



# INAFERM 2011

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos

Realização:



Associação Brasileira  
de Engenharia Química

ISSN 2236-5184

Universidade de Caxias do Sul  
Cidade Universitária - Bloco M - UCS Teatro  
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil  
24 a 27 de julho de 2011

Todos os direitos reservados - Desenvolvido por Adaltech Soluções para Eventos



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos  
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

# INAFERM 2011

## Produção de Enzimas Proteolíticas por Fermentação semi-sólida em Condições Dinâmicas

Adriana Crispim de Freitas<sup>1,4</sup>, Rafael Frederico Fonseca<sup>2,3</sup>, Victor Bertucci Neto<sup>3</sup>,  
Cristiane Sanchez Farinas<sup>3</sup>, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE;  
[adrianafreitas@yahoo.br](mailto:adrianafreitas@yahoo.br);

<sup>2</sup>Programa de pós-graduação em Engenharia Elétrica, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP;

<sup>3</sup>Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP;

<sup>4</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

### RESUMO

*Proteases representam importante classe de enzimas que respondem por aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas, sendo 2/3 do total de vendas representado pelas proteases de origem microbiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por fermentação semi-sólida de torta de canola em condições dinâmicas utilizando reator instrumentado. As condições das fermentações foram conduzidas segundo um planejamento fatorial linear completo  $2^3$  e delineamento composto central (DCCR), variando-se a umidade relativa do ar, a umidade inicial do inóculo e a aeração. Os melhores resultados obtidos em reator de colunas foi de 504U.g<sup>-1</sup> base seca.*

**Palavras-chave:** Proteases, Fermentação semi-sólida, *Aspergillus*, Biorreator de colunas; Torta de canola.

### 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. 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 *et al.*, 1998).

Apesar das vantagens a FSS ainda apresenta dificuldades de aplicação em escala industrial devido à dificuldade de controle e monitoração das variáveis durante o processo. Isso ocorre devido à ausência de água livre no processo, a baixa condutividade térmica dos substratos sólidos e a baixa capacidade térmica do ar, que limitam a remoção de calor produzida pelo crescimento fúngico (WEBER *et al.*, 1999). A literatura apresenta poucas informações sobre instrumentação e automação aplicadas a processos de FSS. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por fermentação semi-sólida de torta de canola em condições estáticas e dinâmicas.



### Matéria-Prima

A torta de canola, subproduto do processo de extração do óleo de canola, foi cedida gentilmente pela empresa Celena Alimentos localizada em Eldorado do Sul no Rio Grande do Sul.

### Microrganismo

A linhagem utilizada foi o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* IV pertencente a coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical.

### Preparação do meio para inoculação

O meio para a fermentação semi-sólido era constituído basicamente de torta de canola umidificada com água destilada. Para garantir a uniformidade das amostragens, o meio foi preparado em béquer de polipropileno adicionando-se lentamente água destilada a torta de canola e realizada a homogeneização. Os meios foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com solução de esporos de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup>. O conteúdo foi homogeneizado e os frascos foram incubados em estufa a 20°C durante 96 horas.

### Biorreator de colunas Instrumentado

Após a seleção das melhores condições de operação da FSS em erlenmeyers foi realizada estuda em biorreator do tipo colunas adaptado a partir do modelo de Raimbault and Germon, (1976) com aeração forçada, em escala laboratorial, composto de 12 colunas (2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) regularmente dispostas em banho termostático. Depois do período de fermentação, o sólido fermentado foi transferido para Erlenmeyers e a enzima extraída pela adição de 0,2 mol/L de tampão acetato de sódio em pH 5,0 em cada frasco. A suspensão foi agitada a 100 rpm por 1 hora a 30°C, a solução enzimática foi recuperada por filtração. Os extratos de enzimas recuperadas foram armazenadas a -18°C para posterior análise.

### Planejamento Experimental

O delineamento fatorial  $2^3$  completo, resultando em 8 experimentos, incluindo 3 pontos centrais, foi utilizado para avaliar os efeitos da taxa de fluxo de ar, umidade relativa do ar e umidade inicial do substrato sobre a eficiência da produção de protease. Os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados são apresentados na Tabela I. A seleção dos valores foi baseada em dados não publicados e em experimentos preliminares.

Tabela I. Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial  $2^3$  completo.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
fluxo de ar – x1	12	24	36
Umidade relativa do ar (%) – x2	60	70	80
umidade inicial do substrato (%) – x3	30	40	50



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos  
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

# INAFERM 2011

Foi aplicado um delineamento estatístico do tipo composto central rotacional (DCCR). O DCCR consistiu em um planejamento completo  $2^2$  com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, objetivando-se a otimização da atividade proteolítica através da metodologia de resposta. Os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados são apresentados na Tabela II.

Tabela II - Valores das variáveis independentes utilizadas no DCCR.

Variáveis		Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Umidade do ar (%)	$x_1$	66	70	80	90	94
Umidade do substrato %	$x_2$	16	20	30	40	44

### 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 estufa 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.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo das variáveis operacionais do reator em colunas foi empregado um planejamento fatorial completo. Avaliou-se o efeito e a significância de 3 variáveis independentes: umidade do substrato (%), umidade relativa do ar (%) e vazão do ar ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) através de um delineamento  $2^3$ , com 3 (Tabela I). Os valores das variáveis independentes e as respostas para as atividades enzimáticas de protease são apresentados na Tabela III, onde observou-se que o máximo valor de produção enzimática alcançado foi de  $355 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  quando o reator estava operando nas condições de máxima umidade relativa do ar e umidade do substrato, variando apenas a vazão do ar em valores de máximo e mínimo testados. Estes resultados mostram que a vazão do ar não interfere em uma maior produção de protease.

Tabela III. Planejamento fatorial  $2^3$  completo com atividade da protease ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Ensaio	Umidade do substrato	Umidade relativa do ar	Fluxo de ar (vazão)	Atividade de protease ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	-1	-1	-1	244,06
2	1	-1	-1	259,375



3	-1	1	-1	305,46
4	1	1	-1	355,47
5	-1	-1	1	195,31
6	1	-1	1	261,41
7	-1	1	1	284,22
8	1	1	1	355,31
9 (C)	0	0	0	295,0
10 (C)	0	0	0	294,38
11 (C)	0	0	0	285,31

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, desenvolveu-se um novo planejamento de experimentos baseado no delineamento composto central rotacional (DCCR) através de um planejamento fatorial completo  $2^2$ , com quatro pontos axiais e três pontos centrais e os resultados de atividade de protease obtidos representados na Tabela IV, a vazão do ar foi fixada em  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A maior atividade de protease foi obtida nos meios fermentativos com umidade do substrato inicial de 40% e incubado com umidade relativa do ar de 90%.

Tabela IV. Ensaios, níveis de umidade relativa do ar, umidade do substrato e atividades de protease ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Ensaio	Umidade relativa do ar (x1)	Umidade do substrato (x2)	Atividade de protease em base seca ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	-1	-1	163,671875
2	-1	1	379,166667
3	1	-1	387,5
4	1	1	504,166667
5	-1,41	0	476,785714
6	1,41	0	482,589286
7	0	-1,41	43,1547619
8	0	1,41	450,334821
9 (C)	0	0	470,535714
10 (C)	0	0	444,196429
11 (C)	0	0	457,142857

A umidade relativa do ar, dentro da faixa estudada, não se mostrou um efeito significativo na produção enzimática, já as umidades do substrato lineares e quadráticas foram significativas (Figura I).

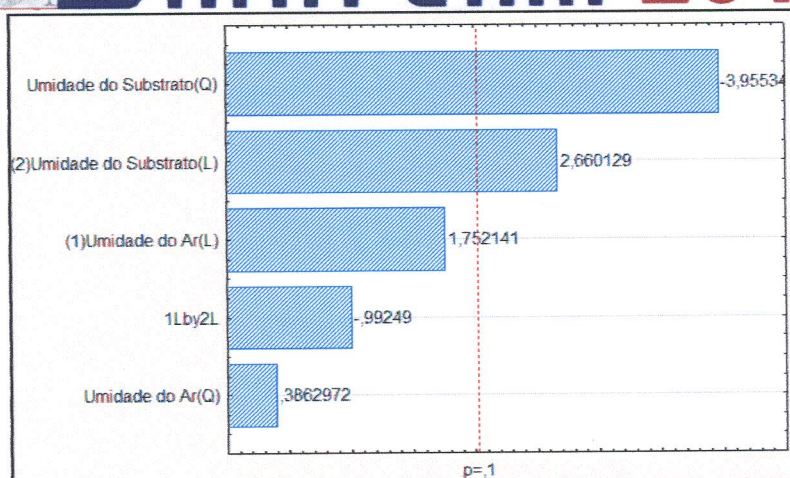


Figura I. Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com  $p \leq 0,1$ .

Na validação estatística dos modelos aplicou-se análise de variância (ANOVA) para cálculo do valor F (Teste Fisher), os resultados são apresentados na Tabela V. A verificação dos resultados mostra a superioridade no valor de F calculado frente ao do F tabelado, fato que valida o modelo na região estudada com 90% de confiança. O teste F mostrou que o modelo utilizado se ajustou adequadamente com os dados experimentais, sendo 7,04 vezes maior que o F tabelado.

Tabela V. Análise de variância (ANOVA) das respostas da umidade do substrato e umidade relativa do ar.

Variáveis Estatísticas	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados
Regressão	69260,55	2	69260,55
Resíduo	25296,76	8	3162,10
Total	94557,31	10	
$F_{(Modelo)}$		21,90	
$R^2$		0,897	
Nível de confiança		90%	
$F_{tab} (2; 8; 0,1) =$		$F_{Tabelado} =$	3,11
		$F_{Modelo} / F_{Tabelado} =$	7,04

A superfície de resposta resultante do modelo para produção de proteases apresentada na Figura II observou-se que as melhores condições obtidas foram nos pontos centrais. Valores de umidade do substrato abaixo de 30% levaram a um afastamento da região de ótimo. Como reportado por Acuña-Arguelles et al. (1994), Raghavarao et al. (2003), os baixos teores de umidade inicial reduzem a produção enzimática, pois causam alterações morfológicas na membrana do fungo limitando o transporte por difusão e osmose, afetando com isto o metabolismo microbiano. Portanto, ressalta-se o a manutenção de um equilíbrio adequado entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio. Visto que o ar utilizado para aeração do meio foi previamente umidificado, dificuldades no sentido de secagem no substrato foram prevenidas neste sistema.

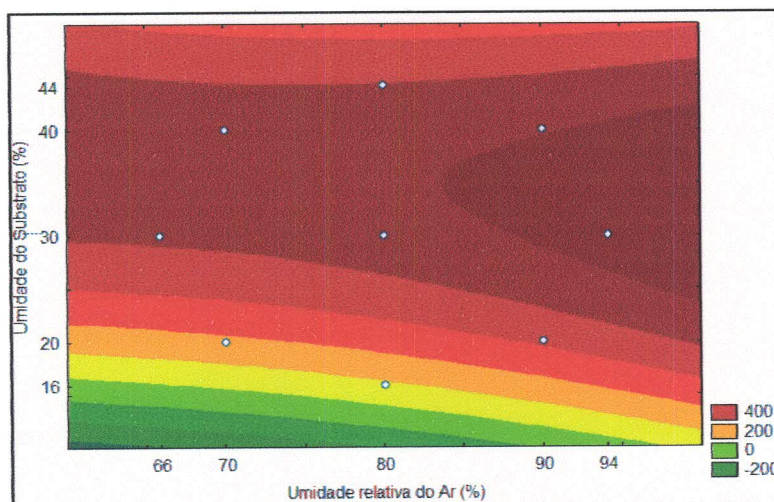


Figura II. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade do substrato e umidade relativa do ar

### CONCLUSÕES

A utilização do bioreator instrumentado proporcionou o acompanhamento do meio semi-sólido sobre condições controladas durante todo o processo. A vazão do ar não favoreceu para uma maior produção de protease e que a umidade do substrato mostrou maior significância estatística para a produção enzimática.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-ARGÜELLES, M.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. and FAVELA-TORRES, E. (1994) Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, vol. 16, n. 1, p. 23-28.
- 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.
- 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.
- WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A (1999). A Simplified Material and Energy Balance Approach for Process Development and Scale-Up of *Coniothyrium minitans* Conidia Production by Solid-State Cultivation in a Packed-Bed Reactor. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 65, p. 447-458.