

Estudo Comparativo da Produção de Proteases por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Tortas de Girassol

Ruann Janser Soares de Castro^{1,2}, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical - Laboratório de Bioprocessos
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 CEP: 60511-110 Fortaleza-CE - E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 12168 – 60356-000 Fortaleza – CE - E-mail: ruannjanser@hotmail.com

RESUMO

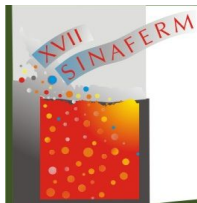
*Os grãos de girassol são utilizados na produção de óleos e margarinas, e extraem-se deles cerca de 400kg de óleo por tonelada de grãos, e ainda, obtém-se 350kg de torta que podem ser utilizados em aplicações biotecnológicas. A produção anual estimada de torta de girassol em 2007 foi de aproximadamente 9,5 milhões de toneladas. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de enzimas proteolíticas por *A. oryzae* IV em fermentação semi-sólida utilizando duas tortas de girassol com diferentes teores de lipídeos. Os resultados obtidos mostraram que a síntese de proteases foi influenciada pela composição físico-química dos resíduos, sendo que a torta de girassol submetida ao processo de deslipidificação mostrou-se mais adequada para a síntese de proteases, alcançando produção máxima de 270 U.g⁻¹ em 48h de fermentação.*

Palavras-chave: torta de girassol, proteases, *A. oryzae*, fermentação semi-sólida.

INTRODUÇÃO

O girassol é uma cultura muito versátil, podendo ser utilizado tanto na alimentação humana quanto na animal. Seus grãos são utilizados na produção de óleos e margarinas, e extraem-se deles cerca de 400kg de óleo por tonelada de grãos, e ainda, obtém-se 350kg de torta (AMABILE *et al.*, 2002) que podem ser destinados para outros fins, como alimentação animal e aplicações biotecnológicas. De acordo com dados estatísticos, a produção anual estimada de torta de girassol em 2007, foi de aproximadamente 9,5 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2009).

A extração de óleos vegetais constitui-se num ramo importante da tecnologia das matérias graxas e as características físico-químicas do resíduo gerado dependem diretamente do processo de extração empregado. Dentre os principais objetivos da extração estão: a obtenção do óleo sem alterações e impurezas; o máximo rendimento de acordo com a economia do processo e a obtenção de uma torta (ou farelo) de máxima qualidade. A torta residual obtida apresenta um alto valor protéico, presença de fibras, e dependendo do processo, até 25% de óleo. Este valor alto de óleo residual encontra-se na torta obtida apenas por prensagem. Apesar de o óleo obtido ser de alta qualidade, há uma grande perda, o que pode ser minimizado com uma etapa de extração por solvente (Balbinot *et al.*, 2009).



A utilização de resíduos ou subprodutos como base de meios de cultivo para produção de enzimas microbianas vem recebendo crescente atenção. Existem algumas enzimas que são facilmente encontradas em diferentes microrganismos, que requerem um destaque especial devido ao seu grande valor econômico. Dentre estas, encontram-se as proteases, que apresentam grande diversidade bioquímica, sendo facilmente manipuláveis, favorecendo suas aplicações biotecnológicas (GIONGO, 2006).

As enzimas microbianas podem ser obtidas tanto em processo líquido submerso, quanto em fermentação em estado sólido (FES).

O termo fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida aplica-se aos processos onde existe crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida. A quantidade de líquido presente garanta um nível de atividade de água que possibilite o desenvolvimento e metabolismo dos microrganismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação com a matriz sólida, ou seja, que não haja água livre no meio (RAIMBAULT, 1998).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos dá origem a substratos alternativos e também auxilia na resolução de problemas de poluição ambiental. Foram desenvolvidos muitos processos para a obtenção de produtos de alto valor comercial como etanol, cogumelos comestíveis, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários e outros (PANDEY *et al.*, 2000).

Um dos fatores que mais influenciam um processo fermentativo é a composição e características do substrato selecionado, que será utilizado pelo microrganismo como fonte de carbono, nitrogênio e outros componentes indispensáveis à manutenção celular, reprodução e produção de metabólitos, como as enzimas. No caso de proteases, a presença de um alto teor de proteínas no meio de cultivo, pode servir como indutor para a produção dessa enzima pelo microrganismo. É válido ressaltar que outros parâmetros de cultivo também exercem influência fundamental no processo fermentativo, como: temperatura de incubação, inóculo inicial, quantidade de água disponível, presença de oxigênio, dentre outros.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de enzimas proteolíticas por *A. oryzae* IV em fermentação semi-sólida utilizando dois tipos de torta de girassol: uma com alto teor de lipídeos e a outra submetida a um processo de deslipidificação parcial.

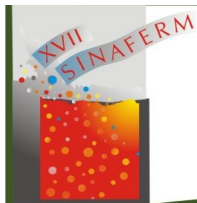
MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo empregado foi *A. oryzae* IV, previamente selecionado como uma linhagem produtora de proteases. A linhagem é mantida estocada (-18°C) na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Matéria-prima empregada

A matéria-prima utilizada como substrato foi torta de girassol gentilmente cedida pela Embrapa Soja.



Processo de deslipidificação da torta de girassol

Parte da torta de girassol originalmente recebida foi submetida a uma dupla lavagem com etanol comercial na proporção de 2:1 (etanol:torta). A fase sólida foi mantida durante 30 minutos em contato com o etanol sob agitação manual. Após a deslipidificação, o resíduo foi mantido em capela com fluxo de ar para evaporação total do solvente.

Caracterização das tortas de girassol

As tortas de girassol tiveram sua composição centesimal determinada, sendo as análises de umidade, cinzas e extrato etéreo realizadas segundo as metodologias descritas em Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985), enquanto a determinação de proteína ocorreu utilizando o método semi-micro de acordo com a metodologia de YEMN e WILLIS (1954). As determinações de sólidos solúveis totais e pH foram realizadas segundo IAL (1985). O resíduo teve sua densidade aparente determinada segundo CORREIA (2004).

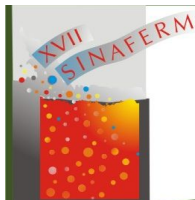
Preparação dos meios de inoculação, processo fermentativo e obtenção do extrato enzimático

As tortas de girassol com diferentes teores de matéria graxa foram empregadas na preparação dos meios. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, baseado em torta de girassol umidificada na proporção de 50mL de água para cada 100g de torta. Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos.g⁻¹. O conteúdo foi homogeneizado e incubado a 30°C por 96h. Amostras eram coletadas a cada 24h. Todas as condições de cultivo foram previamente determinadas como ideais para produção de proteases por *A. oryzae* IV.

A extração do complexo enzimático foi realizada pela adição de 200 mL de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 aos meios fermentados e mantidos a 30°C por 60 minutos. O complexo enzimático foi obtido por filtração com papel qualitativo. A fase líquida resultante foi recolhida e conservada a -18°C em frascos rosqueados para análises.

Determinação da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de CHARNEY e TOMARELLI (1947), utilizando azocaseína como substrato e ácido tricloroacético como agente de precipitação. A formação do composto cromóforo ocorreu pela adição de solução de hidróxido de potássio 5N. A leitura da intensidade de cor ocorreu a 428 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

O alto teor de proteínas e carboidratos nas duas tortas viabiliza a sua utilização como meio fermentativo por ser uma ótima fonte de carbono e nitrogênio, nutrientes estes, imprescindíveis ao metabolismo microbiano (Tabela 1).

Com exceção de umidade, extrato etéreo, sólidos solúveis e densidade aparente, os demais parâmetros apresentaram um aumento nos seus valores quando comparadas as tortas de girassol. A lavagem da torta de girassol, proveniente da extração a frio (prensagem), com etanol promoveu uma diminuição de 72,5% do teor de gordura presente na mesma, provocando assim a concentração de outros nutrientes como cinzas, carboidratos e proteínas (Tabela 1). A diminuição do teor de umidade da torta também é um fator que merece destaque já que é um dos parâmetros que mais influenciam em um processo fermentativo.

A densidade aparente para a torta de girassol desengordurada foi menor (Tabela 1), fator este que pode influenciar diretamente no processo fermentativo, já que as partículas nesse resíduo podem gerar espaços maiores por onde o ar pode circular, ou seja, as partículas não tendem a compactação, melhorando a aeração do meio.

Tabela 1 – Caracterização das tortas de girassol

Parâmetros analisados	Torta de girassol original	Torta de girassol desengordurada
Umidade (%)	8,0 ± 0,03	1,12 ± 0,04
Cinzas (%)	4,31 ± 0,28	12,39 ± 0,24
Extrato etéreo (%)	16,84 ± 0,42	4,63 ± 0,35
Proteína (%)	24,85 ± 1,86	29,26 ± 0,31
Carboidrato total (%)	46,0	50,54
pH	6,03 ± 0,02	6,3 ± 0,02
Sólidos solúveis (°Brix)	23,34 ± 1,44	20 ± 2,50
Densidade aparente (g/mL)	0,438 ± 0,096	0,311 ± 0,007

Os dois tipos de torta de girassol permitiram a síntese de proteases por *A. oryzae* IV. Para a o processo fermentativo utilizando a torta de girassol original (torta com alto teor de lipídeos), a máxima atividade proteolítica observada aconteceu nas primeiras 24h de fermentação, com produção de 164 U.g⁻¹ e produtividade de 6,9 U.g⁻¹.h⁻¹, com queda na produção nos tempos subsequentes analisados. A torta de girassol desengordurada permitiu uma maior síntese de proteases, havendo um ganho de 48,2% de produção nas primeiras 24h de fermentação quando comparada ao processo fermentativo utilizando a torta com gordura, resultando em uma produção de 243 U.g⁻¹ e produtividade de 10,2 U.g⁻¹.h⁻¹. Contudo a atividade máxima obtida nessa fermentação foi em 48h, com produção de 270 U.g⁻¹ de proteases (Figura 2).

O aumento na produção ao utilizarmos a torta de girassol desengordurada como substrato pode ser explicado tomando os resultados da composição química das tortas. A retirada da gordura promoveu uma concentração do teor de proteínas, nutriente este que possui função indutora para o microrganismo na síntese da enzima proteolítica.

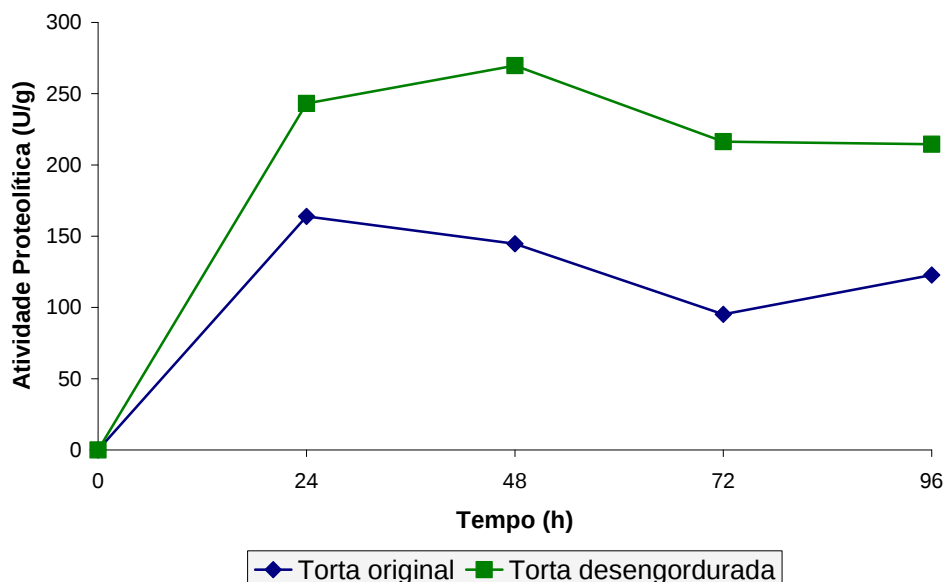
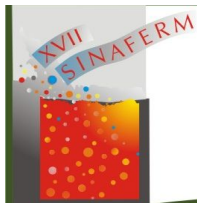


Figura 1 - Comparação da produção de proteases utilizando tortas de girassol com alto teor de lipídeos (original) e desengordurada.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a síntese de proteases por *A. oryzae* IV em fermentação semi-sólida foi influenciada pela composição físico-química dos resíduos, onde a torta de girassol submetida ao processo de deslipidificação mostrou-se mais adequada para a síntese de proteases, alcançando produção máxima de 270 U.g⁻¹ em 48h de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABILE, R. F.; FERNANDES, F. D.; SANZONOWICS, C. (2002), Girassol como alternativa para o sistema de produção do cerrado. *Circular Técnica. Embrapa*.

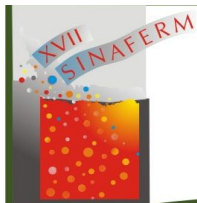
BALBINOT *et al.* (2009), Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo. Disponível em : <www.bvsde.paho.org/bvsaidis/uruguay30/BR05423_Balbinot.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2009.

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M., (1947), A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chemical.*, 170, 23: 501-505.

CORREIA, R. T. P. (2004), Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

FAOSTAT (2009), *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. Disponível em : <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em : 9 fev. 2009.

GIONGO, J. L. (2006), Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.



XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. v. 1, 21-45 p.

PANDEY, A; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. (2000), Biotechnological potencial of agro-industrial residues: II Cassava bagasse. *Bioresource Technology*. V. 74, p. 81-87.

RAIMBAULT, M. (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Eletronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3.

YEMN, E.W. & WILLIS, A.J. (1954), The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.*, 57. 508-14.