



Efeito da Quantidade Inicial de Água na Síntese de Protease por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato.

Ruann Janser Soares de Castro^{1,2}, Adriana Crispim de Freitas^{1,3}, 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

³Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química
CEP - 60455-760 – Fortaleza – CE, E-mail: adrianacfreitas@yahoo.com.br

RESUMO

*Muitos estudos sobre aplicações da fermentação semi-sólida envolvem a agregação de valor a resíduos agroindustriais, uma vez que a base da economia brasileira atual está voltada diretamente à produção agroindustrial. Desta forma, estudos sobre a utilização de diferentes substratos para a produção de enzimas pelo processo semi-sólido podem contribuir no sentido de se obter altos rendimentos, utilizando substratos que possibilitem a redução dos custos do processo e produção em escala industrial. O objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato e avaliar o efeito da adição de diferentes volumes de água sobre a síntese da enzima. Dentre os resíduos avaliados, o farelo de algodão foi o mais adequado para a produção da enzima, alcançando 290,9 U.g⁻¹ de protease em 48h de fermentação em meio formulado continha 25mL de água para 100g de resíduo.*

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, fermentação semi-sólida, proteases.

INTRODUÇÃO

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, onde 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 produção de enzimas extracelulares por microrganismos em FES apresenta várias vantagens econômicas quando comparada a fermentação submersa, dentre as quais podemos citar: o uso de agro-resíduos industriais como substratos simples, requisito mínimo de água e produção de metabólitos de forma mais concentrada. Entre os vários grupos dos



microrganismos utilizados em FES, fungos filamentosos são os mais explorados devido a sua capacidade de crescer e produzir uma vasta gama de enzimas (CHELLAPAN, 2006).

Proteases constituem um dos grupos de grande importância comercial, representando quase 60% do total das enzimas industriais do mercado (RAO *et al.*, 1998; BANERJEE *et al.*, 1999). Estas enzimas são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, particularmente nos detergentes, produtos alimentícios, farmacêuticos, químicos, couro e seda, tratamento de resíduos (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Muitos estudos sobre aplicações da FES envolvem a agregação de valor a resíduos agroindustriais, uma vez que a base da economia brasileira atual está voltada diretamente à produção agroindustrial. A produção ou processamento de diversos grãos e insumos agrícolas envolve a geração de resíduos que têm sido utilizados como substrato ou suporte para FES (VARGAS, 2004). Dentre os resíduos mais utilizados podemos citar os resíduos de café (borra, casca), bagaço de cana de açúcar, farelos e torta de soja, trigo, gergelim, babaçu, canola, torta de girassol e bagaço de mandioca.

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. O objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de protease por *A. oryzae* IV em fermentação semi-sólida utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato e avaliar o efeito da adição de diferentes volumes de água sobre a síntese da enzima.

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.

Resíduos agroindustriais empregados

Os resíduos utilizados foram: torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da casca da castanha de caju, farelo de soja e farelo de algodão, gentilmente cedida pelas empresas: Celena Alimentos, Embrapa Soja, Moinho Dias Branco, Iracema e Bunge.

Processo fermentativo

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, onde os resíduos agroindustriais foram umidificados com água. O meio baseou-se na adição de água em diferentes proporções (25, 50, 75, 100, 125 e 150mL para cada 100g de substrato). Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos (10^7 esporos.g⁻¹). O conteúdo foi homogeneizado. Os frascos foram incubados a 30°C por 96 horas e as amostras eram coletadas a cada 24 h.



Determinação da atividade de água (A_w)

A atividade de água nos meios formulados e autoclavados foi medida pelo método do higrômetro de ponto de orvalho em aparelho AQUALAB Decagon modelo CX-2.

Obtenção do extrato enzimático

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

A melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas, nos materiais, refere-se à determinação de sua atividade de água (A_w), ou seja, do teor de água livre, a qual estará disponível para reações físicas, químicas e microbiológicas, permitindo o desenvolvimento e reprodução dos microrganismos. Os resíduos possuíam diferentes valores de A_w antes da adição de água, onde a película da casca da castanha de caju apresentou o menor valor (0,42) e o farelo de soja apresentou o maior valor (0,69) (Figura 1). Observou-se que independente da matéria-prima utilizada, a A_w mostrou-se similar para cada quantidade de água adicionada (Figura 1). Com relação à influência de A_w na síntese de enzimas extracelulares, valores de A_w entre 0,95 e 0,98 são considerados ótimos para a produção de enzimas por fungos filamentosos em fermentação semi-sólida, valores estes encontrados para todos os substratos utilizados neste estudo (MITCHELL *et al.*, 2000; MACIEL, 2006; ALCÂNTARA *et al.*, 2008).

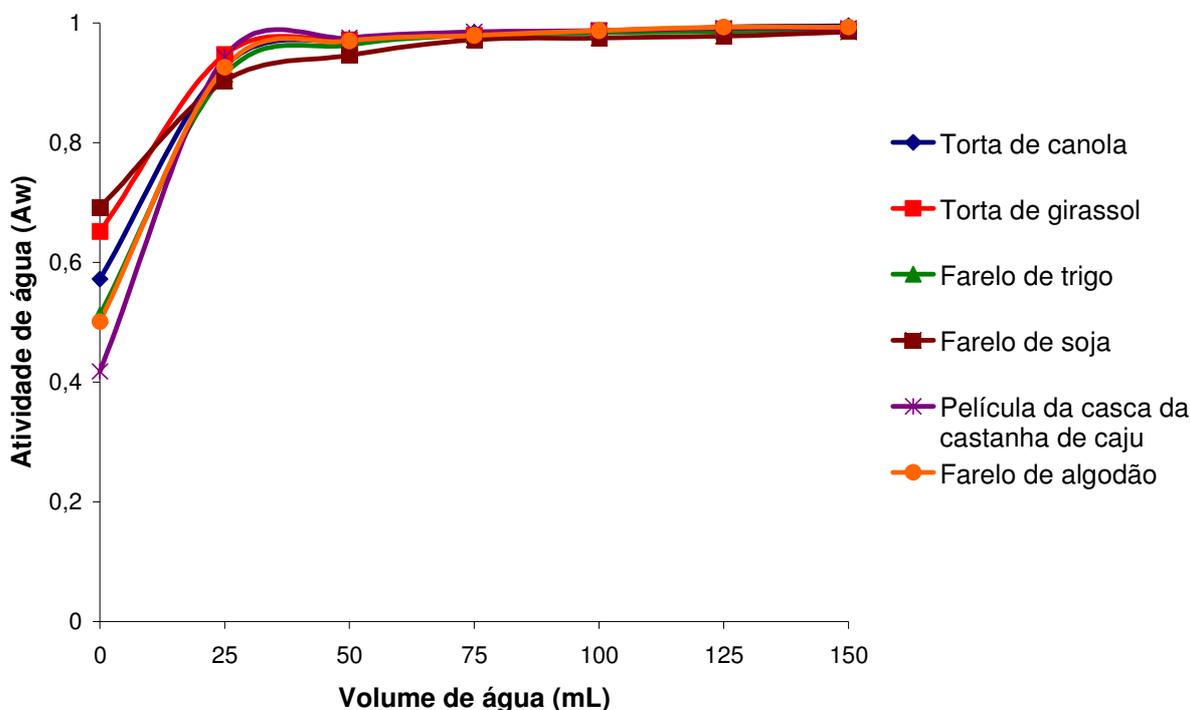


Figura 1 – Comportamento de Aw nos resíduos frente à adição de água.

Todos os resíduos utilizados como substrato permitiram a síntese de proteases em todos os volumes de água avaliados, com exceção da película da casca da castanha de caju, onde a atividade proteolítica só foi detectada nos tempos de 24h e 48h mediante a adição de 125mL de água para cada 100g de resíduo com produção média de $15,16 \text{ U.g}^{-1}$ de protease (Figura 2).

Em termos gerais, a adição de volumes maiores de água aos substratos prejudicou a produção da enzima pelo fungo; este fato só não foi observado para o farelo de trigo, que manteve uma produção crescente à medida que as porções de água eram adicionadas, alcançando máxima produção em 24h de fermentação com $211,2 \text{ U.g}^{-1}$ de protease quando o meio formulado continha 125mL de água para cada 100g de resíduo (Figura 2). Para todos os outros resíduos, os picos de produção concentraram-se nos meios adicionados de água na faixa de 25 a 75mL. A máxima produção foi observada quando 25mL de água foram adicionados a 100g de farelo de algodão, alcançando $290,9 \text{ U.g}^{-1}$ de protease em 48h de fermentação (Figura 2).

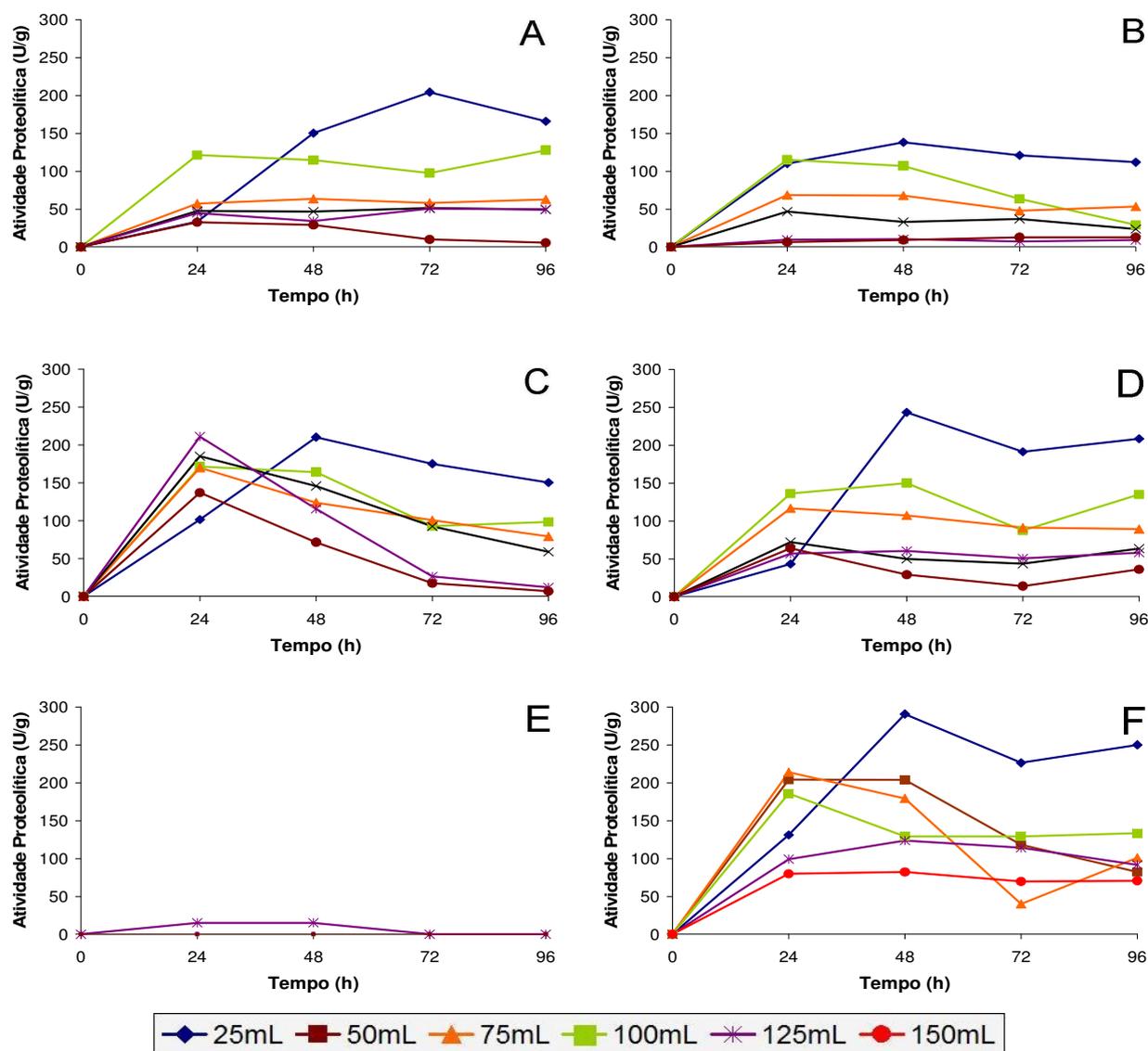


Figura 2 – Efeito da adição de água sobre a síntese de protease utilizando diferentes resíduos como substrato: torta de canola (A), torta de girassol (B), farelo de trigo (C), farelo de soja (D), película da casca da castanha de caju (E) e farelo de algodão (F).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a maior parte dos resíduos agroindustriais avaliados apresenta grande potencial para a produção de proteases em fermentação semi-sólida. No geral, a síntese de proteases foi prejudicada quando maiores volumes de água foram adicionados, com exceção do farelo de trigo. A película da casca da castanha de caju foi a que menos favoreceu a produção da enzima. Dentre todos os resíduos avaliados, o farelo de algodão permitiu uma maior síntese enzimática, alcançando $290,9 \text{ U.g}^{-1}$ de protease em 48h de fermentação, onde o meio formulado continha 25mL de água para 100g de resíduo.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, S. R., ALMEIDA, F. A. C., SILVA, F. L. H. (2008), Cinética de produção de poligalacturonases por fermentação semi-sólida utilizando pedúnculo de caju. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Recife.

BANERJEE U. C., SANI R.K., AZMI W., SONI R. (1999), Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem*, v.35, p.213–219.

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.

CHELLAPPAN *et al.* (2006), Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.41, p. 956–961.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. (1999), Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v.17, p.561–594.

MACIEL, G. M. (2006), Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

MITCHEL, D. A., BEROVIC, M., KRIEGER, M. (2000), Biochemical aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v.68, p. 61-138.

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

RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV (1998), Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Ver*, v.62, p.597–635.

VARGAS, G. D. L. P. (2004), Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brasil.