

Área: Ciência de Alimentos

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER*

Éllen Francine Rodrigues*, Greice Borges Nunes, Christian Oliveira Reinehr, Telma Elita Bertolin, Luciane Maria Colla

Laboratório de Fermentações, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

**E-mail: ellen_fr@hotmail.com*

RESUMO – As amilases são utilizadas em diversos processos industriais e possuem um grande potencial biotecnológico. Os processos fermentativos se apresentam como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a utilização de subprodutos agroindustriais gerados, bem como, agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas. Objetivou-se a produção de enzimas amilolíticas via processos fermentativos e a purificação das mesmas através da filtração por membranas. A produção da enzima foi realizada via fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando como substrato o farelo de trigo, em condições previamente estudadas e os extratos enzimáticos obtidos dos processos fermentativos foram purificados através de microfiltração. A partir dos resultados obtidos observou-se que ocorreu a produção de enzimas nos dois processos fermentativos utilizados. As maiores atividades específicas foram obtidas para o permeado ($581,08 \pm 13,23$ U/mg_{proteína}) e o retido ($297,34 \pm 3,81$ U/mg_{proteína}) da fermentação submersa. Pode-se concluir que ocorreu a produção de enzimas via processos fermentativos propostos, e as mesmas foram purificadas obtendo valores de atividades específicas na fermentação submersa superiores aos obtidos na fermentação em estado sólido, definindo o processo submerso para a produção de enzimas amilases.

Palavras-chave: Amilase, fermentação em estado sólido, fermentação submersa, microfiltração.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e industriais é ampla e diversificada, envolvendo diversas áreas. Um problema típico de qualquer indústria de transformação seja ela de alimentos, química, ou farmacêutica está na recuperação e purificação dos produtos envolvidos. Neste contexto, processos que permitam a recuperação e purificação de enzimas de forma eficiente e com baixos custos são extremamente desejáveis e representam uma área de pesquisa de grande interesse (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, devido à sua aplicabilidade em diferentes setores industriais, nos quais se destacam indústrias de alimentos e bebidas, têxteis, papeleiras e

farmacêuticas (SOARES et al., 2010, SANTOS et al., 2013). As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos. Entretanto, pela maior facilidade e menor tempo de produção, as microbianas têm a preferência do mercado de enzimas (CELESTINO et al., 2014).

Dois diferentes processos fermentativos podem ser empregados para obtenção de enzimas microbianas: a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). A diferença destes dois processos é que na FES utiliza-se um suporte sólido para o crescimento microbiano. A FS consiste na solubilização dos nutrientes para a fermentação em meio líquido. A aplicação de resíduos agroindustriais não apenas representa um substrato alternativo para os processos fermentativos, mas também ajuda a reduzir custos de fabricação de produtos, com elevado valor agregado, e a resolver problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos.

Desta forma, para obtenção de enzimas com alta eficiência catalítica e com baixo custo, é essencial o desenvolvimento de técnicas de purificação das enzimas produzidas pelos processos fermentativos. Uma das técnicas pode ser a filtração por membranas, a fim de se obter frações com maior grau de pureza que objetivem o aumento da eficiência do processo de aplicação.

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas amilolíticas via processos fermentativos a partir de resíduo agroindustrial utilizando *Aspergillus niger* e a purificação das mesmas por filtração por membranas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A produção de enzimas amilolíticas foi realizada através da fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando como substrato o farelo de trigo e o microrganismo *Aspergillus niger*.

2.1 Produção de enzimas via fermentação em estado sólido (FES)

O preparo do inóculo do *Aspergillus niger* foi realizado através da inoculação do microrganismo em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de meio PDA (Potato Dextrose Agar) solidificado, incubados a 30 °C por 7 d.

O substrato foi esterilizado e a umidade ajustada a 60% com solução de nutrientes composta por: 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL.L⁻¹ de solução traço, a qual será composta por 0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L, inoculado com 4.10⁶ esporos/g_{meio}. A fermentação foi conduzida em estufa a 30 °C durante 8 dias.

A extração das enzimas foi realizada a partir de 1g de farelo fermentado adicionado de 17 mL de solução tampão fosfato pH 7,0, seguido para banho termostatizado por 30 min. a 37 °C e 100 rpm, após realizou-se a filtração em algodão e centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos para remoção dos sólidos particulados, para posterior realização das atividades enzimáticas e purificação através de microfiltração. O extrato obtido foi denominado como extrato bruto.

2.2 Produção de enzimas via fermentação submersa (FS)

O preparo do inóculo do *Aspergillus niger* foi realizado através da inoculação do microorganismo em placas de Petri contendo 30 mL de meio PDA (Potato Dextrose Agar) solidificado, incubados a 30 °C por 7 d.

O meio de cultivo foi preparado a partir da cocção de 10 % de farelo de trigo em 500 mL de água destilada, a 100 °C, durante 30 min. Após a cocção, foi realizada a filtração do meio em filtro de tecido para remoção de sólidos. Ao meio filtrado adicionou-se 10 % de solução de nutrientes composta por: 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL.L⁻¹ de solução traço, a qual será composta por 0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L. O meio de cultivo foi avolumado para 1 L com água destilada e esterilizado.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL contendo 100 mL de meio sendo inoculados com uma área circular de 2 cm de diâmetro do PDA contendo esporos fúngicos, de forma que a concentração inicial de inóculo nos meios de fermentação fosse de 2.10⁶ esporos/g_{meio}. Posteriormente, os experimentos foram incubados por 8 d a 30 °C em agitador orbital a 120 rpm.

A obtenção das enzimas foi a partir da filtração do meio fermentado em algodão e centrifugação a 2500 rpm por 20 min, para posterior realização das atividades enzimáticas e purificação através de microfiltração. O extrato obtido foi denominado como extrato bruto.

2.3 Purificação das enzimas através de microfiltração por membranas

Os extratos enzimáticos brutos foram submetidos à microfiltração para a retirada de partículas maiores que 1µm, como esporos, partículas de suspensão e compostos de baixo peso molecular provenientes da fermentação.

O sistema é constituído de um módulo acrílico, uma bomba peristáltica, uma válvula esfera para controle da pressão, um tê com manômetro e mangueiras conectoras. A operação do sistema foi de 250 KPa.

Os parâmetros do processo foram monitorados e controlados da seguinte forma:

- Vazão de alimentação: A variação da vazão foi realizada pelo ajuste da potência da bomba peristáltica;
- Pressão: Verificou-se através do manômetro localizado na linha de retido. O controle desse parâmetro foi realizado por uma válvula esfera.

Após cada processo de filtração realizou-se as análises de proteína e atividade amilolítica. Os extratos obtidos foram denominados como retido e permeado.

2.4. Determinações de atividade amilolítica e proteína

A atividade amilolítica foi determinada utilizando amido como substrato, denominado de método sacarificante, que se baseia na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959).

Realizou-se a quantificação de proteínas nos extratos brutos, permeado e retido. A determinação foi realizada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de enzimas via fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS)

A Tabela 1 apresenta os resultados das atividades amilolíticas dos extratos brutos obtidos para os processos fermentativos.

Tabela 1 – Atividades enzimáticas obtidos para os extratos da FES e FS

Exp.	AA* (T ₀)	AA* (T ₈)
FES	0,04±0,02	1,29±0,07
FS	0,38±0,04	1,23±0,02

FES: Atividades amilolíticas após a extração das enzimas (U/ml) *AA: Atividade Amilolítica (U/ml); Resultados FES: 1,15±0,69 (T₀); 37,53±2,02 (T₈) U/g_{farelofermentado}; Resultados de média±desviopadrão.

O aumento dos valores de atividade enzimática quando comparados aos extratos brutos obtidos na fermentação em estado sólido e fermentação submersa foram semelhantes (Tabela 5), porém as atividades amilolíticas encontradas em 8 d para a fermentação em estado sólida foi de 37,53±2,02 U/g_{farelofermentado} quando expressa em grama de farelo fermentado. O aumento das atividades em relação ao tempo pode ser explicado devido à baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima no início da fermentação. Conforme Prado (2002), algumas cepas de *Aspergillus niger* produzem enzimas que são capazes de hidrolisar o amido liberando glicose, e também relatam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer à indução da produção de amilases por fungos. Os microrganismos não assimilam diretamente moléculas complexas como é o caso do amido, um polissacarídeo. Não havendo outro componente assimilável no meio, o microrganismo passa a sintetizar enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples - neste caso as amilases - para que estas convertam o amido em açúcares assimiláveis garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

4.2 Purificação das enzimas produzidas via fermentação em estado sólido e fermentação submersa

A Tabela 2 apresenta os resultados de atividades enzimáticas obtidos para os extratos brutos e purificados através do processo de microfiltração por membranas.

Tabela 2 – Resultados de atividades amilolíticas para os extratos brutos e da microfiltração obtidos via FES e FS

	FES			FS		
	AA*	Proteína (mg/ml)*	AE*	AA*	Proteína (mg/ml)*	AE*
Extrato Bruto	1,29±0,07	0,032±0,002	40,57±2,18	1,23±0,02	0,016±0,001	77,24±1,46
Permeado	0,63±0,06	0,020±0,000	31,51±3,01	3,42±0,07	0,005±0,001	581,08±13,23
Retido	2,52±0,01	0,037±0,003	66,65±0,36	4,26±0,05	0,014±0,001	297,34±3,81

AA: Atividade amilolítica (U/ml_{amostra}); AE: Atividade específica (U/mg_{proteína}). *Resultados de média±desvio padrão.

Os resultados obtidos para o extrato retido foi elevado quando comparado aos resultados de atividade enzimática do extrato bruto. Uma fração elevada das enzimas produzidas ficaram retidas na membrana de microfiltração, ocorrendo um aumento em torno de 93 % nas atividades, o que indica que no permeado foram eliminados compostos de baixo peso molecular que tinha incidência negativa na atividade da enzima, atuando como inibidores. O extrato retido também foi o que apresentou a maior atividade específica ($66,65 \pm 0,36$ U/mg_{proteína}), quando comparado a todos os experimentos, isso se dá pela quantidade de proteína presente no extrato, pois a atividade específica foi calculada dividindo as unidades de atividade encontradas por mL de meio pela quantidade em g de proteínas por mL de meio (U/mg_{proteína}).

Com relação às atividades enzimáticas específicas dos extratos purificados pela filtração por membranas da fermentação submersa, os resultados obtidos tanto para o extrato purificado permeado ($581,08 \pm 13,23$ U/mg_{proteína}) quanto para o extrato purificado retido ($297,34 \pm 3,81$ U/mg_{proteína}) foram superiores aos extratos brutos ($77,24 \pm 1,46$ U/mg_{proteína}), assim verifica-se que o processo de filtração por membranas eliminou inibidores da atividade da enzima, como íons ou outros compostos de baixo peso molecular que poderiam estar afetando a atividade.

A partir dos resultados obtidos tanto para a fermentação em estado sólido como para a fermentação submersa, o microrganismo apresentou crescimento no meio e produção da enzima amilase, porém, na fermentação submersa as atividades enzimáticas obtidas para os extratos retido e permeado depois do processo de microfiltração utilizando membranas foram maiores quando comparadas aos extratos permeado, retido da fermentação em estado sólido.

4 CONCLUSÃO

Ao analisar as atividades enzimáticas nos diferentes ensaios realizados, pode-se concluir que, mesmo havendo produção de amilase tanto na fermentação em estado sólido quanto na fermentação submersa, os resultados dos extratos purificados através de filtração por membranas obtidos na fermentação submersa proporcionaram maiores atividades enzimáticas específicas quando comparado aos extratos purificados da fermentação em estado sólido, o que aponta a escolha da fermentação submersa como processo para a produção de enzimas. A utilização do farelo de trigo como fonte na produção de enzimas amilolíticas é viável, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a subprodutos da agroindústria para produção de amilases com o auxílio dos fungos filamentosos e da fermentação submersa.

5 REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.
- CELESTINO, J. R. et al. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme Research**, p. 1-4, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Washington, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, p. 81, 2002.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous twophase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1– 13, 2012.

SANTOS, T. C. et al. Produção e quantificação de celulasas por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12. n. 2, p.115-123, 2013.

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 700-705, 2010.