

Otimização do processo de produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido FES¹

Rebeca de Andrade, TABOSA 1², Renata Cristina Ferreira, BONOMO 2³

RESUMO

Em tempos de melhoria da engenharia molecular e projeção de proteínas, o desenvolvimento de novos e biocompatíveis métodos de produção e extração, para a separação e purificação de enzimas e proteínas, vêm ganhando importância crescente. Neste contexto a Fermentação por Estado Sólido (FES) vem ganhando espaço na produção das mais variadas enzimas à um custo menor e tendo como base resíduos agroindustriais. Portanto, o presente projeto visa a otimização do processo de produção por Fermentação em Estado Sólido de uma enzima de interesse na Engenharia de Alimentos. Com o objetivo de produzir enzima de interesse para aplicação na indústria de alimentos por Fermentação em Estado Sólido, otimizando os parâmetros envolvidos nos processos visando maior quantidade produzida e maior atividade enzimática. Foi analisado pelo método de FES com o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, foi realizado o extrato enzimático usando casca de café e resíduo da macadâmia, as fermentações para a extração da enzima foram feitas com 24 horas, 48 horas e 96 horas respectivamente. A fermentação com 96 horas foi a que obteve quantidades significativas das análises de atividade enzimática, proteína e atividade específica.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*, Enzima, Proteína

Optimization of the enzyme production process by Solid State Fermentation FES

ABSTRACT

In times of improved molecular engineering and protein projection, the development of new and biocompatible production and extraction methods for the separation and purification of enzymes and proteins is gaining increasing importance. In this context,

¹ Entidade financiadora da pesquisa FAPESB/Iniciação Científica

² Graduanda em Engenharia de Alimentos, rtabosa06@gmail.com

³ Docente/pesquisador, bonomorcf@yahoo.com.br

Solid State Fermentation (FES) has been gaining ground in the production of the most varied enzymes at a lower cost and based on agro-industrial waste. Therefore, the present project aims to optimize the production process by Solid State Fermentation of an enzyme of interest in Food Engineering. With the aim of producing enzymes of interest for application in the food industry through Solid State Fermentation, optimizing the parameters involved in the processes aiming for a greater quantity produced and greater enzymatic activity. It was analyzed using the FES method with the filamentous fungus *Aspergillus niger*, the enzymatic extract was carried out using coffee husks and macadamia residue, the fermentations to extract the enzyme were carried out for 24 hours, 48 hours and 96 hours respectively. The 96-hour fermentation was the one that obtained significant amounts from the analyzes of enzymatic activity, protein and specific activity.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, Enzyme, Protein

INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (Rahardjo et al., 2006). Atualmente, aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos industriais são realizados por processos de fermentação submersa e, na maioria das vezes, com microrganismos geneticamente modificados (Castro & Pereira Júnior, 2010; Singhania et al., 2010). Contudo, a fermentação em estado sólido ainda é vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de microrganismos fúngicos selvagens (Hölker et al., 2004), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (Singhania et al., 2010). De acordo com (Shukla e Gupta) as lipases fúngicas são preferidas em comparação às bacterianas por atuarem em faixas mais amplas de processo, além de serem geralmente produzidas no meio extracelular. A maior utilização industrial dessas enzimas, entretanto, está condicionada à diminuição dos custos de produção. Estratégias para este fim incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização de meios de cultivo de baixo custo. Neste sentido, o uso da fermentação em estado sólido para a produção de lipases fúngicas é apropriado, já que utiliza resíduos agroindustriais na composição dos meios de cultivo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção atividade enzimática, proteína e atividade específica realizando o extrato enzimático por fermentação em estado sólido (FES) pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*, em diferentes concentrações de casca de café e resíduos da macadâmia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Metodologia para produzir enzima de interesse usando o fungo *aspergillus niger* com diferentes concentrações de casaca de café e resíduo da macadâmia.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, foi adicionada 30 mL de água destilada ao frasco e após uma breve agitação manual, foi submetido à agitação mecânica em um Shaker incubador a 25°C durante 30 min. Finalizado esse processo, foi usado um filtro (espremedor de batata) previamente esterilizado em que foram acondicionadas duas gazes estéreis de forma aberta e cruzada. No meio dessa cama formada pelas gazes, foi colocado o conteúdo do frasco e após juntar as bordas das gazes, realizou-se uma pressão que permitiu a extração do extrato líquido em um Becker previamente autoclavado e o extrato sólido foi descartado. O extrato líquido foi recolhido em tubo de Falcon 50 e foi submetido a dosagens enzimáticas extracelulares e de proteínas totais após centrifuga a 4000 RPM durante 15 min. Todo processo envolvendo manipulação de microrganismo foi realizado na cabine de fluxo ultravioleta.

Metodologia para atividade enzimática lipase – Método de emulsão em azeite. O procedimento foi realizado com o preparo da emulsão com 25 g de azeite de oliva e 75g de solução de goma arábica a 3% (m/m). Em Erlenmeyer de 125mL foi adicionado 5mL de substrato ,5mL de solução tampão fosfato de sódio e 1mL de solução enzimática adquirida na fermentação. Incubados os fracos a 37°C por 10 min em incubadora rotativa com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação paralisar a reação com 10mL de etanol. Os ácidos graxos liberados são titulados com solução de NaOH e como indicador foi usado a fenolftaleína.

Para quantificar o teor de proteínas no extrato bruto enzimático, utilizou-se metodologia proposta por Bradford (1976). Como padrão foi utilizada a albumina soro bovina (BSA). Em tubos de ensaio foi usado 100uL de extrato enzimático e 5 mL de Bradford, acondicionada a agitação. Por fim, foi feito a absorbância do sobrenadante medida a 595nm em espectrofotômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A melhor condição para atividade enzimática e melhor teor de proteína foi das amostras com a fermentação de 96 horas. Os resultados da proteína e atividade enzimática estão representados na Tabela 1. As seguintes amostras das soluções enzimáticas estão representadas como: Amostra 1 que compõe 5g de casca de café; Amostra 2: 4g de casca de café e 1g de resíduo de macadâmia e Amostra 3: 3g de casca de café e 2g de resíduo de macadâmia. Os resultados das análises de proteína foram satisfatórias confirmando que houve quantidade significativa de proteínas nos extratos enzimáticos, entretanto as análises de atividade enzimática para lipase nas fermentações com 24 horas e 48 horas obtiveram alguns resultados negativos, ou seja, mesmo as amostras com proteína elas não apresentaram atividade enzimática nas mesmas. Entretanto a fermentação com 96 horas foi a que obteve quantidades significativas em ambas as análises incluindo atividade específica.

Tabela 1. Resultados análises de atividade enzimática e proteína.

Amostras	Proteína	Atividade Enzimática	Atividade Específica
1	0,455	-0,175	-0,385
2	1,192	0,500	0,419
3	2,570	0,350	0,136
Fermentação 24h			
1	0,407	-0,100	-0,246
2	1,260	-0,850	-0,675
3	2,351	0,950	0,404
Fermentação 48h			
1	0,406	0,425	1,047
2	1,555	4,700	3,043
3	2,255	5,300	2,350
Fermentação 96h			

Fonte: Autor

CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

Com objetivo de realizar a fermentação em estufa sólida com diferentes concentrações de casca de café e resíduo da macadâmia em diferentes tempos para a fermentação das amostras foi possível constatar que as amostras com 96 horas de fermentação obtiveram melhores resultados para a atividade enzimática de lipase, proteína e atividade específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASTRO, A.M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, p.181-188, 2010.
2. Couto, S. R.; Sanromán, M. A.; *J. Food Eng.* 2006, 76, 291.
3. HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, p.175-186, 2004.
4. RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v.24, p.161-179, 2006.
5. SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, p.541-549, 2010.
6. Shukla, P.; Gupta, P.; *J. Appl. Sci. Environ. Sanitation* 2007, 2, 35.

AGRADECIMENTO

Obrigada pelo apoio financeiro, Fundação de amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).