



Efeito da adição de fontes de fósforo e nitrogênio na Produção de Proteases por Fermentação semi-sólida da Torta de Canola

Adriana Crispim de Freitas^{1,2} 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: adrianafreitas@yahoo.com.br

RESUMO

*Fermentação semi-sólida um processo que acontece principalmente na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Proteases 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. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de fontes de fósforo e nitrogênio na produção de proteases por fermentação semi-sólida de torta de canola com *A. oryzae*. Os meios foram preparados a partir da torta de canola umedecida com água (40 mL de H₂O/100g de bagaço). A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 500 mL com 40 g de meio. Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados, em seguida, incubados por 96 horas. O extrato de levedura foi à melhor fonte de nitrogênio suplementar, porém a adição de fosfato não influenciou positivamente na produção de proteases.*

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; fosfato de sódio, nitrogênio orgânico e inorgânico.

INTRODUÇÃO

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 no mundo. Sendo 2/3 do total de vendas representado pelas proteases de origem microbiana (Rao, 1998; Sandhya *et al.*, 2005).

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. A FSS vem recebendo atenção por apresentar vantagens em relação à fermentação submersa: natureza extracelular da enzima, elevados níveis de



atividade e produtividade, utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato (Pandey, 2003; Raimbault, 1998; Rao, 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, investigou-se a influência da adição fontes de fósforo e nitrogênio na produção de proteases fermentação semi-sólida de 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 absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.



Parâmetros estudados durante o processo fermentativo

Avaliaram-se, nesse trabalho, parâmetros que intensificassem a produção de proteases por *A. oryzae*. Para tal fim, estudou-se a adição de diferentes fontes de nitrogênio orgânico (peptona e extrato de levedura) e inorgânico (nitrato de sódio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e uréia) e a suplementação de fosfato de sódio monobásico como fonte de fósforo na concentração de 1% em relação ao meio sólido.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O meio controle e o meio com adição de fosfato apresentaram valores crescentes na produção de proteases durante todo o processo fermentativo. Em 24 horas de fermentação, a atividade enzimática do meio suplementado com fosfato e a fermentação controle apresentaram valores bem próximos. Sem a presença da fonte de fósforo, a atividade de proteases determinada atingiu seu máximo com 96 horas de fermentação ($349,4 \text{ U.g}^{-1}$). No meio suplementado com fosfato a atividade de proteases atingiu seu máximo também com 96 horas de fermentação ($304,9 \text{ U.g}^{-1}$) de acordo com a Figura 1. Este fato indica que a adição do fosfato não influenciou positivamente o aumento da produção de proteases, obteve-se uma menor produtividade, quando comparada a fermentação controle (Tabela 1).

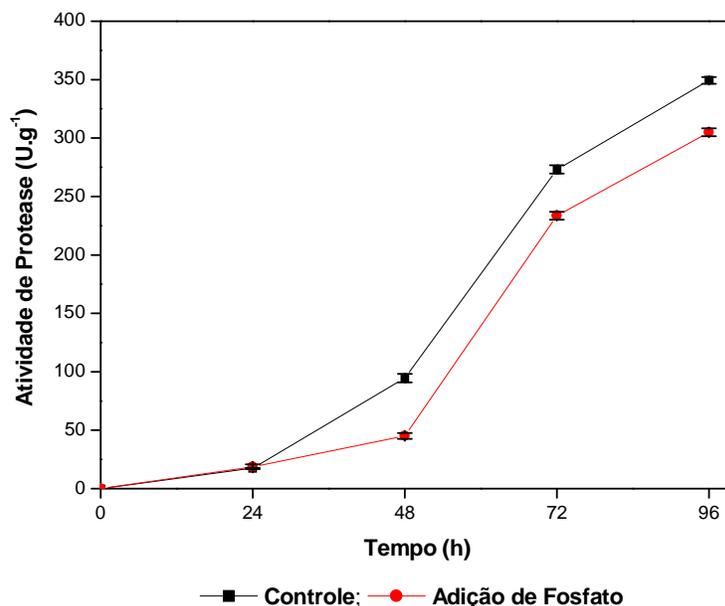


Figura 1 – Perfil comparativo da produção de proteases entre a fermentação controle e a fermentação suplementada com 1% de fonte de fósforo.



Pinto (2003) adicionou 1% de fosfato de sódio monobásico no farelo de trigo, obtendo um aumento na produção de tanase de 182% em 24 horas de fermentação. Porém, neste estudo a fonte de fósforo não influenciou na produção de proteases.

Pode-se observar que em 24 horas de processo fermentativo os dois meios apresentaram valores de produtividade muito próximos, durante todo período de fermentação houve um aumento crescente na produtividade de ambos os meios analisados. O valor máximo de produtividade do controle e do meio com adição de 1% de fosfato ocorreu no tempo de 96 horas com valores de 3,64 e 3,18 $\text{U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. Porém, pode ter ocorrido uma inibição na produção de proteases pelo microrganismo na presença do fosfato no meio (Tabela 1).

Tabela 1 - Influência da adição de fosfato de sódio monobásico na produtividade de protease.

	Tempo de Fermentação (horas)			
	24	48	72	96
Controle ($\text{U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,73	1,97	3,79	3,64
Meio c/ NaH_2PO_4 ($\text{U.g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,78	0,94	3,24	3,18

A produção de proteases em todos os meios analisados ocorreu de forma crescente ao longo do processo fermentativo, com pico de produção em 96 horas. O meio com sulfato de amônio apresentou menor produção (256 U.g^{-1}). Os meios com adição de peptona, uréia e nitrato de amônio apresentaram uma produção de proteases com valores próximos aos valores obtidos pela fermentação controle, esta apresentou maior produção em 96 horas de fermentação obtendo 350 U.g^{-1} . Das fontes inorgânicas, o nitrato de sódio apresentou maior produção (366 U.g^{-1} em 96 horas), já os meios suplementados com fontes de nitrogênio orgânico foi o extrato de levedura que apresentou maior produção. Pode-se observar que adição de 1% de extrato de levedura, em relação ao meio sólido, influenciou positivamente na maior produção de proteases, com produção de aproximadamente 393 U.g^{-1} em 96 horas de fermentação (Figura 2).

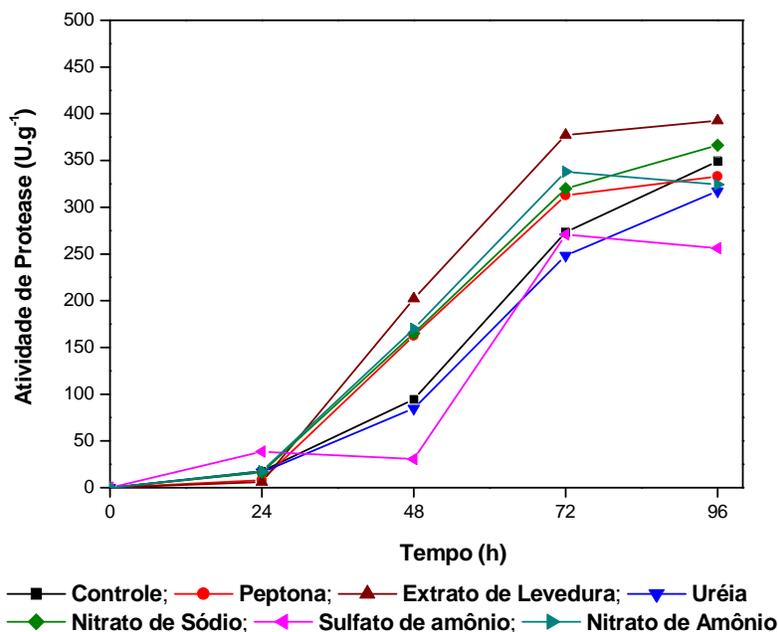


Figura 2 - Produção de proteases nos meios com adição de 1% de fonte inorgânica de nitrogênio no meio fermentativo.

Alguns autores em seus estudos adicionaram fontes de nitrogênio para avaliar a influência destas na produção de proteases. Malathi e Chakraborty (1991) adicionaram fontes de nitrogênio ao farelo de trigo, na produção de protease alcalina por *Aspergillus flavus*. Sumantha *et al.* (2006) suplementaram diferentes fontes de nitrogênio ao farelo de arroz para produção de proteases, utilizaram *Rhizopus microsporus* NRRL 3671.

CONCLUSÕES

Resultados obtidos neste trabalho mostraram que a suplementação do meio com nitrogênio exerceu positivamente para a produção de proteases, sendo o extrato de levedura a melhor fonte de nitrogênio suplementar, seguida de nitrato de sódio.

A suplementação do meio fermentativo com fosfato de sódio não influenciou na produção de proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

Malathi, S.; Chakraborty, R. (1991); Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-state fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied Environmental Microbiology*, v. 57. p. 712-716.

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. *Journal Biochemical Engineering*, v.13, n.2/3, p.81-84.

Pinto, G.A.S. (2003), Produção de tanase por *Aspergillus Níger*. *Tese de Doutorado - Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos*, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Raimbault, M. (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal Electronic 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.

Sumantha, A.; Deepa, P.; Sandhya, P.; Szakacs, G.; Soccol, C.R.; Pandey, (2006), A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 5, p. 843-851.

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.