



Caracterização da Torta de Canola durante o Processo Fermentativo para Produção de Proteases

Adriana Crispim de Freitas^{1,2}, Ruann Janser Soares de Castro^{1,3}, Talita Macedo dos Santos^{1,3} e Gustavo Adolfo Saavedra Pinto^{1,2}

¹Embrapa Agroindústria Tropical – Laboratório de Bioprocessos
CEP - 60511-110 – Fortaleza – CE, E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química
CEP - 60455-760 – Fortaleza – CE, E-mail: adrianacfreitas@yahoo.com.br

³Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 12168 – CEP - 60356-000, Fortaleza – CE

RESUMO

A fermentação em estado sólido é um processo microbiano que trata principalmente da utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo para microrganismos capaz de promover a redução dos custos de obtenção de compostos de valor agregado. . Desta forma, estudos sobre a utilização de diferentes substratos para a produção de proteases em meio sólido podem contribuir no sentido de se encontrar combinações ideais para se obter esse tipo de enzima com altos rendimentos, utilizando substratos que possibilitem a redução dos custos do processo de produção em escala industrial. Este trabalho investigou a caracterização física e química do meio durante o processo fermentativo. A torta de canola mostrou-se potencial para a síntese de protease, como uma fonte fermentativa rica em nutrientes necessários para o crescimento do fungo e para a produção da enzima.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; atividade enzimática; pH; caracterização físico-química.

INTRODUÇÃO

Fermentação semi-sólida (FSS) é definida como um processo fermentativo no qual o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre, geralmente utilizando matéria-prima natural como fonte de carbono e energia. A utilização de resíduos agroindustriais do processamento de frutos e grãos é certamente econômica para produção de compostos de valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos e aromas (PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998).

Proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, fazem parte da classe de enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. Constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas mundialmente. Sendo 2/3 do total de vendas representado pelas proteases de origem microbiana (RAO *et al.*, 1998; SANDHYA *et al.*, 2005).

Os fungos produzem uma ampla variedade de enzimas quando comparado com as bactérias, por exemplo, diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae* produzem protease ácida, neutra e alcalina, tanto por fermentação submersa como em estado sólido. A FSS vem recebendo



atenção por apresentar vantagens em relação à fermentação submersa, como a natureza extracelular da enzima, elevados níveis de atividade e produtividade, utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato (RAO *et al.*, 1998).

A torta de canola é um subproduto do processo de extração do óleo de canola, apresentando como uma excelente fonte de proteína, 34 a 38%, e constituindo um excelente suplemento protéico na formulação de rações para bovinos, suínos, ovinos e aves (OLIVEIRA e FURTADO, 2001; TOMM, 2005).

Neste trabalho, determinou-se a caracterização do meio ao longo do processo fermentativo para a produção de proteases por fermentação semi-sólida da torta de canola por *A. oryzae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do substrato sólido

A torta de canola foi gentilmente doada pela unidade da Celena Alimentos, localizada em Eldorado do Sul no Rio Grande do Sul. A torta, obtida no processo de extração do óleo de canola, foi utilizada como substrato para as fermentações sem passar por tratamento adicional.

Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi *Aspergillus oryzae*, da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Preparação do meio para inoculação

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 500 mL com 40 g de torta de canola umedecida com água destilada (40 mL de H₂O/100 g de torta de canola), conforme descrito por Freitas, (2009). Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com solução de esporos de 10⁷ esporos.g⁻¹. O conteúdo foi homogeneizado e os frascos foram incubados em BOD a 20°C durante 96 horas, com amostras sendo retiradas a cada 24 horas.

Extração do complexo enzimático

A enzima foi extraída do meio pela adição de tampão acetato de sódio 200 mM pH 5,0 na razão de 100 mL de solução por 40 g de meio fermentado, permanecendo incubado em BOD a 30°C por um período de 1 hora, filtrada com papel de filtro qualitativo e utilizada na determinação da atividade enzimática (GOMES, 1995).

Atividade enzimática de protease

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 absorvância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

Parâmetros estudados durante o processo fermentativo

Com o objetivo de determinar as características físico-químicas do meio fermentativo foram determinados: umidade (IAL, 2004), cinzas (IAL, 2004), proteínas (método de Kjeldahl, recomendado pela AOAC, 1975), lipídeos (IAL, 2004) e carboidratos (Método da diferença de 100, subtraindo o teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade), além do teor de amido (método AOAC, 1992 e Miller, 1959), pH e atividade de água (método do higrômetro de ponto de orvalho em aparelho AQUALAB Decagon modelo CX-2).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve uma diminuição da umidade, este fato deve-se ao ressecamento do meio durante o período fermentativo. A concentração de amido também foi diminuída durante o processo fermentativo, sendo utilizado para formação da biomassa microbiana. Houve uma redução no teor de proteína durante o processo, no início do processo apresentou valor de 49,05% e em 96 h de 42,08% sendo utilizado pelo microrganismo para crescimento e formação da enzima (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização físico-química do meio durante o processo fermentativo.

Tempo (h)	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídeos	Amido	Carboidratos Totais
0	38,07±0,02	7,31±0,03	49,05±0,31	1,17	4,35	42,47
24	35,04±0,06	6,92±0,01	46,74±0,34	0,92	2,93	45,41
48	36,26±0,35	7,53±0,25	47,62±0,41	2,02	2,56	42,83
72	35,37±0,12	7,84±0,06	41,72±0,04	1,06	2,01	49,38
96	35,41±0,89	7,40±1,09	42,08±0,08	2,29	1,55	48,23

Valores foram obtidos a partir da média de 3 amostras e determinados em base seca.

Observou-se a maior produção de proteases no tempo de 72 h, obtendo aproximadamente 270 U.g⁻¹ (Figura 1). Sandhya *et al.* (2005) compararam a produção de proteases por *A. oryzae* NRRL 1808 por fermentação semi-sólida e submersa, e ambos os processos observou que após 72 horas mostrou um rápido declínio no rendimento da enzima. Em contrapartida, a velocidade de formação da enzima até 48 horas e houve uma queda nos tempos amostras

seguinte. O valor máximo de produtividade foi de aproximadamente $5 \text{ U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 48 horas (Figura 2).

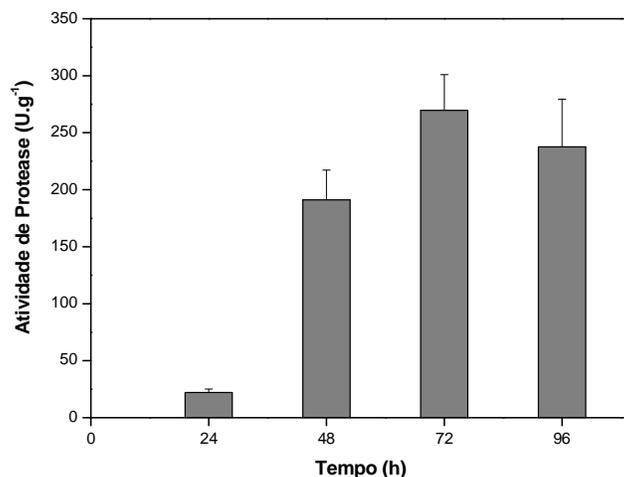


Figura 1 – Atividade de proteases durante o processo fermentativo.

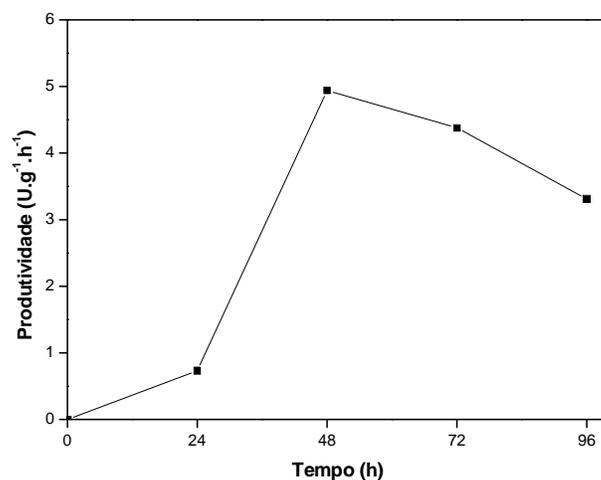


Figura 2 – Produtividade com amostra retiradas entre 0 e 96 horas.

Analisando o perfil do pH do meio ao longo do processo fermentativo (Figura 3), pode-se afirmar que houve um leve aumento, apresentou valor de 5,93 em 0 h e 7,0 em 96 horas, este aumento pode está relacionado as características da enzima sintetizada pelo fungo em estudo.



O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo.

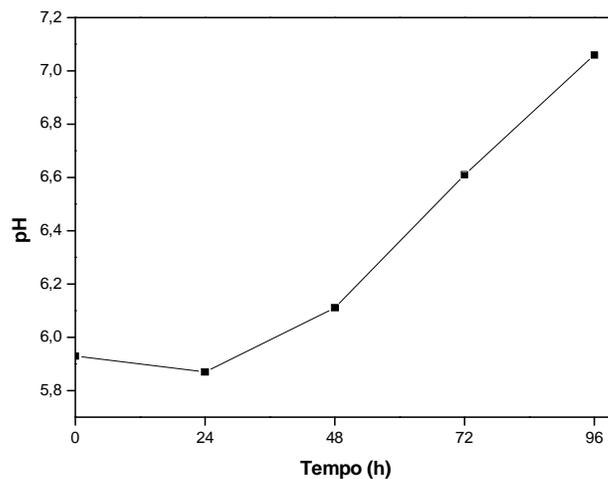


Figura 3 – pH do meio durante o processo fermentativo

Os valores da A_w estão relacionados com o teor de umidade do meio. Com o ressecamento do meio, fator indicado pela queda nos valores da umidade do meio, os valores de atividade de água também decresceu ao longo do período fermentativo.

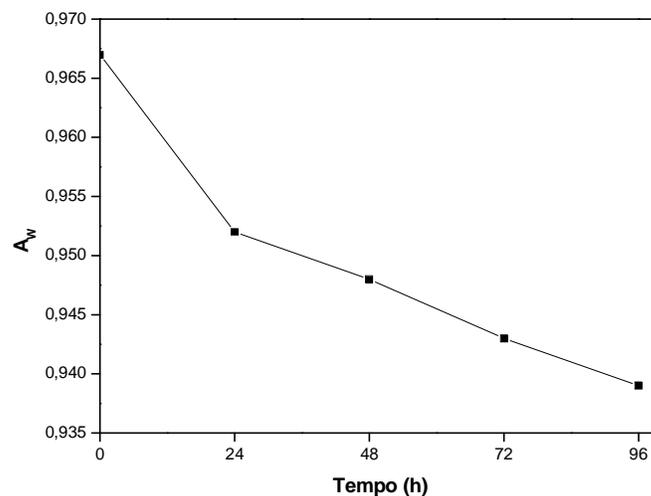


Figura 4 – Atividade de água dos meios de cultivo

Em consequência da redução da umidade, o meio de cultura apresentou também redução nos valores de A_w (Figura 4). Isto em parte pode ser explicado pela absorção de água pela cultura em crescimento e pela perda para a fase gasosa. Desta forma, uma redução do



crescimento e da síntese de protease seria um desdobramento esperado da redução continuada da Aw. A atividade de água está relacionada à quantidade de água livre disponível para o desenvolvimento do microrganismo. O teor de umidade mostra a concentração de água existente no material em estudo.

CONCLUSÕES

Meio semi-sólido baseado em torta de canola mostra potencial para a síntese de proteases, a torta apresentou-se como uma fonte fermentativa rica em nutrientes necessários para o crescimento do fungo e para a produção da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (1992). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*, 11. ed. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Washington.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. (1947), A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, v.170, n. 23, p. 501-505.

FREITAS, A. C. (2009), Produção de proteases por *Aspergillus* em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

GOMES, C. A. O. (1995), Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

IAL (2004), *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 4 ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, Brasil.

OLIVEIRA, K.; FURTADO, C. E. (2001) Digestibilidade Aparente de Dietas com Diferentes Níveis de Farelo de Canola para Cavalos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 30, p. 181-186.

PANDEY, A. (2003) Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.81-84.

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

RAO, M.B. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY A. (2005) Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2689–2694.

TOMM, G. O. (2005) Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento online* 26 Embrapa Trigo. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm.