

PRODUÇÃO INVERTÁSICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) EM MEIOS SUPLEMENTADOS POR FARELO DE TRIGO

Jéssica Moreira Batista da Silva¹
Ana Carla da Fonseca Ferreira²
Jéssica Renaly Fernandes Moraes³
Marco Antônio Silva⁴
Michelle Rossana Ferreira Vaz⁵

^{1,2,3,4,5} Grupo de Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé – PB, Brasil,
jessicambs@live.com

Introdução

O Brasil possui uma das mais importantes economias do mundo, baseada na agricultura e tendo a produção de café, açúcar de cana, soja, mandioca e frutas como principais matérias-primas. No entanto, a sintetização destes produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (SOCCOL, 2003).

A aplicação de resíduos agroindustriais destaca-se na sua utilização como principal fonte de carbono para a obtenção produtos com valor agregado, entre eles: enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos e aminoácidos (UENOJO, 2007).

O trigo tem como principal subproduto a farinha de trigo que possui nutrientes, tais como: fósforo, proteínas, lipídios, vitaminas e enzimas (GERMANI, 1993). As invertases são enzimas com alto valor industrial, porém o que vem limitando a sua produção tem sido basicamente o elevado custo na produção e o baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da mesma (COUTINHO, 1999).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a produção da enzima invertase por meio da fermentação em estado sólido, com o intuito de atribuir valor a resíduos agroindustriais como farelo de trigo, utilizando como agente transformador o fungo filamentosso *Aspergillus niger* IOC 4003.

Material e Métodos

Preparo do resíduo e microrganismo

O farelo de trigo foi obtido na feira livre da cidade de Sumé-PB, sendo empregado como substrato no processo fermentativo em estado sólido. As caracterizações físico-químicas do resíduo quanto à densidade aparente, pH, umidade e sólidos solúveis foram realizadas conforme procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). O microrganismo empregado foi o *Aspergillus niger* IOC 4003, selecionado por ser uma linhagem produtora da enzima de interesse. Os esporos foram conservados em tubos de ensaio esterilizados e lacrados utilizando o meio BDA (batata, dextrose, ágar).

Processo Fermentativo

Para o processo fermentativo foram utilizados sete frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 3g do substrato. O resíduo foi hidratado com 3mL da suspensão de esporos. O tempo total de fermentação correspondeu a 168h, a 25°C e pouca luminosidade. Nos intervalos de 24h, um frasco erlenmeyer era coletado para a obtenção do extrato enzimático, utilizado na quantificação do crescimento celular, consumo de substrato, umidade, pH, e atividade enzimática.

Extração enzimática

Em fluxo laminar, adicionou-se 100mL de água destilada e 2mL de tween 80 a cada erlenmeyer. Separou-se 50mL do caldo extraído para análises posteriores.

Quantificação do crescimento celular

A realização da quantificação do crescimento celular foi com base nos estudos realizados por Vaz (2011), sendo determinada em função do tempo de cultivo, a partir equação que segue.

$$P = \frac{x-y}{1\text{mL}} \quad (1)$$

Onde: P corresponde ao peso em termos de concentração celular (g/L); x, peso do eppendorf com células; y, peso do eppendorf sem células.

Consumo de substrato

Para a avaliação do consumo de substrato foi utilizada a metodologia de Tortora (2012).

Determinação da atividade enzimática

Para a determinação enzimática foi utilizado o método DNS (ácido dinitrosalicílico) idealizado por Sumner (1921).

Resultados e Discussão*Caracterizações do resíduo seco*

Tabela 1. Composição do resíduo

Parâmetros analisados	Farelo de Trigo
Umidade (%)	14
Sólidos solúveis (°Brix)	2,9
pH	6,5
Densidade aparente (g/mL)	0,3

O valor de pH encontrado neste trabalho se encontra entre os valores encontrados por Silva (2006), que foi de 6,21 e 6,63 para o farelo de trigo fino e grosso, respectivamente. O percentual de umidade obtida no farelo utilizado foi de 14%, superior ao valor de 11,6; 12,1 e 12,7% observado por Dias (2015) em diferentes marcas de farinha de trigo tradicionais. A densidade de 0,3 do farelo de trigo revela que o resíduo tende a não se compactar completamente, fator este, bastante propício ao desenvolvimento dos microrganismos (SANTOS, 2007).

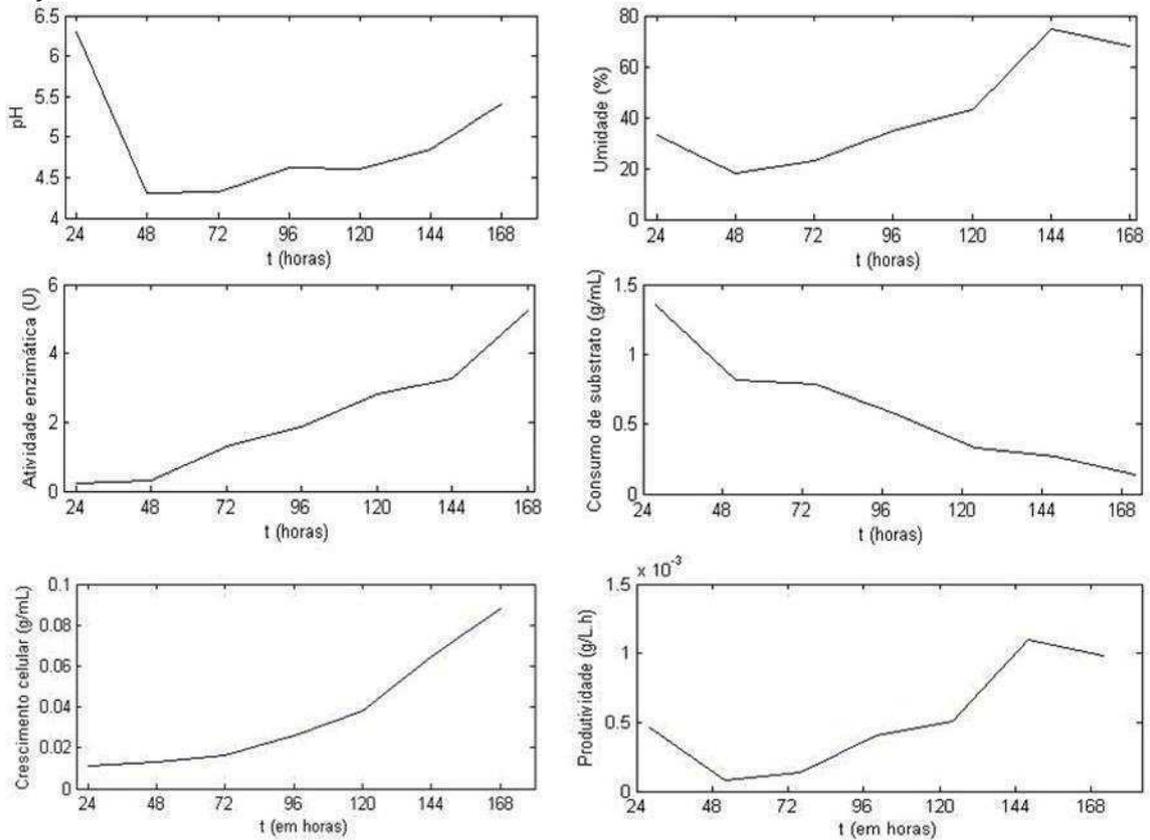
Processo fermentativo

Figura 1. Relação entre pH, umidade, atividade enzimática, consumo de substrato, crescimento celular e produtividade em função do tempo.

De acordo com a Figura 1, o valor do pH na qual o extrato enzimático apresentou atividade máxima foi de 5,4. Outros pHs ótimos foram descritos com 3,85 para a invertase de *Pycnoporus sanguineus* (QUIROGA, 1995) e de 5,5 para a invertase produzida a partir da levedura *Candida utilis* (CHAVEZ, 1997).

O valor mínimo e máximo de umidade foi verificado com 48 e 144 horas, cujos valores chegaram a 18 e 75%, vistos na figura abaixo. Ambos os valores estão dentro dos padrões da fermentação em estado sólido, uma vez que, segundo Paris (2008), variam entre 18 e 85%.

A cada período de fermentação, obteve-se uma taxa média de atividade enzimática de 2,14U/mL.dia, totalizando 5,22 U/mL durante incubação de 168h. Bhatti (2006) relatou uma maior produção de invertase após incubação de 96 horas utilizando o melaço como fonte de carbono pelo *Fusarium solani*, obtendo uma atividade invertásica máxima de 9,90 U/mL.

Ainda na Figura 1, observamos o consumo alimentar do microrganismo em função do tempo de fermentação, demonstrando que foi bastante satisfatório, uma vez que houve o decréscimo de nutrientes com o tempo de fermentação, restando menos de 0,2 g/mL em seu término. Vale enfatizar, também, que há uma relação inversamente proporcional entre este decréscimo e o aumento da atividade enzimática.

Pode-se observar a ausência da fase lag, durante o crescimento celular, indicando a boa adaptação do metabolismo do microrganismo ao meio estudado. A máxima concentração celular atingiu o valor de 0,09 g/mL no instante de 168 horas e manteve-se até o término da fermentação.

Nota-se que a máxima produtividade (Px), na Figura 4, ocorreu às 144 horas de cultivo com o farelo de trigo atingindo o valor máximo de $1,1 \times 10^{-2}$ g/L.h, momento que coincide com a fase log de crescimento celular já mencionado.

Conclusão

Com os parâmetros avaliados neste trabalho, concluímos que:

Existe uma grande vantagem na utilização do resíduo agroindustrial, o farelo de trigo, para a produção de invertase.

Os níveis de atividade invertásica aumentaram exponencialmente, tendo o pico de atividade em 5,22U. Embora os níveis de atividade enzimática e crescimento celular estejam baixos, o resíduo apresentou excelente desempenho.

Referências

- BHATTI, H. N. et al. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, n.54, p.4617-4623. 2006.
- GERMANI, R. Curso para laboratoristas da indústria moageira do trigo. EMBRAPA-CTAA, Rio de Janeiro. 1993.
- COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B. Carbohydrate-Active Enzymes server an integrated database approach. In: "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson (eds). The Royal Society of Chemistry, p.3-12, Cambridge. 1999.
- DIAS, C. M.; FREITAS, M. C. J.; CERQUEIRA, P. M. de C. Análise Físico-Química de Farinha de Trigo Tradicional. *Nutrição Brasil*, v.14, p.1-5.
- IAL. Instituto Adolf Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo. (1985).
- LIU, C. et al. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. *Food Chemistry*, v.96, p. 621-631. 2006.
- MELO, G. G.; BRAZ, L. C. C.; AMADOR, V. C.; DIAS, E. C.; ALMEIDA, É. S.; SILVA, D. P.; BEZERRA, R. M.; COELHO, G. D. Estudos preliminares sobre a atividade adsorptiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus*. *Revista Saúde & Ciência Online*. v.3, p.1-9. 2014.
- PARIS, L. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. 128f. Dissertação (Centro de Engenharias e Ciências Exatas). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2008.
- QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein structure and molecular Enzymology*, n.1251, p.75-80. 1995.
- SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 148f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SILVA, G. Caracterização e Digestibilidade dos farelos fino e grosso de trigo. 31f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHER, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/1369703X/13/2?sdc=1>
- SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.47, p.5-9, 1921.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Local: Porto Alegre. 2003.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*. 2007.
- VAZ, M. R. F.; FRANCA, R. L. S.; ANDRADE, S. S. L.; SOUSA JUNIOR, F. C.; SANTOS, E. S.; MARTINS, D. R. A.; MACEDO, G. R. Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmaniachagasi* in recombinant *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol*, v.42, p.1390-1396, 2011.