

PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA SOJA CONVENCIONAL BRUTA E SEU FARELO PELO FUNGO *Aspergillus clavatus*.

Ademir Teixeira Junior, Fabiano Bisinella Scheufele, Thiago Luiz Guerreiro, Leandro Daniel De Paris, Salah Din Mahmud Hasan (Orientador/UNIOESTE), e-mail: ademirteixeirajunior@gmail.com

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Toledo – PR.

Palavras-chave: enzima, fermentação em estado sólido, soja.

Resumo:

A região Oeste do Paraná destaca-se como uma das maiores produtoras nacionais de soja convencional. Devido a este potencial e as características da soja, que apresenta em sua constituição, diversos componentes bioquímicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, lecitina, dentre outros, presentes no grão, torna-se interessante sua utilização como substrato para a fermentação em estado sólido (FES), bem como o seu respectivo farelo desengordurado, subproduto abundante, de fácil obtenção e baixo custo, proveniente na indústria de extração do óleo. O processo de FES, apesar de não ser tão utilizado industrialmente quanto à fermentação submersa (Fsm), pode ser uma alternativa viável, pois tem apresentado resultados superiores de produtividade, principalmente no cultivo de fungos filamentosos e na produção de enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a produção das enzimas protease, amilase, celulase, lipase e invertase, utilizando a soja convencional e seu farelo desengordurado como substrato, por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *A. clavatus*. Foram construídas curvas de crescimento do fungo, onde pode-se observar os melhores resultados para a protease, amilase e invertase, com a soja convencional bruta como substrato, diâmetro de partícula de 0,6 mm, concentração inicial de inóculo de $4 \cdot 10^6$ esporos/gms, umidade do meio fermentativo de 50%, pH inicial do meio 6,0 e temperatura de incubação de 30°C.

Introdução

A produção de soja é uma das principais culturas do Brasil, sendo o carro chefe da produção agrícola nacional. A região Oeste do Paraná se destaca como uma das líderes na produção do grão. A soja convencional é produzida pela maneira tradicional, bastante difundida em todo o mundo, com a utilização de técnicas adequadas ao plantio e adubos químicos e defensivos agrícolas. É uma matéria-prima de custo acessível e que apresenta em sua composição importantes elementos bioquímicos

(proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, isoflavonóides, dentre outros) que constituem excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos utilizados em processos como o da fermentação em estado sólido (FES). Seu valor calórico é alto, com a vantagem deste não resultar de uma grande quantidade de amido; entretanto, é deficiente em vitaminas, e suas fibras estão contidas quase totalmente na casca. As frações de proteína e óleo da soja compreendem aproximadamente 60% do total do peso seco da semente. Os grãos maduros contêm cerca de 40,7% de proteína, 22,7% de óleo, 10,9% de açúcares totais, 6,7% de fibra e cerca de 5,8% de cinzas e 30,8% de carboidratos, em base seca (Costa *et al.*, 1974, citados por VIEIRA *et al.*, 1999) Apresenta também em sua constituição, diversos tipos de enzimas que influenciam a germinação da semente e seu crescimento. Algumas destas enzimas são as lipoxigenases, hidroperóxido liase, peroxigenase, hidroperóxido redutase, amilase, protease, tripsina, etc. (SILVA, 2004).

O farelo de soja, resíduo proveniente da indústria de extração de óleo, também apresenta grande potencial de comercialização, principalmente na composição alimentar de animais (ração), com baixo custo e considerável valor agregado. O Paraná é um dos principais responsáveis pela produção nacional de soja e um importante fornecedor de farelo para a alimentação animal, destacando-se as regiões Oeste e Sudoeste do Estado (RIEGER *et al.*, 2008). A indústria da soja pode produzir três tipos de farelo de soja com base no teor de proteína bruta. O farelo de soja com 44% de proteína bruta é obtido pela adição de casca de soja, proveniente da fabricação do farelo de soja com 48% proteína bruta, que é descascada antes da extração do óleo. Também existe o farelo de soja com 46% proteína bruta, no qual a quantidade de casca já se encontra no grão (Ministério da Agricultura, 1988, citado por Gerber *et al.*, 2006). Assim, pode-se considerar que o farelo de soja apresenta características favoráveis, relacionadas à composição, que viabilizam a produção de enzimas por FES.

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ele está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Del Bianchi *et al.*, 2001, citados por Lima *et al.*, 2001). Entre as vantagens da FES, podem ser citadas algumas: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais, simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma. Por outro lado, o processo também oferece algumas desvantagens, as quais são: uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldade para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, escassez de dados e de projeto

para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, dentre outras (PANDEY, 1991).

Segundo Gupta *et al.*, 2003, atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem substituído quase completamente a hidrólise química do amido, e com grande aplicação industrial, como na produção de detergentes e produtos de limpeza, panificação, bebidas, na indústria de papel e celulose e na alimentação animal.

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto (WHITAKER, 1994). Scheuer, (1990) e Iksari, (1996) citam que a protease constitui um dos grupos mais importantes comercialmente de enzimas microbianas extracelulares, sendo amplamente usada em diversos setores industriais, particularmente na indústria alimentícia, farmacêutica, de detergentes, produtos químicos, couro e seda, além da panificação, laticínios, destilação, cervejas, processamento industrial de proteínas, sínteses orgânicas, dentre outras.

As celulasas são usadas em vários processos na indústria alimentícia, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas, capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER & TAUK-TORNISIELO, 2004).

A lipase é uma enzima extremamente versátil, sendo amplamente utilizada em aplicações industriais, como na fabricação de derivados do leite e alimentos, indústria de couro e detergentes, produção de cosméticos e produtos farmacêuticos e reações de síntese orgânica, especialmente em meio não aquoso. As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura (WOOLEY & PETERSON, 1994).

A invertase (β -D-frutofuranosidase) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais, de glicose e frutose. Segundo Shaheen, Bhatti & Ashraf (2008), a invertase é uma das mais importantes enzimas comerciais usada na indústria de alimentos, sendo uma das primeiras proteínas identificada como biocatalisador. A mistura hidrolisada de açúcares obtidos pela invertase apresenta a vantagem de ser incolor, em contraste com o produto obtido por hidrólise ácida. Invertase proveniente de diferentes fontes é utilizada para a síntese de xarope de frutose, com diversas aplicações industriais, como a alimentação de abelhas, biscoitos, produção de ácidos orgânicos, chocolate e produção de álcool. Porém, sua grande aplicação é na fabricação do açúcar invertido, que tem grande importância industrial por possuir poder adoçante superior ao da sacarose.

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção das enzimas protease, amilase, celulase, lipase e invertase, por FES, utilizando a soja convencional e seu farelo desengordurado como substrato e o fungo *A. clavatus*, por meio da construção das curvas de crescimento do fungo.

Materiais e Métodos

Material

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *A. clavatus*, cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel. Os substratos utilizados foram a soja convencional bruta e seu respectivo farelo desengordurado, doados à UNIOESTE-Toledo pelas empresas COODETEC e SADIA.

Preparo do inóculo e substratos

Utilizou-se o meio de cultura PDA (potato dextrose ágar) para o crescimento do microrganismo, que foi inoculado e mantido por 7 dias em estufa bacteriológica, a 30°C. Realizou-se a raspagem dos esporos e a solução foi filtrada em funil de vidro com algodão para retirada de micélio vegetativo. Em seguida, determinou-se o número e esporos em suspensão na solução, utilizando microscópio óptico com aumento de 400x e Câmara de Neubauer. A soja (grão) e o farelo (pelets) foram fragmentadas e classificadas em diferentes tamanhos de partícula usando peneiras Tyler de 12, 16, 28 e 48 MESH, que correspondem a 1,4; 1,0; 0,6 e 0,3 mm, respectivamente. Após, determinou-se o teor umidade dos substratos.

Fermentação em estado sólido (FES)

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados os substratos e, em seguida, esterilizados. Após, foram adicionadas a solução de esporos, a solução-tampão e os nutrientes, de acordo com as quantidades especificadas em cada experimento. Os frascos foram acondicionados em estufa bacteriológica, sendo o tempo de fermentação estimado de acordo com cada experimento, a 30°C. Todas as soluções-tampão utilizadas no estudo foram preparados conforme Deutscher *et al.* (1990). As quantidades de nutrientes utilizados para o preparo das soluções foram baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para um volume final de líquido (solução-tampão) de 500 mL.

Extração das enzimas

Para a análise do sólido fermentado, foi feita a extração dos seus componentes, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão), à 35°C e 130 rpm,

durante 2h em incubadora tipo *shaker*. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 2500 rpm, para remoção dos sólidos suspensos.

Métodos analíticos

A determinação da concentração de gorduras no material sólido foi baseado no método citado por Silva & Queiroz (2002). O teor umidade foi determinado por método gravimétrico (A.O.A.C., 1995). O método de determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) usado neste trabalho foi adaptado do método proposto por Miller (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Para determinação das proteínas presentes nas amostras sólidas utilizou-se o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984). Para a determinação da atividade enzimática da lipase a metodologia utilizada foi adaptada de Freire *et al.*, (1997), citados por GOMBERT *et al.*, (1999). Para a análise da atividade enzimática da celulase utilizou-se a metodologia adaptada de Mandels *et al.* (1976). A determinação da atividade enzimática da amilase foi realizada segundo a metodologia descrita por Hasan (2002). A determinação da atividade enzimática da protease foi realizada segundo adaptação do método descrito por Germano *et al.*, (2003). A análise da invertase foi realizada de acordo com o método do reagente DNS, descrito por Miller (1959).

Resultados e Discussão

Para a realização deste estudo por meio de FES, foi utilizado o fungo *A clavatus* e, como substratos, a soja convencional bruta devidamente fracionada e seu respectivo farelo desengordurado, onde foram avaliadas as curvas de crescimento para o microrganismo.

Os parâmetros utilizados para a realização da FES, foram: diâmetro de partícula dos substratos (0,6 mm), concentração inicial de inóculo ($4 \cdot 10^6$ esporos/gms), umidade do meio fermentativo (50%). O pH do meio (6,0) e temperatura de incubação (30°C) foram determinados de acordo com as características de desenvolvimento do microrganismo.

Para as curvas de crescimento, espera-se que o substrato seja consumido pelo microrganismo ao longo do processo, para que haja produção de metabólitos. Isto fica evidenciado pelo gráfico da figura 1, que apresenta os perfis de ART ao longo da fermentação com a soja bruta e separadamente, com o farelo da mesma soja.

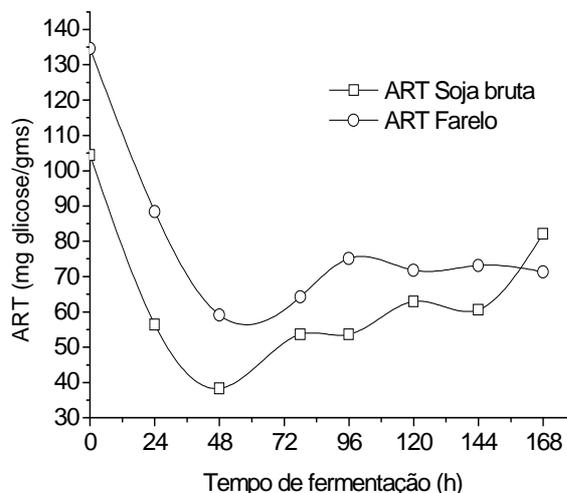


Figura 1 - Perfis de ART para a soja convencional bruta e seu farelo

Os perfis de proteína são apresentados na figura 2, onde nota-se um maior conteúdo para o farelo de soja em relação à soja bruta, porém com perfis variáveis para ambos os substratos. Pressupõe-se uma ocasional discrepância nas rotas metabólicas tomadas pelo fungo, em função de características particulares de cada substrato. Não se observa um perfil característico de crescimento do fungo, relacionado ao teor de proteína. Isto pode ser explicado pela produção crescente de protease (figura 3, (a) e (b)), a qual pode estar degradando as formas protéicas produzidas.

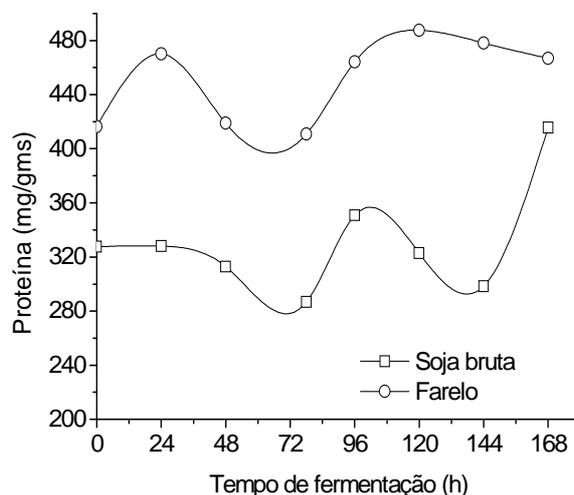


Figura 2 - Perfis de proteína para a soja convencional bruta e seu farelo

Nos perfis de AE (figura 3 (a)) e AE_{esp} (figura 3 (b)) da protease, nota-se que a atividade enzimática aumentou com o tempo de fermentação, atingindo o maior valor para 168h de fermentação, tanto para soja bruta quanto para o farelo. Entretanto, para a atividade específica da protease, a soja bruta apresenta valor mais alto em comparação ao farelo de soja. A maior produção se encontra no tempo de fermentação de 144h.

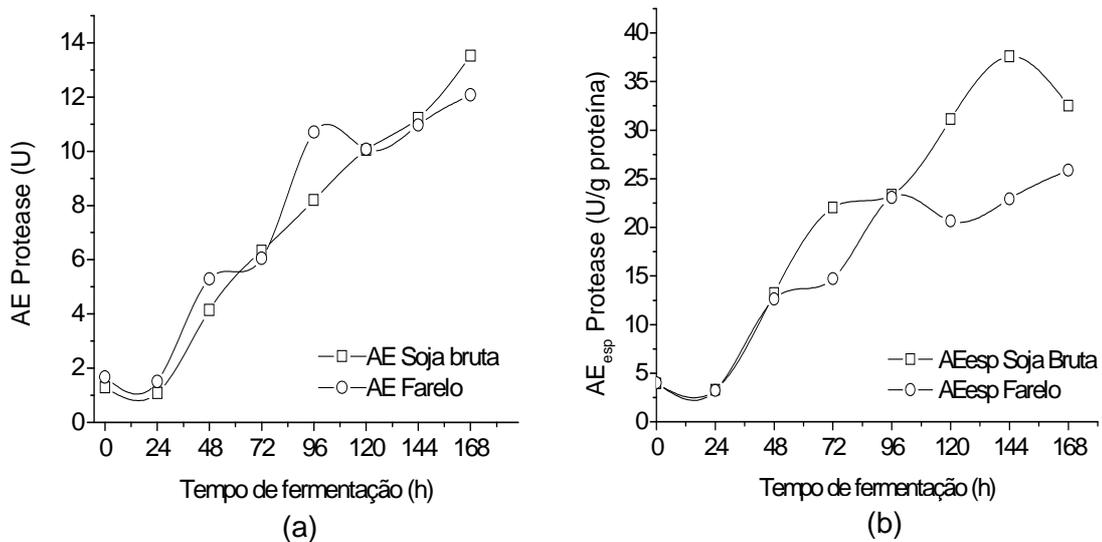


Figura 3 - Perfis de AE (a) e AE_{esp} (b) da protease para a soja convencional bruta e seu farelo

Na figura 4 são apresentadas as curvas para a variação temporal de AE e AE_{esp} da lipase. Para a atividade enzimática, pode-se observar um maior valor para a soja bruta em um tempo de fermentação de 96h. Após, os valores decrescem. O farelo de soja apresenta um pico de produção da lipase em 48h, ocorrendo uma oscilação posteriormente.

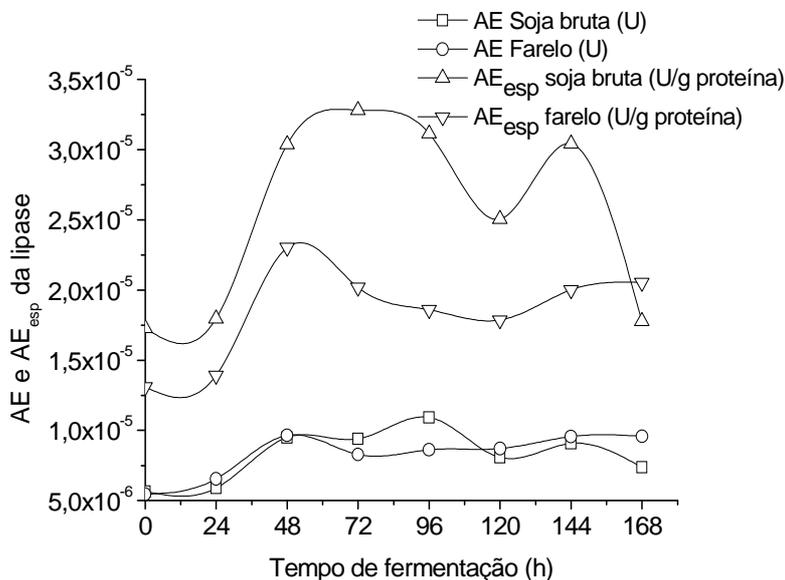


Figura 4 - Perfis de AE e AE_{esp} da lipase para a soja convencional bruta e seu farelo

As atividades enzimáticas específicas apresentaram valores mais elevados, comparados às AE, entretanto, alcançando valores pouco expressivos, em ambos os casos. Isto caracteriza o processo como não sendo o ideal para produção desta enzima, visto que suas atividades mantiveram-se baixas em ambos os substratos.

Os gráficos da figura 5 (a e b) apresentam os perfis de AE e AE_{esp} para a amilase, onde nota-se que a AE apresentou picos para a soja bruta nos tempos de 72 e 144h, após, a atividade enzimática decresce. Para a atividade enzimática específica da amilase, os maiores valores encontrados estão nos tempos de fermentação de 72 e 144h para a soja bruta. O farelo apresentou resultados inferiores. O resultado obtido indica que o processo de FES utilizando soja convencional como substrato e o fungo *A. clavatus* pode ser viável para a produção da enzima.

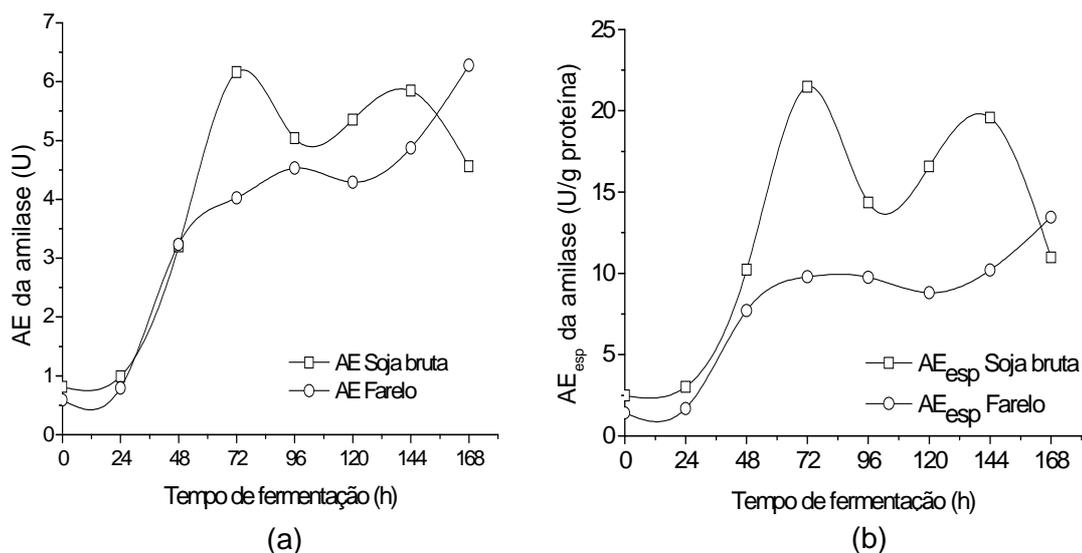


Figura 5 - Perfis de AE (a) e AE_{esp} (b) da amilase para a soja convencional bruta e seu farelo

Nos perfis de AE e AE_{esp} da celulase (figura 6 (a) e (b)) observa-se que há uma produção exponencial da celulase até 24h, seguida de variação nos valores de atividade, fato que poderia ser atribuído à existência de protease, visto que o fungo também produz esta enzima, uma vez que a soja apresenta elevado teor de proteína. Neste caso, a celulase, sendo uma proteína, pode ser eventualmente desnaturada pela protease, o que causaria uma alteração de sua concentração no meio. Também fica evidente que o melhor ponto de atividade tanto para a soja bruta quanto para o farelo é o tempo de 144h. Pressupõe-se que os valores superiores de AE para o farelo podem evidenciar maior quantidade de material celulósico presente, não degradado pelo processo de extração do óleo.

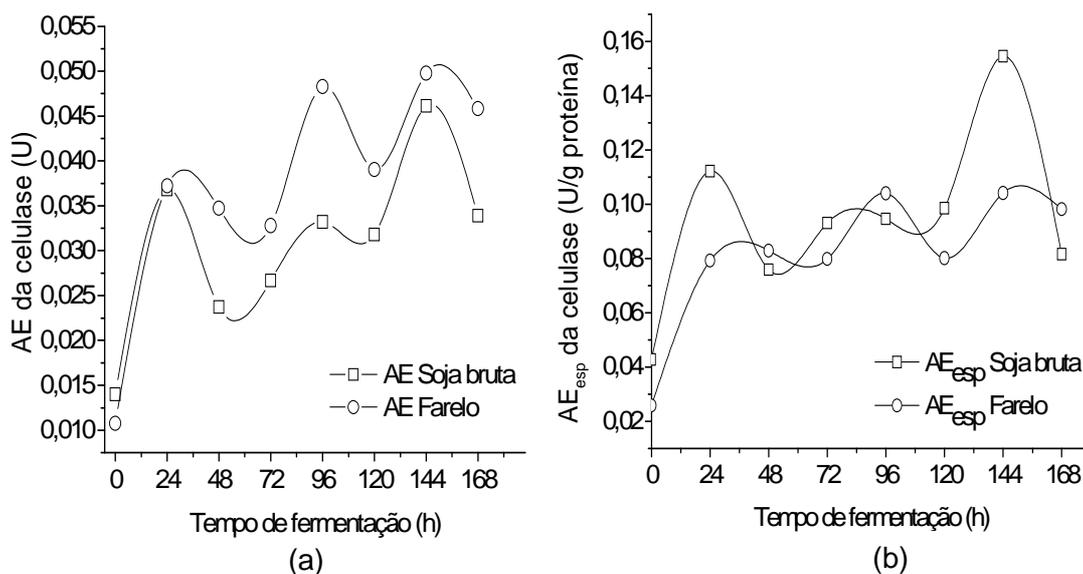


Figura 6 - Perfis de AE (a) e AE_{esp} (b) da celulase para a soja convencional bruta e seu farelo

No caso da invertase, observam-se perfis de crescimento semelhantes para os dois substratos (figura 7). Os maiores valores de AE estão entre 72 e 96h de cultivo (aproximadamente 7 U/mL). Este valor se apresenta quase constante até o fim do período fermentativo. Para a AE_{esp}, o maior valor é observado para a soja bruta com 72h de fermentação (aproximadamente 24 U/mL.g proteína), o que indica que houve produção da enzima. Os valores de AE e AE_{esp} encontrados mostram que os parâmetros da FES aplicadas neste estudo, juntamente com o uso da soja e do fungo *A. clavatus* favorecem a produção da enzima.

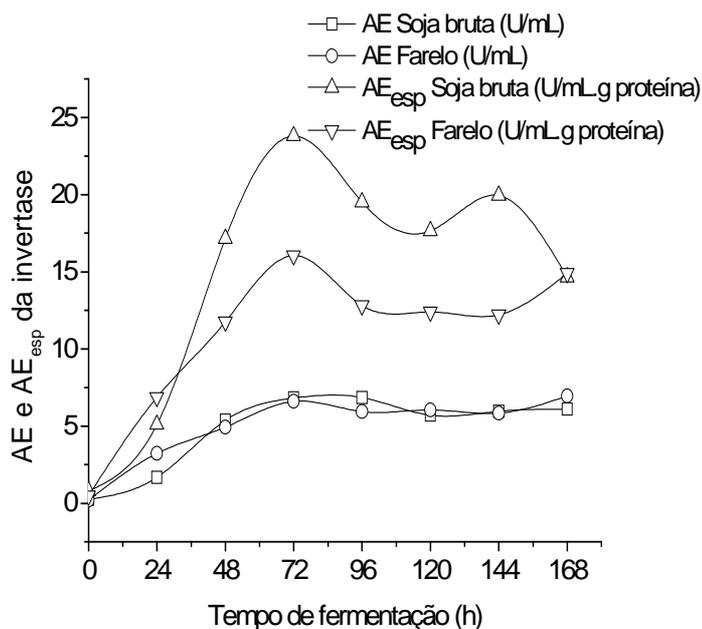


Figura 7 - Perfis de AE e AE_{esp} da invertase para a soja convencional bruta e seu farelo

Conclusão

No estudo conduzido por meio de FES, para construção das curvas de crescimento do fungo *A. clavatus*, observou-se que a protease obtida a partir da soja convencional bruta e dos parâmetros operacionais utilizados nos experimentos apresentou uma atividade específica de 37,6 U/g de proteína. Este fungo também apresentou bons níveis de atividade de amilase e invertase, caracterizando assim a FES com soja convencional como um processo interessante para a obtenção destas enzimas. Já a lipase e celulase apresentaram valores de atividade baixos. Desta forma, pode-se dizer que a soja convencional e seu farelo, utilizados como substratos, não apresentam características constitucionais favoráveis a produção destas enzimas.

Agradecimentos

A Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

Referências

- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. *Official methods of analysis*. 12^a ed., Washington D.C., 1984.
- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. *Official methods of analysis*. 16^a ed., Washington D.C., 1995.
- Deutscher, M.P.; Simon, M.I.; Abelson, J.N. Guide to protein purification In *Buffers: Principles and Practice*, Stoll, V.S.; Blanchard, Ed.: Academic Press, Inc.San Diego, 1990; 24-38.
- Gerber, L.F.P.; Penz Júnior, A.M.P.; Ribeiro, A.M.L. Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte. *Rev. Bras. Zoot.* 2006, 35, 4, 1359-1365.
- Germano, S.; Pandey, A.; Osaku, C.A.; Rocha, S.N.; Soccol, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microb. Technol.* 2003, 32,246-251.
- Gombert, A.; Pinto, A.L.; Castilho, L.R.; Freire, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Proc. Biochem.* 1999, 35,85–90.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Proc. Biochem.* 2003, 38, 1599-1616.
- Hasan, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- Ikasari, L.; Mitchell, D.A. Leaching and characyerization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microb. Technol.* 1996, 19, 171-175.

- Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotechnologia industrial-vol.3. São Paulo*: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 1976, 6, 21-34,.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 1959, 31, 3, 426-428.
- Pandey, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. *Proc. Biochem.* 1991, 26, 335-361.
- Rieger, C.; Oliveira, V.; Lovatto, P.A.; Araújo, J.S.; Peixoto, E.C.T.M.; Silva, M.A. Características químicas e valores energéticos de farelos de soja do oeste e sudoeste do Paraná. *Ciência Rural*, 2008, 38, 1, 266-269.
- Ruegger, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev. Brasil. Bot.* 2004, 27, 2, 205-211.
- Scheuer, P.J. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential. *Science*, 1990, 248, 173-177.
- Shaheen, I.; Bhatti, H.N.; Ashraf, T. Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. *Intern. J. Food Sci. Technol.* 2008, 43, 1152–1158.
- Silva, L.B.C. Identificação de lipoxigenases em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de diferentes linhagens. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. *Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos*. Viçosa: Editora UFV, 2002.
- Vieira, C.R.; Cabral, L.C.; Paula, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. *Pesq. Agrop. Bras.* 1999, 34, 1277-1283.
- Whitaker, J.R. *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker, 1994.
- Wooley, P., Peterson, S.B. *Lipases their structure production. Biochemistry and application*. New York: Cambridge University Press, 1994.