



Otimização e caracterização de invertase produzida por fermentação em estado sólido a partir do farelo de cacau

Ícaro Bastos Silva¹, Iasnaia Maria de Carvalho ²

Resumo: A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica de cultivo de um microrganismo sobre um substrato sólido (resíduo), contendo umidade suficiente apenas para manter o crescimento e metabolismo do microrganismo. Em outras palavras, a FES é o crescimento de microrganismos em material sólido onde há inexistência ou quase inexistência de água (PANDEY et al., 2000). O fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* são os mais promissores na produção de biocompostos, uma vez que além de incrementar o teor protéico, este fungo pode excretar cerca de 20 tipos diferentes de enzimas (SILVEIRA et al., 2007) As fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 5g do resíduo de farelo de cacau. Seguindo o planejamento, foi aplicado um volume de água estéril variando a umidade dos resíduos (60%, 70% e 80%) em função dos diferentes tempos de fermentações (24h a 104h). A atividade enzimática invertase foi determinada através da quantificação de açúcares redutores presentes nos ensaios utilizando o método do DNS (ácido dinitrosalicílico). As melhores condições para fermentação foram de 29 °C a 67% de umidade por 34 horas, obtendo uma atividade média de 1,026 U/mL. Através dos resultados obtidos podemos concluir que a fermentação em estado sólido é uma alternativa para agregar valores a resíduos industriais. Esses tipos de fermentações permitem ser aplicados para produção de enzimas que são de alto valor industrial e que ainda podem ser utilizados como meio alternativo como obtenção de lucros.

Palavras Chaves: Fermentação em estado sólido, cacau, invertase

Title: optimization and characterization of invertase produced by solid-state fermentation from cocoa meal

Abstract: Solid state fermentation (SSF) is a technique of growing a microorganism on a solid substrate (waste), containing just enough moisture to maintain the growth and metabolism of the microorganism. In other words, FES is the growth of microorganisms in solid material where there is no or almost no water (PANDEY et al., 2000). The filamentous fungus of the genus *Aspergillus* is the most promising in the production of biocompounds, since in addition to increasing the protein content, this fungus can excrete about 20 different types of enzymes (SILVEIRA et al., 2007). Fermentations were carried out in an erlenmeyer flask of 250 mL containing 5g of cocoa bran residue. Following the planning, a volume of sterile water was applied, varying the humidity of the residues (60%, 70% and 80%) according to the different fermentation times (24h to 104h). The invertase enzymatic activity was determined through the quantification of reducing sugars present in the assays using the DNS method (dinitrosalicylic acid). /ml Through the results obtained, we can conclude that solid state fermentation is an alternative to add value to industrial waste. These types of fermentations can be applied to the production of enzymes that are of high industrial value and that can still be used as an alternative means of obtaining profits.

¹Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada Itapetinga/Itambé, s/n, Itapetinga-BA, 45700-000, icarobastos9@gmail.com

²Pós Doutorado, Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Estrada Itapetinga/Itambé, s/n, Itapetinga-BA, 45700-000, iasnaiamct@gmail.com



Keywords: Solid state fermentation, cocoa, invertase

Introdução: A geração de resíduos agroindustriais é um problema global enfrentado por todos os setores do sistema de produção em massa. Desde o início do século XX com o crescimento acelerado, tem sido estimulado o desenvolvimento de consciência social que equilibre a produção de produtos com a menor geração de resíduos possível. Estima-se que 931 milhões de toneladas de alimentos, ou 17 % do total de alimentos disponíveis aos consumidores em 2019, foram para o lixo das residências, varejo, restaurantes e outros serviços alimentares (FAO, 2021). A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica de cultivo de um microrganismo sobre um substrato sólido (resíduo), contendo umidade suficiente apenas para manter o crescimento e metabolismo do microrganismo. Em outras palavras, a FES é o crescimento de microrganismos em material sólido onde há inexistência ou quase inexistência de água (PANDEY et al., 2000). O fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* são os mais promissores na produção de biocompostos, uma vez que além de incrementar o teor protéico, este fungo pode excretar cerca de 20 tipos diferentes de enzimas (SILVEIRA et al., 2007). Os fungos do gênero *Aspergillus* são economicamente importantes, sendo utilizados em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácido cítrico, além de ser o micro-organismo mais usado na produção de enzimas (ROBINSON; NIGAM, 2003; MINAFRA et al., 2010). A invertase ou β -D-frutofuranosidase é uma das principais enzimas utilizada na indústria para hidrólise da sacarose. Esse produto enzimático de alto valor industrial pode ser obtido através do metabolismo secundário do *Aspergillus*. Tratando de processos industriais, essa enzima é utilizada para desenvolvimento de xaropes de açúcar invertido (também conhecido como xarope de glicose e frutose), este possui algumas particularidades importantes em relação ao xarope de sacarose, como maior vigor edulcorante (NOVAKI, 2009) O objetivo deste trabalho foi utilizar o resíduo farelo de cacau como substrato e matéria prima para a produção de invertase utilizando fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo *aspergillus nigger*. As variáveis utilizadas no estudo foram temperatura, tempo de fermentação e umidade de cultivo sobre a atividade cinética da invertase.

Materiais e métodos:

Microrganismo e condições de cultura: O micro-organismo utilizado na pesquisa foi o fungo filamentoso *Aspergillus Niger* pertencente ao LABIOCAT (Laboratório de Biotransformação e Biotatálise Orgânica), localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz. Foi incubado por cinco dias a 28 °C onde posteriormente foi estocado em em geladeira a 4 °C por até 30 dias.

Preparo do substrato: O farelo de cacau foi doado de agroindústrias localizadas na região sul da Bahia. O material foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho tipo wiley, até que atinja o tamanho de 2,0 mm de diâmetro.

Fermentação em estado sólido (FES) e solução de esporos: As fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 5g do resíduo de farelo de cacau. Seguindo o planejamento, foi aplicado um volume de água estéril variando a umidade dos resíduos (60%, 70% e 80%) em função dos diferentes tempos de fermentações (24h a 104h). Logo após, foi coletado solução de esporos para obtenção do extrato enzimático.

Extração enzimática: Os extratos enzimáticos foram obtidos com a adição de 25 mL de água destilada estéril em cada um dos ensaios fermentados, onde essa suspensão foi



agitada em um shaker. Logo após, refrigerado e armazenado a uma temperatura de 4 °C por até 30 dias.

Atividade enzimática da Invertase: A atividade enzimática invertase foi determinada através da quantificação de açúcares redutores presentes nos ensaios utilizando o método do DNS (ácido dinitrosalicílico). A atividade foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm dos extratos enzimáticos juntamente com a solução em branco

Resultados:

Através da tabela 1 pode-se relacionar respostas experimentais relacionando as variáveis temperatura, tempo e umidade obtendo as melhores condições de produção enzimática. Os resultados foram tabelados e as melhores condições de fermentação foram de 32 °C a 80% de umidade por 88 horas, obtendo-se uma atividade enzimática de 1,68 U/mL.

Tabela 1. Matriz experimental e respostas experimentais

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo(h)	Umidade(%)	Invertase (U/mL)
1	36 (1)	72 (0)	70 (0)	0.628
2	32 (0.5)	120 (0.866)	70 (0)	1.701
3	32 (0.5)	88 (0.289)	80 (0.817)	1.684
4	20 (-1)	72 (0)	70 (0)	0.095
5	24 (-0.5)	24 (-0.866)	70 (0)	0.083
6	24 (-0.5)	56 (-0.289)	60 (-0.817)	0.345
7	32 (0.5)	24 (-0.866)	70 (0)	0.464
8	32 (0.5)	56 (-0.289)	60 (-0.817)	0.232
9	24 (-0.5)	120 (0.866)	70 (0)	1.177
10	28 (0)	104 (0.577)	60 (-0.817)	0.107
11	24 (-0.5)	88 (0.289)	80 (0.817)	1.097
12	28 (0)	40 (-0.577)	80 (0.817)	0.515
13 ^a	28 (0)	72 (0)	70 (0)	0.715
14 ^a	28 (0)	72 (0)	70 (0)	0.810
15 ^a	28 (0)	72 (0)	70 (0)	0.751

^a Ponto central

A variação da atividade enzimática em função dos parâmetros encontrados na tabela 1 produzidos pelo *A. Nigger* pode ser pelo fato do microorganismo não ser afetado por baixos valores de atividade de água segundo PALÁCIOS-CABRERA et al. (2005). Ao contrário da maioria das enzimas, a invertase demonstra atividade significativamente alta em ampla faixa de pH, com seu pH ótimo aproximadamente em 4,5 atingindo valores de atividade máxima a 55°C (Kulshrestha et al. 2013).

Para se alcançar uma validação dos resultados obtidos foi realizado uma otimização dos dados. Com isto, na tabela 2 pode-se concluir que as melhores condições para fermentação foram de 29 °C a 67% de umidade por 34 horas, obtendo uma atividade média de 1,026 U/mL.



Tabela 2. Validação invertase cacau

Ensaio	Temperatura	Tempo	Umidade	Invertase U/mL
1	29	34	67	1,051
2	29	34	67	1,093
3	29	34	67	0,934
Média	29	34	67	1,026

Portanto, através do trabalho desenvolvido pode-se determinar a otimização e caracterização da enzima invertase, aplicando-a em resíduos industriais de cacau. O valor agregado para fins industriais pode e deve ser amplamente discutido como alternativa para tratamento e enriquecimento de resíduos.

Conclusão: Os resultados evidenciaram a importância em dar valor agregado a resíduos agroindustriais. Pode-se caracterizar e otimizar para máxima produção da invertase em 29 °C a 67% de umidade por 34 horas, obtendo uma atividade média de 1,026 U/mL, obtendo-se resultados satisfatórios.

Referências Bibliográficas:

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores agropecuaria**. 2015.

SANTOS, T.C.; GOMES, D.P.P.; FRANCO, M. **Enriquecimento Proteico dos Resíduos Sólidos do Processamento de Frutas**. Enciclopédia Biosfera, Goiania, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2010.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 24-28, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products**. *Process Biochemistry*. v. 35. p. 1153-1169. 2000.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. **Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residue by solid state fermentation**. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 197-203, 2003.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. **Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido**. *Ciências Tecnológicas de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 4, p.805-811, 2007.