

## PRODUÇÃO DE AMILASE A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE CACAU

Renata Sampaio Mafra de Santana<sup>1</sup>; Zanon Santana Gonçalves<sup>2</sup>; Marcelo Franco<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pós-Graduanda em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, CEP: 45700-000, Itapetinga-BA, Brasil (renatasms@zipmail.com.br)

<sup>2</sup> Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilheus-BA, Brasil

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

### RESUMO

Neste trabalho foram realizados testes para determinação das melhores condições de produção da amilase de *Aspergillus niger*, as variáveis foram o tempo (24, 72, 120 e 168 horas) e a atividade de água (0,897, 0,961, 0,981 e 0,985) e a matéria prima foi o farelo de cacau. As fermentações em estado sólido foram conduzidas em incubadora bacteriológica refrigerada a 35°C. A amilase produzida foi quantificada através da degradação da solução de amido solúvel e os açúcares redutores produzidos foram quantificados através da reação com ácido dinitrosalicílico. O melhor resultado na produção da amilase (24,98 U/g) foi observado quando se empregou 24 horas de fermentação e 0,897 de atividade e água. Independente do tratamento é observada a redução da atividade amilásica em função do incremento no tempo de fermentação e da atividade de água.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tempo de fermentação, Atividade de água, *Aspergillus niger*.

### PRODUCTION OF AMYLASE FROM SOLID STATE FERMENTATION OF COCOA MEAL

#### ABSTRACT

In this work tests were performed to determine the best conditions of the amylase of *Aspergillus niger*, the variables were time (24, 72, 120 and 168 hours) and water activity (0.897, 0.961, 0.981 and 0.985) and the raw material was the cocoa meal. The solid-state fermentations were conducted in bacteriological incubator cooled to 35 °C. The amylase produced was quantified by the degradation of soluble starch solution and the reducing sugars produced were quantified by reaction with acid dinitrosalicilic. The best result in the production of amylase (24.98 U/g) was observed when used 24 hours of fermentation and 0.897 and water activity. Irrespective of treatment was observed a reduction in amylase activity due to the increase in fermentation time and water activity.

**KEYWORDS:** Fermentation time, Water activity, *Aspergillus niger*.

ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1981 - 2012

## INTRODUÇÃO

As atividades da agroindústria têm proporcionado diversos problemas ambientais, como poluição dos solos, das águas e da atmosfera (ASGHER et al., 2008). O farelo de cacau é o subproduto da indústria cacaujeira produzido na torrefação das sementes do cacau. O estado da Bahia é responsável por toda produção de cacau do Nordeste e por aproximadamente 70% do Brasil (CARVALHO et al., 2006).

A bioconversão de biomassa residual produzida durante as atividades agrícolas produz vários compostos orgânicos com possíveis aplicações industriais, como as enzimas (SANTOS et al., 2010). Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque entre os outros bioprocessos. O termo FES se aplica ao crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos e na ausência de água livre no sistema (HOLKER et al., 2004, GHORAI et al., 2009, ROSA et al., 2011).

O material sólido, aplicado na FES, geralmente fragmentado permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. O volume de água absorvida no material sólido depende da composição, por exemplo: em substratos amiláceos o volume de água ideal para o desenvolvimento do processo fermentativo varia de 25% a 60% de umidade inicial, no entanto em substratos celulósicos esses teores de água são superiores e variam de 60% a 80% sem o aparecimento de água livre.

Na FES a água é a responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos, além de auxiliar a absorção celular de nutrientes. O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do microrganismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985; PANDEY, 2003; RAGHAVARAO et al., 2003).

O conteúdo de líquido ligado à matriz sólida deve estar a um nível que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (GERVAIS et al., 2003).

O fungo filamentosos do gênero *Aspergillus* são os mais promissores na produção de biocompostos, uma vez que além de incrementar o teor protéico, este fungo pode excretar cerca de 20 tipos diferentes de enzimas (SILVEIRA et al., 2007). As enzimas são utilizadas para catalisar uma série de reações. A produção de enzimas amilolíticas teve início no começo do século passado, em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos (SOCCOL et al., 2005).

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura de miolo de pães. O emprego dessas enzimas na preparação do pão pode retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão “fresco” por mais tempo. A  $\alpha$ -amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglicosidase confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração. As amilases fúngicas, na indústria cervejeira, convertem substratos amiláceos e açúcares antes da fermentação alcoólica, além de controlarem a turbidez devido ao amido presente e são utilizadas na produção de cervejas livres de dextrina (GUPTA et al., 2003, MANEIRA et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi utilizar o farelo de cacau como matéria-prima para a produção de amilase por fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentosso *Aspergillus niger*. As variáveis estudadas foram a atividade de água e o tempo de fermentação.

## METODOLOGIA

A cepa utilizada (*Aspergillus niger*) pertence ao (Laboratório de Resíduos Agroindustriais) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Os esporos foram obtidos em erlenmeyer sobre o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar-Difco*) após a incubação por sete dias a 35 °C em estufa de cultura bacteriológica (SOLAB modelo SL 101), com auxílio de perolas de vidro e água destilada estéril, foi efetuada a retirada desses esporos. Sua contagem ocorreu em câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000).

O farelo de cacau, foi adquirido de agroindústrias localizadas na região Sul da Bahia, esse farelo foi submetido a um processo de separação granulométrica, a partir da trituração (20 mesh) em moinho de facas tipo Willey e armazenado a temperatura ambiente.

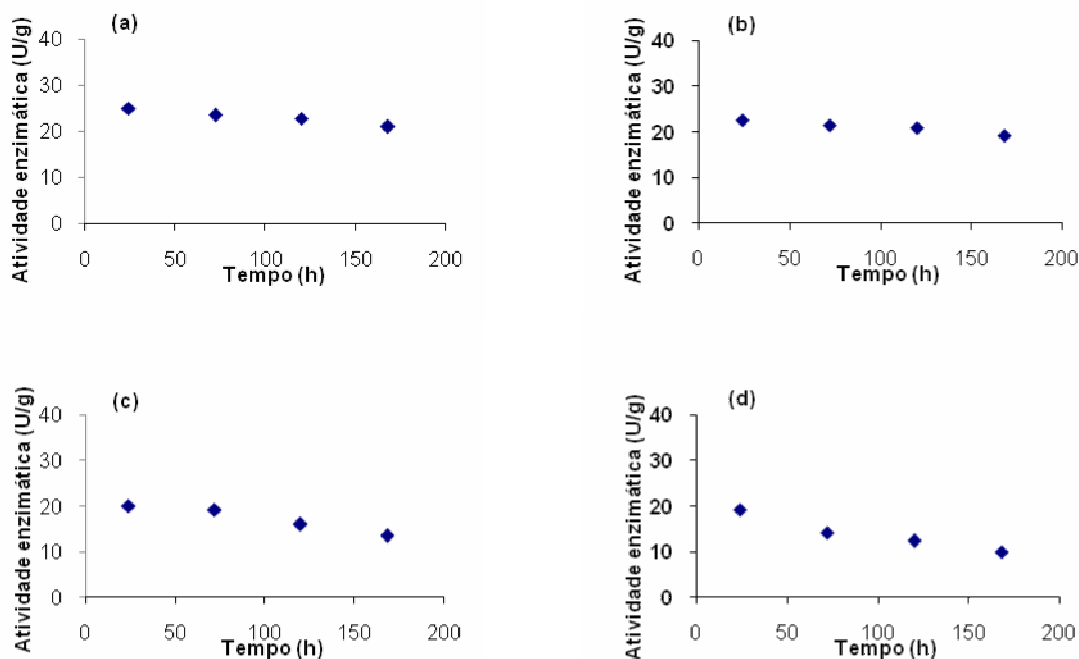
As fermentações foram conduzidas em erlenmeyer de 250 mL contendo 10g do substrato, em seguida foram adicionados diferentes volumes de água estéril até a seguinte atividade de água (0,897, 0,961, 0,981 e 0,985), sendo cada um inoculado com  $10^7$  esporos/grama de substrato. As incubações ocorreram em diferentes tempos de fermentação (24 h, 72 h, 120 h e 168 h), todos a 35 °C em estufa de cultura bacteriológica. Finalizado o respectivo tempo de fermentação a cada ensaio foi adicionado 100 mL de água deionizada estéril, essa suspensão permaneceu sob agitação orbital a 30° C por 30 minutos (QUIMIS-Q816M20) a 200 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos (Centribio modelo 80-2B) esse sobrenadante foi utilizado denominado extrato enzimático bruto (EEB).

A amilase foi quantificada através da adição de 1 mL de uma solução contendo 1% de amido solúvel (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0 (Vetec) e 1 mL do EEB em tubos de ensaio. Esses foram incubados por 30 minutos a 37° C em incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis). Os açúcares redutores produzidos nessa incubação foram quantificados pela reação com ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), onde 1mL desse reagente foi adicionada à 1mL do extrato enzimático bruto em banho maria por cinco minutos. Após este tempo, os tubos foram mantido resfriados a temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se 8 mL de água destilada a cada tubo e efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV) a 570 nm. Os açúcares são expressos por glucose equivalente. Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima liberada por 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições nas condições de ensaio.

Foram feitos quatro experimentos diferentes com respectivas atividades de água (0,897, 0,961, 0,981 e 0,985), onde cada um foi composto por quatro tratamentos (24 h, 72 h, 120 h e 168 h). Os dados foram submetidos à análise de variância da regressão. Os parâmetros dos métodos polinomiais foram testados pelo teste t, considerando 10% de probabilidade para erro tipo I.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre todos os resultados observados (figura 1) a maior produção enzimática obtida (24,98 U/g) foi no tempo de 24 horas e a 0,897 de atividade de água enquanto que a menor produção enzimática (9,91 U/g) ocorreu no tempo de 168 horas e a 0,985 de atividade de água.



**FIGURA 1** - Efeito da atividade de água ( $A_w$ ) e do tempo de fermentação sobre a atividade enzimática (U/g). (a)  $A_w = 0,897$ ; (b)  $A_w = 0,961$ ; (c)  $A_w = 0,981$  e (d)  $A_w = 0,985$ .

Os modelos polinomiais de cada atividade enzimática estão demonstrados nas equações 1 a 4. Os dados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos ( $P < 0,1$ ).

$$(A_w = 0,897) Y = - 0,0088x^2 + 1,3729x - 3,484 \quad (1)$$

$$(A_w = 0,961) Y = - 0,0029x^2 + 0,5421x + 14,236 \quad (2)$$

$$(A_w = 0,981) Y = - 0,0025x^2 + 0,4578x + 17,710 \quad (3)$$

$$(A_w = 0,985) Y = - 0,0048x^2 + 0,7211x + 6,166 \quad (4)$$

Segundo PALÁCIOS-CABRERA et al. (2005) o crescimento do fungo *A. niger* não é afetado por baixos valores de atividades de água. Valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do microrganismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares simples.

Independente do tratamento ocorreu uma redução na atividade enzimática em função do aumento no tempo de fermentação e na atividade de água, conforme observado na tabela 1.

**TABELA 1** - Percentual de redução da atividade de enzima em função do tempo de fermentação e da atividade de água (Aw).

Tempo (h)	Aw			
	0,897	0,961	0,981	0,985
24	-	-	-	-
72	6,20 %	5,16 %	3,93 %	25,90 %
120	8,53 %	7,41 %	20,33 %	35,41 %
168	15,97 %	15,04 %	33,05 %	48,47 %

Essa redução em função do tempo de fermentação pode ser explicada devido ao possível esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a excreção da enzima, geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle que são estimulados ou inibidos por produtos presentes no meio de cultivo. Os produtos finais da via metabólica frequentemente inibem a produção de enzimas e sua atividade tende a ser reduzida a um valor constante. (ALVA et al., 2007; SHAFIQUE et al., 2009). Enquanto que a redução da atividade enzimática em função do incremento da atividade de água pode ser explicada através da redução na porosidade do sistema fermentativo (SANTOS et al., 2011) tendo como consequência a redução na difusão de oxigênio e também na dificuldade de eliminação de dióxido de carbono pelo fungo filamentososo.

SHAKTIMAY et al. (2010) afirma que acima de 0,981 de atividade de água há tendência a um decréscimo da atividade da amilase cultivada em FES utilizando resíduo de mandioca. O declínio pode ser atribuído a menor porosidade, baixa transferência de oxigênio e aeração e adsorção da enzima nas partículas do substrato, mesma tendência observada nesse trabalho.

### CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou que é possível utilizar o farelo de cacau como meio de cultura para o crescimento do fungo *Aspergillus niger* visando a produção de amilase, as condições de cultivo mais favorável para a maximização da produção enzimática foi em 24 horas de fermentação e a 0,897 de atividade de água. A análise de variância foi estatisticamente significativa a 10% de probabilidade pelo teste t. O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor ou suprimento além do farelo de cacau e da água em diferentes teores, fato que demonstra a viabilidade de utilização do farelo de cacau como matéria-prima para bioprocessos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro concedido.

### REFERÊNCIAS

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y.Y.; VYSSHALI, P.; SHRUTI, M. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, South África, v.

6, n. 5, p. 576-81, 2007.

ASGHER, M.; BHATII, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R.L. Recent Developments in Biodegradation of Industrial Pollutants by White Rot Fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, Rockville Pike, v.19, n. 6, p.771-783, 2008.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; SILVA, F.F.; SILVA, R.R. Desempenho e Digestibilidade de Ovinos Alimentados com farelo de cacau (*Theobroma cacao* L.) em Diferentes níveis de Substituição. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 7, n. 2, p. 115-122, 2006.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 85-101, 2003.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. – Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food research International**, Amsterdam, v.42, n. 5/6, p.577-587, 2009.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 1-18, 2003.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, London, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, Amsterdam, v.7, n. 6, p.258-265, 1985.

MANEIRA, A.P.; MEINHARDT, S.; KALIL, S.J. Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2011.

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

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 24-28, 2005.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical. Engineering Journal**, London, v.13, n. 2/3, p.81-84, 2003.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 9, p. 127-135, 2003.

ROSA, C.B.S.; BORSATO, D.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, A.P.C. Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 32, n. 3, p. 1049-1058, 2011.

SANTOS, T.C.; GOMES, D.P.P.; FRANCO, M. Enriquecimento Proteico dos Resíduos Sólidos do Processamento de Frutas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiania, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2010.

SANTOS, T.C.; CAVALCANTI, I.S.; BONOMO, R.C.F.; SANTANA, N.B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2210-2216, 2011.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany, Pakistan**, v. 41, n. 2, p. 897-905, 2009.

SHAKTIMAY, K.; DATTA, T.H.; RAY, R.C. Optimization of thermostable  $\alpha$ - amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n. 2, P. 301-309, 2010.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciências Tecnológicas de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p.805-811, 2007

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.