



COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMA PROTEOLÍTICA

Jad Lorena Feitosa Simplicio ¹, Humberto Oliveira da Silva Pereira ²,
Yasmim Menezes do Nascimento ², Brenda Letícia de Sousa Pessoa ²,
Bianca Muniz de Sousa ², Adriana Crispim de Freitas ²

¹ Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, Maranhão, Brasil (jady.jlfs@gmail.com)

² Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, Maranhão, Brasil

Resumo: A fermentação semi-sólida e a submersa podem ser aplicadas na produção de enzimas. Objetivando produzir proteases microbianas, utilizando o fungo *Aspergillus oryzae*, formulou-se meios de fermentação semi-sólida, com mesocarpo e fibra da casca do babaçu, e submerso, com mesocarpo e sacarose. Para a fermentação semi-sólida apenas com mesocarpo houve maior produção de enzima proteolítica. Ambos os métodos fermentativos produziram enzimas com ampla aplicação industrial.

Palavras-chave: Fermentação semi-sólida; Fermentação Submersa; Protease.

INTRODUÇÃO

A fermentação semi-sólida é baseada no crescimento microbiano na superfície ou dentro de uma matriz sólida, desde que esta possua a capacidade de retenção ou absorção de líquidos. O nível de atividade de água neste meio deve garantir o crescimento e a atividade metabólica microbiana, mas não deve ultrapassar a capacidade máxima de ligação da água com o material sólido (PINTO *et al.*, 2006; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997). E oposto ao método de fermentação semissólida, tem-se a fermentação submersa, que é caracterizada pelo crescimento microbiano em meio líquido, que possui alto teor de água livre (MAGANHOTO, 2020).

O método de fermentação submersa torna mais fácil a mistura, aeração, o controle dos parâmetros de fermentação como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e concentração de moléculas solúveis em água, além de facilitar a separação da biomassa ao final do processo, enquanto a fermentação semissólida é mais vantajosa quando se analisa custo financeiro e produtividade (FARINAS, 2015; HOLKER *et al.*, 2004).

Os processos de fermentação supracitados são ferramentas importantes para a produção de enzimas de origem microbiana, ao passo que é cada vez maior o interesse da indústria por microrganismos

produtores de enzimas, pois estas possuem uma vasta aplicabilidade nos mais diversos ramos industriais (PEREIRA, 2014).

Entre as principais enzimas de interesse por parte da indústria estão as proteases, que possuem uma ampla aplicação nos mais diversos setores da indústria e representam expressiva no total de venda no mercado mundial de enzimas, sendo os microrganismos uma excelente fonte de enzimas proteolíticas. A fonte microbiana para produção de enzimas é considerada um processo mais rápido, de fácil obtenção e de baixo custo (KUMAR *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 1998).

Os processos fermentativos para produção de enzimas apresentam-se uma excelente forma de utilização de produtos e subprodutos agroindustriais. A literatura apresenta diversos trabalhos que utilizam resíduos e/ou subprodutos agroindustriais como substrato para fermentação semi-sólida e submersa (LADEIRA *et al.*, 2010; PEREIRA, 2014).

Portanto, este trabalho objetiva a produção de proteases de fonte microbiana utilizando a farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya speciosa*) como substrato e o agente de fermentação o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* CCBP 001.



MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no campus avançado da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de Imperatriz, Maranhão.

A linhagem do fungo filamentosos utilizados neste trabalho foi o *Aspergillus oryzae* CCBP 001 pertencente à coleção de trabalho da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará e cedida gentilmente à Universidade Federal do Maranhão.

Os principais equipamentos utilizados nesta pesquisa foram: Fluxo laminar com recirculação de ar, autoclave 75 litros, Incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) SOLAB SL - 117, Centrífuga refrigerada, Shaker orbital com refrigeração (Tecnal®, modelo TE-4200), balanças analíticas, espectrofotômetro UV/Visível com varredura.

Agente de Fermentação

O microrganismo utilizado nas fermentações foi o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CCBP 001, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical e gentilmente cedido à Universidade Federal do Maranhão.

Os esporos do fungo foram ativados em tubos de ensaios com meio ágar batata dextrose inclinado e incubados a 30°C por 7 dias em incubadora DBO (SOLAB, SL - 117), esse processo foi repetido transferindo esporos do ágar inclinado para um novo tubo com ágar batata dextrose inclinado e incubados a 30°C por 7 dias em incubadora DBO. Na terceira etapa de ativação os esporos do ágar inclinado foram inoculados em meio de farelo de trigo estéril em Erlenmeyer de 125 mL e incubados por 5 dias a 30 °C em incubadora DBO (marca SOLAB, SL - 117), para soltar os esporos das partículas de farelo de trigo utilizou-se solução Tween 0,3% (v/v). Posteriormente, a suspensão foi filtrada em gaze estéril e a solução resultante foi quantificada em câmara de Neubauer.

Meio de fermentação semi-sólida

O meio de fermentação foi formulado com os subprodutos mesocarpo e a fibra da casca do coco babaçu provenientes do processamento do coco babaçu. O mesocarpo foi obtido na Associação de Quebradeiras de Coco da cidade de Cidelândia, Maranhão, Brasil. E a fibra da casca foi cedida pela indústria Tobasa Bioindustrial de Babaçu localizada na cidade de Tocantinópolis, Tocantins, Brasil.

Os recipientes de fermentação foram Erlenmeyer de 500 mL esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, contendo 20 g do mesocarpo do coco babaçu (meio controle - MC) ou 20 g de mesocarpo do coco babaçu adicionado de 3 g de fibra de coco babaçu

tratada (meio mesocarpo com casca do coco babaçu - MMCC). A fibra tratada ficou imersa em água por 4 dias, sendo realizada sucessivas trocas de água neste período, e seca em estufa a 60 °C por 6 horas. O tempo de fermentação foi de 96 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas para determinação da atividade enzimática.

As amostras coletadas foram adicionadas água destilada, maceradas manual e filtradas a vácuo utilizando papel de filtro para separar o extrato enzimático bruto (adaptada de FREITAS, 2013).

Meio de fermentação Submersa

Para o preparo do meio fermentativo do meio controle, utilizou-se 20% de farinha de mesocarpo do babaçu e 5% de sacarose a pH 5,5 (MC).

O preparo do meio de fermentativo padrão adaptado da metodologia de DAL MASO (2019) foi formulado com 20 % de sacarose, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaNO₃, 0,05 % de MgSO₄ .7H₂O 0,25 % de KH₂PO₄, 0,05 % de NH₄Cl, 0,25 % de NaCl a pH 5,5.

A fermentação será conduzida em agitador orbital do tipo Shaker (Tecnal®, modelo TE- 4200) a 30 °C e 200 rpm com coleta de pontos a cada 24h, durante 96 h de processo. O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel e o caldo fermentado (sobrenadante) foi utilizado na determinação da atividade enzimática.

Determinação de protease

Para a determinação da atividade proteolítica foi utilizado o método de FREITAS et. al., (2015), onde o extrato enzimático foi diluído, 1 mL de amostras foi adicionada a 1 mL de solução de azocaseína 0,5% em tampão acetato 50 mM, pH 5,0, aos tubos e incubados em banho maria a 37 °C, por 40 min. A reação foi paralisada com ácido tricloroacético, centrifugada e o sobrenadante reagindo com KOH. A atividade enzimática determinada foi considerada uma unidade de atividade proteolítica (U) definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto, utilizando a Equação 1:

$$A = \frac{(((Média\ Abs - Branco\ enz) * Diluição)/UI)}{t} \quad (1)$$

Onde:

A → atividade proteolítica em (U/g);

Média Abs → média das absorbâncias;

Branco_{enz} → branco enzimático;

Diluição → diluição do extrato enzimático;



$U_I \rightarrow 0,01$ unidade de absorbância;

$t \rightarrow$ tempo de reação em minutos;

Como instrumentos de análise de dados, utilizamos o programa Excel 2016 e o software Origin Pro 2016 na construção dos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Figura 1, podemos observar a atividade proteolítica (U/g) *versus* tempo (h) de fermentação da enzima, produção da enzima pelo método em meio semissólido. O gráfico da linha de cor azul, mostra a atividade da enzima utilizando apenas o meio com mesocarpo, já o gráfico de cor verde, mostra a atividade utilizando o meio com mesocarpo mais as fibras do coco babaçu.

O maior valor de atividade da enzima foi obtido no meio formulado com mesocarpo, obtendo-se $2,78 \text{ U/g} \pm 0,0092$, comparado com o meio formulado com mesocarpo adicionado de fibra que apresentou uma atividade enzimática de $2,31 \text{ U/g} \pm 0,0028$ em 72 h de fermentação. O menor resultado de atividade proteolítica foi obtido nos dois meios formulados, onde, o meio formulado com mesocarpo produziu $1,0625 \text{ U/g} \pm 0,0014$, e no meio formulado com mesocarpo adicionado de fibra obteve-se $0,75 \text{ U/g} \pm 0,0028$ de atividade em 24 h de fermentação, em razão do fungo filamentososo está em processo de adaptação ao meio fermentativo.

De acordo com as pesquisas de Freitas (2013) para a produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP 001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida, também apresentou uma produção máxima de atividade proteolítica com aproximadamente 275 U/g em 72 h utilizando torta de canola como substrato.

Segundo de Castro et al., (2009) que analisou o efeito da quantidade inicial de água na síntese de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando o farelo de algodão como substrato, alcançou produtividade proteolítica de $290,9 \text{ U/g}$ em 48 h de fermentação. Valor superior ao determinado nesta pesquisa com mesocarpo do babaçu e fibra de coco babaçu.

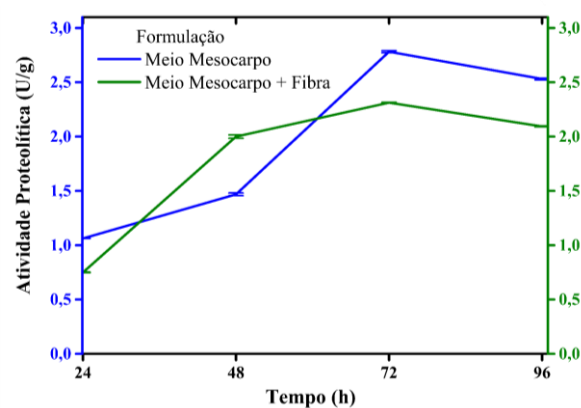


Figura 1. A atividade proteolítica em meio semi-sólidos com mesocarpo do babaçu e mesocarpo do babaçu mais fibra de coco babaçu.

Analisando a Figura 2, observamos a atividade proteolítica (U/g) em função do tempo de fermentação (h), produção de enzimas pelo método de fermentação submersa, obteve-se os maiores valores de atividade proteolítica ocorreu no início do processo fermentativo em meio formulado com sais e sacarose, apresentando uma produção de $5,38 \text{ U/g} \pm 0,0113$ em 24 h e $5,06 \text{ U/g} \pm 0,0028$ em 48h, a partir desse período houve um decréscimo na produção da enzima. Os menores resultados da enzima ocorreram em meio formulado com mesocarpo adicionados com sacarose em 48 h de fermentação, justificado pelo tempo de acúmulo da enzima no meio de fermentação ao longo do processo fermentativo.

Observa-se que nos pontos de 72 h e 96 h em meio formulado com sais e sacarose a enzima se manteve constante, pois em meios fermentativos submersos as enzimas são mais susceptíveis à inibição pelo substrato. Contudo, o meio formulado com sais e sacarose apresentou maior atividade proteolítica comparado ao meio formulado com mesocarpo e sacarose como substrato. Essa variação de atividade proteolítica entre os meios, indica que os teores de sacarose e sais na formulação do meio formulado com sais e sacarose rico em açúcares favoreceu a elevada atividade proteolítica.

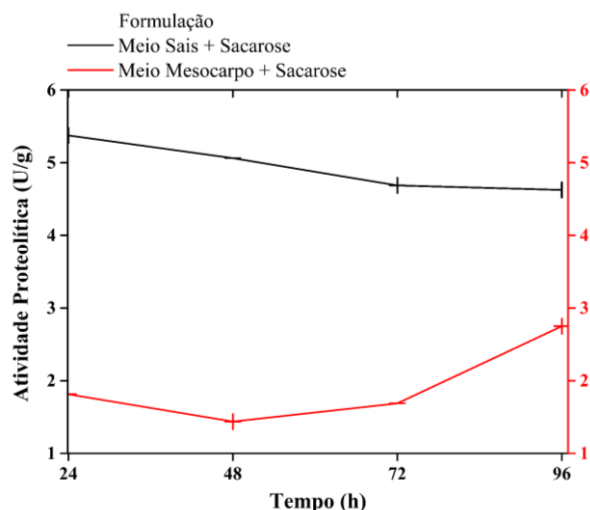


Figura 2. a atividade proteolítica em meios submersos com mesocarpo de babaçu e sacarose e meio adaptado (sais e sacarose)

Dessa forma, a atividade proteolítica foi maior utilizando o mesocarpo como substrato e comparada a produção da enzima pelo método de fermentação submersa com o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CCBP 001 podendo ser justificado pela biodisponibilidade de nitrogênio e demais moléculas necessárias na síntese proteica.

Porém, observamos a necessidade de realização de estudo de otimização da produção enzimática, podendo utilizar um planejamento experimental de mistura para escolha e formulação dos meios de fermentação.

CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados por processos fermentativos em estado semi-sólido e submerso apresentado neste trabalho, foi possível a obtenção de protease ácida do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CCBP 001, utilizando os subprodutos de baixo custo mesocarpo e fibra do coco babaçu.

Verificou-se que os meios de fermentação submersa e semi-sólido, apresentaram produção da enzima proteolítica. Visto que obteve -se maiores resultados de atividades proteolíticas em função do tempo de fermentação utilizando a fermentação semi-sólida com substrato mesocarpo e na fermentação submersa adaptando o meio do substrato. E com isso, se torna satisfatório a escolha dos substratos para o meio fermentativo em que a produção de protease resultará em maiores quantidades de atividade enzimática.

Dessa forma, otimizando o processo de fermentação em frasco Erlenmeyer e fazendo adaptações no meio do substrato, utilizando substratos ricos em proteínas e carboidratos podemos obter uma produção da

enzima proteolíticas em maior quantidade, que é de grande importância o estudo das produção e aplicações da enzima.

AGRADECIMENTOS

À Universidade federal do Maranhão pela disponibilidade de atividades e bolsa de iniciação científica e que auxiliaram na formação dos discentes desta pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA pelo financiamento de bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BELMESSIKH, A. *et al.* Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377-385, 2013.

DAL MASO, S.S.S. **Produção de Frutotransferase e β -Frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Cultivo Submerso**. Dissertação de Mestrado - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Engenharia de Alimentos, Erechim, 2019.

DE CASTRO, R. J. S.; DE FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. Efeito da quantidade inicial de água na síntese de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, n° 17, 2009, Natal. Anais. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

FARINAS, C. S. Development in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FREITAS, A. C. *et al.* Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production, **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 173-182, 2015.

FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* ccbp 001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida**. Tese de doutorado - Universidade Federal do Ceará, Engenharia Química, Fortaleza, 2013.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-



state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

KUMAR, S. *et al.* Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

MAGALHÃES, A. A. S. *et al.* 2019. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 14, n. 3, p. 453-461, 2019.

MAGANHOTO, N. H. **Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea***. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 75 p., 2020.

MATOS, A. T. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Fundação Estadual do Meio Ambiente. Ed. UFV, Viçosa, 2005.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

PINTO, G. A. S. *et al.* Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, p. 17-20, 2006.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, p. 5-22, 1997.