

Matéria Prima	Quantidade (kg)	Preço/kg	R\$/lote
Soja em grão	600,00	0,44	264,00
Trigo em grão	400,00	0,28	112,00
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,20	500,00	100,00
	1000,20		476,00

7.3.2 CUSTO DO MOLHO DE SOJA BASEADO NO PRESENTE ESTUDO

Baseados em dados obtidos da indústria, Sakura-Nakaya Alimentos Ltda (2000), de uma produção de 1000 kg de *koji* obtém-se 1500 litros de molho de soja. A partir da análise de proteína foi calculada a quantidade de proteína contida no volume de 1500 litros molho de soja e seu custo por quilo, sendo os dados mostrados na tabela 7.3.2.1.

TABELA 7.3.2.1: Custo de Produção de Molho de Soja

Matéria Prima	Proporção	Quantidade Proteína (Kg)	Custo da Matéria Prima/ton (R\$/ton)	Custo Proteína (R\$/Kg)
Soja/Milho	50:50	107,85	425,00	3,94
	60:40	112,20	448,00	4,00
Soja/Trigo	50:50	120,75	460,00	3,83
	60:40	124,20	476,00	3,83

Analisando os dados da tabela 7.3.2.1, verificou-se que o melhor custo para produção de molho de soja foi com o meio de cultivo soja e trigo na proporção 50:50. Este dado está de acordo com todas as literaturas consultadas.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- 1) A melhor concentração inicial de inóculo para a produtividade de proteases e α -amilase foi a de 10^{10} esporos/gms.
- 2) A produtividade enzimática média das proteases e α -amilase foi influenciada pela concentração inicial de inóculo quando se fixa um tempo de fermentação de 48 horas.
- 3) A melhor temperatura de produção de proteases, α -amilase e açúcares redutores foi a de 30 °C por 24 horas seguidas por 25 °C por 24 horas.
- 4) Não houve interferência na produtividade média da protease substituindo trigo pelo milho no meio de cultivo. Na produção de α -amilase a substituição do trigo pelo milho causou redução de 5,52 U/gms.h.
- 5) O melhor custo parcial de produção de molho de soja foi com o *koji* correspondente ao cultivo utilizando soja e trigo na proporção 50:50 sendo 2,80% mais barato que o molho produzido com soja e milho nas mesmas proporções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; DRAETTA I.S. Caracterização química e bioquímica dos germens de trigo e milho. **Col. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.12, p.1-14, 1981.
- BERGKVIST, R. The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. Methods for estimation and isolation of proteolytic enzymes. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.17, p.1521-1540, 1963.
- BITTMAN, R. Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. **J. Chem. Educ.**, Vineland, v.51, n.1, p.46-47, 1974.
- CHENG, C.C.; JIN, H.R. Mycelial propagation in koji prepared with *Aspergillus oryzae* on various rice extrudates and steamed rice. **J. Ferment. Bioeng.**, Osaka, v.79, n.5, p.509-512, 1995.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/publicacoes/indicadores>. Acesso em: 9 ago. 2002.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. 609p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. SOJA. Produção mundial de soja-safra 2000/01. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/tabsoj1.htm>. Acesso em: 24 abril 2002.
- FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. **Milho**: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. Campinas: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia 1991. 112p. (Série extensão agroindustrial, v.5).

De acordo com a Norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [Cd-rom].

- FORGATY, W.M; GRIFFIN, P.J. Enzymes of bacillus species. Part 2. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.9, n.7, p.27-35, 1974.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Ateneu, 1999. 307p.
- FUJITA, A.; WATANABE, Y.; KISHI, K.; OGAWA, G. The effect of granular distribution of starchy materials on their koji qualities and soy sauce. **J. Jpn Soy Sauce Res. Inst.**, Tokyo, v.3, n.5, p.200-204, 1977.
- FUKAI, T. The relation between soy sauce fermentation and fats and oil. **J. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.5, p.458-470, 1929.
- FUKUSHIMA, D. Fermented vegetable protein and related foods of Japan and China. **Food Rev. Int.**, Monticello, v.1, n.1, p.149-209, 1985.
- HAYASHI, K.; TERADA, M.; MIZUNUMA, T. Some differences in characteristics of soy sauce fermentation between species of koji molds, *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. **J. Jpn. Soy Sauce Res. Inst.**, Tokyo, v.7, p.166-172, 1981.
- IADEROZA, M.; BALDINI, V.L.S. A importância da análise química em alimentos. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Enzimos e a qualidade de vegetais processados**. Campinas: ITAL, 1991. p.37-51. (Manual Técnico).
- IJIMA, K.; DEJIMA, M.; TSUJI, A.; WATANABE, T.; KAGAMI, T. A new method for the cooking of soybean meal by rotary NK cooker. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.20, p.13-19, 1973.
- IRIE, S. NKkan o ryoushita koatsu midikan dikan mushinitsuite. **J. Soc. Brew. Jpn.**, Tokyo v.72, p.250-255, 1977.
- JAPANESE AGRICULTURAL STANDARD. **Shoyu no JAS kankei houki**. Tokyo: Nihon Kensa Kyoukai, 1999. 87p.
- KEAY, L. Microbial proteases. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.12, p.17-21, 1971.

- KELLY C.T.; FORGATY, W.M. Microbial alkaline enzymes. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.11, n.6, p.3-9, 1976.
- KLING, S.H.; ARAÚJO, N.J.S.; PERRONE, J.C. Proteases from by products of Agave fibre production: its quantitative evaluation, concentration and purification. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.17, n.1, p.29-31, 1982.
- KUBO T. The composition of soy sauce oil. Noda Soy Sauce Co. Ltd. (1947) *apud* YONG, F.M.; WOOD, J.B. Biochemical changes in experimental soy sauce koji. **J. Food Technol.**, Oxford, v.12, p.163-175, 1977.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.**, New York, v.30, p.291-310, 1947.
- MAIORANO, A.E. **Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido.** São Paulo, 1982. 145p. Dissertação de Mestrado – Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.
- MARTINS, V.M.N.C. **Contribuição ao estudo do cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. Influência do pH inicial do meio e da temperatura de incubação.** São Paulo, 1973. 91p. Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.
- MEEI, Y.L.; CHENG, C.C. Biochemical changes during the preparation of soy sauce with extruded and traditional raw materials. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v.31, p. 511-517, 1996.
- MERCIER, C.; FEILLET, P. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.52, p.283-297, 1975.
- MORI N. **Shoyu no kagaku to gijutsu.** 11.ed. Tokyo: Nihon Jojo Kyokai, 1993. 580p.

- MORIGUCHI, S.; NISHIYAMA, T. Roasting degree of wheat used for Usukuchi shoyu. **J. Ferment. Technol.**, Osaka, v.38, p.274-276, 1960.
- NAKADAI T.; NASUNO S.; IGUCHI N. The action of peptidases from *Aspergillus oryzae* in digestion of soybean proteins. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.36, p. 261-268, 1972a.
- NAKADAI T.; NASUNO S.; IGUCHI N. The action of peptidases from *Aspergillus sojae* in digestion of soybean proteins. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.36, p.1239-1243, 1972b.
- OHARA, H.; MORIGUCHI, S.; NISHIYAMA, Y. The effect of temperature and moisture upon the cultivation of shoyu-koji. Part I. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.7, n.2, p. 25-30, 1959.
- OHARA, H.; MORIGUCHI, S.; NISHIYAMA, Y. The effect of temperature and moisture upon the cultivation of shoyu-koji. Part II. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.7, n.2, p. 31-42, 1959.
- SAKURAI, Y.; HO, T.; SHIOTA, H. On the convenient method estimation in koji. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.4, n.4, p.619-624, 1977.
- SATO, S. Alimentos orientais. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.4, p.465-489.
- SEKINE H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*: some enzymatic properties. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.36, n.2, p.207-216, 1972.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1997. 317p.
- STEINKRAUS, K.H. **Industrialization of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Dekker, 1989. 439p.
- TAZAKI, R.; WATANABE, Y. The relationship of enzyme activities and temperatures during shoyu-koji process. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.13, p.1-9, 1969.
-

- TERADA, M.; HAYASHI, K.; MIZUNUMA T. Distinction between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by productivity enzymes. **J. Jpn Soy Sauce Res. Inst.**, Tokyo, v.6, p.75-81, 1980.
- TERADA, M.; HAYASHI, K.; MIZUNUMA T. Enzyme productivity and identification of species of koji-molds for soy sauce distributed in Japan. **J. Jpn Soy Sauce Res. Inst.**, Tokyo, v.7, p.158-165, 1981.
- UMEDA, I. Manufacturing method of shoyu (3). **J. Brew. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.62, p.467-471, 1967.
- VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.4, p.387-420.
- WHITAKER, J. **Principles of enzymology for food science**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625p
- WINDISH, W.W.; MAHTRE, N.S. Microbial amylases. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v.7, p.273-304, 1965.
- YAMAMOTO, K. Studies on koji (3): effects on cultural temperature on the production of mold protease. **Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.21, p.319-324, 1957.
- YAMAMOTO.M. Enzymes: In: REED, G., ed. **Enzymes in food processing**. 2.ed. New York: Academic, 1975. 573p.
- YAMAMOTO, T. Catalytic reaction mechanisms of amylases and related enzymes. In: AMYLASE RESEARCH SOCIETY OF JAPAN, ed. **Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes**. Boca Raton: CRC, 1995. p.46-134.
- YASUDA, A.; MOGI, K.; YOKOTSUKA, T. Studies on the cooking method of proteinous materials for soy sauce brewing. Part 1. High temperature and short time cooking method. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.20, p.20-24, 1973a.
-

- YASUDA, A.; MOGI K.; YOKOTSUKA, T. Studies on the cooking method of proteinous materials for soy sauce brewing. Part 2. Brewing test of soy sauce. **Seas. Sci.**, Tokyo, v.20, p.25-27, 1973b.
- YOKOTSUKA T. Aroma flavor of Japanese soy sauce. **Adv. Food Res.**, San Diego, v.10, p.75-134, 1960.
- YOKOTSUKA T.; MOGI, K.; FUKUSHIMA, D.; YASUDA, A. **Dealing method of proteinous raw materials for brewing.** JP Pat. 929910, 5 june 1966. 6p.
- YOKOTSUKA T. International Symposium Oilseed Protein Foods, p.31-48. 1964, *apud* YONG, F.M.; WOOD, J.B. Biochemical changes in experimental soy sauce koji. **J. Food Technol.**, Oxford, v.12, p.163-175, 1977.
- YOKOTSUKA, T. Soy sauce biochemistry. **Adv. Food Res.**, San Diego, v.30, p.195-329, 1986.
- YONG, F.M.; WOOD, J.B. Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v.17, p.157-194, 1974.
- YONG, F.M.; WOOD, J.B. Biochemical changes in experimental soy sauce koji. **J. Food Technol.**, Oxford, v.12, p.163-175, 1977.
-