

PRODUÇÃO DE PROTEASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *RHIZOPUS ORYZAE*

Francielli Silva dos Santos, Laines Cassiano Sumera, Juliana Bueno Ruiz Rebecca (Coorientadora), Larine Kupski (Orientadora), e-mail: Ra107261@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Tecnologia/Umuarama, PR.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, protease, *Rhizopus oryzae*.

Resumo:

A borra de café pode ser um substrato fornecedor de carboidratos como fonte de carbono e energia para a fermentação em estado sólido e produção de proteases que pode ser empregada para descontaminação de ocratoxina A. Para alcançar o objetivo, foi avaliada a produção de protease durante a fermentação em estado sólido da borra de café pelo microrganismo *Rhizopus oryzae* e a eficiência da enzima produzida para descontaminação de ocratoxina A. Observou-se que menor atividade enzimática (355,6 U/g) foi encontrada no maior tempo de fermentação (120 horas) obteve uma menor atividade enzimática, e a melhor foi em 48 horas de fermentação com 400 U/g de atividade enzimática. O extrato enzimático de 48 horas foi aplicado na degradação de ocratoxina A, obtendo-se uma degradação de 5,8%. Portanto, a fermentação em estado sólido é uma alternativa viável para a obtenção de um extrato enzimático, com potencial para aplicação na cadeia produtiva de alimentos para a redução dos níveis de contaminação de ocratoxina A, e consequentemente contribuir para a segurança dos alimentos.

Introdução

As enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica com uma grande seletividade e especificidade, fazem parte de todas as células vivas, compondo as vias catabólicas e as anabólicas (Lima et al., 2001). As proteases são enzimas hidrolíticas pois elas clivam a proteína em peptídeos e aminoácidos através da reação de hidrólise, sendo adicionado uma molécula de água na ligação peptídica. As proteases podem ser classificadas em dois grupos principais que são as exopeptidases e as endopeptidases, dependendo do sítio de ação das enzimas (Rao et al., 1998). Proteases podem ser obtidas de vegetais, animais e microrganismos, e são conhecidas como enzimas proteolíticas, ou seja, são constituintes essenciais em toda forma de vida, como os procariontes, plantas, fungos e os animais (Kumar e Takagi, 1999).

Os resíduos agroindustriais em geral possuem uma grande concentração de proteínas e de matéria solúvel como de exemplo os carboidratos, vitaminas, sais

minerais, dentre outros, e por consequência disso representam um excelente potencial na utilização como substrato para que os microrganismos possam se desenvolver e poder produzir proteases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES). A fermentação em estado sólido (FES) é definida por um processo que envolve um substrato sólido com mínima quantidade de água presente para que ocorra o crescimento microbiano, onde são simuladas as condições naturais de crescimento destes organismos (PANDEY, 2003).

Neste trabalho foi utilizado como subproduto a borra de café que pode fornecer carboidratos como fonte de carbono e energia para o desenvolvimento de microrganismos e produção de proteases (Kandasamy et al., 2016) para posterior aplicação em estratégias de descontaminação de ocratoxina A. Esta micotoxina é considerada cancerígena do grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, e têm sido encontrada em cereais e em produtos como café, vinho, frutos secos, cerveja e sumo de uva. Tal aspecto torna importante a busca por alternativas para sua descontaminação.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de protease durante a fermentação em estado sólido da borra de café pelo microrganismo *Rhizopus oryzae* e a eficiência da enzima produzida para descontaminação de ocratoxina A.

Materiais e Métodos

Os resíduos de borra de café foram secados em estufa a 60°C durante 6 horas, e peneirados até a granulometria padronizada (<0.5 mm), e acondicionados sob refrigeração até ser utilizado. O microrganismo *Rhizopus oryzae* CCT 7560, foi adquirido no Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, Campinas, Brasil. Para manutenção das cepas foram realizados repiques mensais em meio Ágar batata dextrose. A fermentação foi realizada por meio de biorreatores do tipo bandeja, com dimensões adequadas para obter uma camada fina (aproximadamente 2 cm) de substrato. O meio foi esterilizado, e o substrato suplementado com solução nutriente (KH_2PO_4 2g L⁻¹, MgSO_4 1g L⁻¹ e $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 1,8g L⁻¹). O substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 na concentração de 4×10^6 esporos g⁻¹ e água destilada estéril, sendo ajustado a umidade inicial do sistema para 50%. Em seguida, os biorreatores foram inoculados a 30 °C durante 5 dias, e retirados dos biorreatores a cada 24 horas de fermentação. No tempo 0 foi realizado o mesmo procedimento, mas sem a inoculação a 30 °C. Para a extração foram pesados 3 g de amostra e adicionados 20 mL de NaCl 0,5%. O conteúdo foi homogeneizado a 100 rpm 25°C durante 30 minutos e após filtração o sobrenadante foi recolhido para avaliação da atividade enzimática. A determinação da atividade de protease foi realizada utilizando a albumina como substrato, sendo o conteúdo de aminoácidos liberados quantificados pelo método de Folin. Uma atividade foi definida como a quantidade de tirosina liberada por minuto nas condições de ensaio. Para o ensaio de biodegradação, OTA foi dissolvida em tampão tris HCl pH 7,5 25 mM contendo NaCl 0,5 M e quantificada a 380 nm (absortividade 7160 M cm⁻¹) (PITOUT, 1969). A solução de micotoxina foi incubada

com o extrato enzimático a redução da concentração foi acompanhada a 380 nm durante 60 minutos (Kupski et al., 2013).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão descritos os resultados da atividade da protease. Observa-se que a maior atividade enzimática foi de 400 U/g em um tempo de 48 horas de fermentação, provocando um aumento de 100 vezes quando comparado com o tempo 0 horas.

Tabela 1 – Variação da atividade enzimática de acordo com o tempo de fermentação.

Tempo (h)	Atividade (U/g)
0	300,7
24	383,3
48	400,0
72	357,5
96	307,6
120	355,6

As enzimas proteolíticas vem sendo produzidas por diferentes processos fermentativos. Estudos demonstraram que a produção de protease é afetada principalmente por fatores como o pH e a temperatura em grande parte dos organismos. Balachandran et al. (2021) obteve a melhor atividade proteolítica empregando *Bacillus halodurans* no substrato de farelo de trigo com umidade inicial de 85%. No presente trabalho a condição de 50% de umidade e o tempo de 48 horas foi o mais promissor para obtenção dessa enzima por *Rhizopus oryzae* em borra de café. As proteases possuem diversas aplicações, como por exemplo, agentes de degradação de metabolitos tóxicos como as micotoxinas. Dentro desse contexto, a alta incidência de OTA e seus efeitos nocivos em seres humanos e animais tem motivado a busca por métodos de degradação eficiente e não gerador de derivados tóxicos. Portanto, o extrato enzimático foi empregado na degradação desta micotoxina e foi observado uma redução de 5,8% do conteúdo inicial da micotoxina após 60 minutos de hidrólise enzimática. Sendo assim, novos estudos são necessários para otimizar as condições de produção das proteases e posterior aplicação em estratégias para mitigação de micotoxinas.

Conclusões

A produção de protease por *Rhizopus oryzae* em borra de café foi maior em 48 horas de fermentação. A enzima produzida foi capaz de degradar a micotoxina ocratoxina A (5,8%) após 60 minutos de reação. Portanto o emprego de proteases consiste em uma alternativa viável para a aplicação na cadeia produtiva de alimentos com o intuito de reduzir riscos de exposição à ocratoxina A mediante o consumo de produtos distintos.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio e contribuição para as realizações das pesquisas, além do Programa de Iniciação Científica Jr que visa ampliar o conhecimento científico.

Referências

BALACHANDRAN, C.; VISHALI, A.; NAGENDRAN, N. A.; BASKAR, K.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. Otimização da produção de proteases de *Bacillus halodurans* sob fermentação em estado sólido utilizando agrosresíduos. **Revista Saudita de Ciências Biológicas**, v. 28, p. 4263-4269, 2021.

TANASKOVIC, S. J.; SEKULJICA, N.; JOVANOVIC, J.; GAZIKALOVIC A, I.; GRBAVCIC, S.; DORDEVIC, N.; SEKULIC, M. V.; NEVENA, J. H.; ZORICA, L.; JUGOVIC, K. Atualização de conteúdos de componentes alimentares valiosos e depleção de fatores antinutricionais por fermentação em estado sólido: uma maneira de valorizar o farelo de trigo para nutrição. **Revista de Ciência dos Cereais**, v. 99, 103159, 2021.

LIMA, E. E. **Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**. 2016. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 68p, 2016.

LUZ, J. A. **Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido utilizando *Aspergillus niger*, a partir de Resíduos de *Croton linearifolius***. 2018. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 81p, 2018.

ROCHA, F. T. B. **Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato**. 2018. 74p. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 74p, 2018.

COSTA, M.A.R. **Utilização de extratos enzimáticos no processo de extração do óleo essencial de *Croton argyrophyllus***. 2018. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 75p, 2018.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. 161p. Dissertação (Mestrado em

31º Encontro Anual de Iniciação Científica
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de
2022

Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 161p, 2010.