

Production, Pre-Purification and Encapsulation of Proteolytic Enzyme Secreted by Filamentous Fungus

Produção, Pré-Purificação e Encapsulamento de Enzima Proteolítica Secretada por Fungo Filamentoso

Article Info:

Article history: Received 2023-03-03 / Accepted 2023-05-20 / Available online 2023-05-24

doi: 10.18540/jcecv19iss3pp15485-01e



Jad Lorena Feitosa Simplicio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7705-0506>

Federal University of Maranhão, Brazil

E-mail: jad.lfs@discente.ufma.br

Bianca Muniz de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5908-5403>

Federal University of Maranhão, Brazil

E-mail: muniz.bianca@discente.ufma.br

Humberto Oliveira da Silva Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8877-593X>

Federal University of Maranhão, Brazil

E-mail: humberto.oliveira@discente.ufma.br

Yasmim Menezes do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7234-4548>

Federal University of Maranhão, Brazil

E-mail: yasmim.menezes@discente.ufma.br

Adriana Crispim de Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6310-0015>

Federal University of Maranhão, Brazil

E-mail: adriana.crispim@ufma.br

Resumo

O encapsulamento de enzimas permite a preservação de suas atividades biológicas em diversas condições ambientais, tendo importância na aplicação industrial. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir, purificar parcialmente e encapsular a enzima microbiana protease obtida por fermentação semissólida. O extrato enzimático foi produzido a partir da fermentação de substrato com diferentes composições físico-químicas através do agente de fermentação o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*. Um planejamento experimental de mistura foi utilizado para determinar a região experimental e as proporções ideais entre os substratos. O extrato enzimático obtido pela formulação otimizada foi submetido ao processo de purificação parcial em sulfato de amônio, diálise e na sequência liofilizado. Com a enzima liofilizada realizou-se a determinação enzimática, coagulação do leite, análise termogravimétrica e análise térmica diferencial. O processo de encapsulamento foi realizado através da técnica de gelificação iônica na presença do polímero alginato de sódio e cloreto de cálcio dihidratado. A difratometria por raios-X (DRX) identificou que as amostras mesocarpo do babaçu, farelo de trigo e fibra do coco babaçu estudadas apresentaram características estruturais amorfas, presença de celulose e lignina. A protease obtida na formulação do meio otimizado, precipitada e liofilizada apresentou capacidade de coagulação do leite, atividade proteolítica de 261,5 U/g e através das análises térmicas foi verificado que o material possui estabilidade térmica em torno de 40 °C. Foi possível encapsular o extrato enzimático e preservar a atividade enzimática e com capacidade de coagulação do leite. Os resultados evidenciaram a otimização da formulação

do meio, como também o potencial de aplicação industrial da enzima purificada e encapsulada preservando a atividade e possibilitando a aplicação e reutilização da enzima.

Palavras-chave: Fermentação semissólida. *Aspergillus oryzae*. Planejamento de mistura. Encapsulamento.

Abstract

Encapsulation of enzymes allows the preservation of their biological activities in various environmental conditions, and is important for industrial application. Thus, the objective of this work was to produce, partially purify and encapsulate the microbial protease enzyme obtained by semisolid fermentation. The enzyme extract was produced from the fermentation of substrate with different physicochemical compositions by the fermentation agent the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. An experimental mixture design was used to map out the experimental region and determine the optimal ratios between substrates. The enzyme extract obtained from the optimized formulation was subjected to partial purification in ammonium sulfate, dialysis, and then lyophilized. With the freeze-dried enzyme the enzymatic determination, milk coagulation, thermogravimetric analysis, and differential thermal analysis were performed. The encapsulation process was carried out using the ionic gelation technique in the presence of the polymer sodium alginate and calcium chloride dihydrate. X-ray diffractometry (XRD) identified that the studied babassu mesocarp, wheat bran and babassu coconut fiber samples showed amorphous structural features, presence of cellulose and lignin. The protease obtained in the formulation of the optimized medium, precipitated and freeze-dried, presented milk coagulation capacity, proteolytic activity of 261.5 U/g and through thermal analysis it was verified that the material has thermal stability around 40 °C. It was possible to encapsulate the enzyme extract and preserve the enzymatic activity and the coagulation capacity of the milk. The results showed the optimization of the medium formulation, as well as the potential for industrial application of the purified and encapsulated enzyme, preserving the activity and enabling the application and reuse of the enzyme.

Keywords: Semisolid fermentation. *Aspergillus oryzae*. Mixture planning. Encapsulation.

1. Introdução

As enzimas são proteínas e macromoléculas biológicas que catalisam substratos específicos em produtos, apresentando diferentes propriedades (YUEN, *et al.*, 2019; DEMIRKAN, *et al.*, 2017).

Existem enzimas de origem microbianas, animal e vegetal, na qual, as enzimas de origem microbianas são as mais escolhidas na indústria, pela sua estabilidade, viabilidade econômica, facilidade de modificação, otimização do produto, alto rendimento, consistência, rápida produção com meios de cultura acessíveis e alto desempenho catalítico. As enzimas microbianas vêm ganhando enorme importância, devido à eficiência, compatibilidade e estabilidade em processos industriais (AQUARONE, *et al.*, 2001; ALMEIDA, *et al.*, 2011). Dentre as enzimas de origem microbiana, tem-se a enzima protease, que possui aplicação em diversos setores industriais como: detergentes, alimentícia (fabricação de queijo, panificação, clarificação de cerveja), farmacêutica (depilação), produção de ração animal e gerenciamento de resíduos (LIMA, 2016; DEMIRKAN, *et al.*, 2017; KOBLITZ, 2019).

Na indústria alimentícia, as proteases vegetais, em específico a papaína, utilizada no amaciamento de carnes, atua hidrolisando as proteínas da carne, apresentando alta afinidade pela actina e boa atividade sobre o colágeno, contribuindo para a maciez do alimento e também utilizada no processo de clarificação da cerveja, hidrolisando os peptídeos e impedindo que eles se solubilizem evitando a turvação, contribuindo no processo de clarificação e formação de espumas. As proteases animais, renina e quimotripsina, utilizada na coagulação do leite, atuam na capacidade para formar coágulo e textura excelentes. As proteases microbianas, excretadas pelo fungo *Aspergillus oryzae*, utilizada na maturação de queijos, atuam na preservação do valor nutricional, contribuindo em alterações de aroma, sabor e textura. As enzimas fúngicas são utilizadas na

panificação, onde atuam na modificação da rede proteica pela quebra das ligações peptídicas contribuindo na hidrólise de produtos macios (AQUARONE, *et al.*, 2001; KOBLITZ, 2019).

A utilização da produção enzimática na indústria requer eficiência e baixo custo, sendo que os resíduos agroindustriais são excelentes alternativas por possuírem um baixo preço de mercado, substratos de grande potencial na produção de enzimas comerciais (MUKHTAR, *et al.*, 2013; HARANGOZÓ, *et al.*, 2015). Além disso, as enzimas fúngicas são altamente desejáveis para a fermentação de base sólida, pois penetram em substratos duros e aceleram o processo de hidrólise (YUEN, *et al.*, 2019).

A fermentação semissólida é definida e caracterizada pelo crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida, apresentado um valor de atividade de água que possibilite o crescimento e metabolismo do microrganismo, mas que, ao mesmo tempo, não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz sólida (PALMA, 2003). Por apresentar menor custo na demanda de energia, equipamentos e tratamento de efluentes reduzido, a fermentação semissólida é tradicionalmente utilizada para a obtenção de enzimas de origem fúngica, à medida que é cada vez maior o interesse da indústria por microrganismos produtores de enzimas, na qual possuem uma ampla aplicabilidade (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997; PEREIRA, 2014). A utilização de resíduos agroindustriais baratos como substratos na fermentação em estado semissólido, auxiliam na fermentação da produção de enzimas, uma vez que, a mistura desses substratos torna-se viável o crescimento microbiano e fornecem uma melhor área de superfície e acessibilidade da nutrição ao microrganismo (RIGO, *et al.*, 2021).

O babaçu é uma planta nativa do Brasil, onde, somente na região Nordeste possui uma área de cerca de 14 milhões de hectares com babaçu, sendo que a maior parte (54,2 %) se concentra no Estado do Maranhão (LORENZI, 2004; BATISTA *et al.*, 2006). Seu fruto é composto pelo epicarpo que é a camada extrema do fruto do babaçu, possui estrutura fibrosa, correspondente a 12 % do fruto possuindo cor amarelo-avermelhado. O mesocarpo é a camada abaixo do epicarpo, corresponde a 23 % do fruto, tem aspecto farinhoso e é rica em amido. Endocarpo protege as amêndoas, corresponde a 58 % do fruto. A parte central do fruto é composta por sementes (amêndoas) na qual extrai o óleo vegetal, 7 % do fruto (LORENZI, 2004; VIEIRA, *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2019). O babaçu torna-se um substrato excelente pela sua gama de propriedades.

A atividade das enzimas também pode ser diminuída ou inibida por pequenas moléculas (impurezas) presentes no processo. Em processos industriais o uso das enzimas sob condições adversas e extremas pode alterar sua estabilidade e diminuir sua vida útil, pelos fatores como, mudança de temperatura, pH ou forças iônicas, podendo perder a sua total capacidade catalítica (YUEN, *et al.*, 2019; BARROSO, *et al.*, 2021).

No intuito de minimizar despesas e oferecer benefícios tanto na área da pesquisa quanto nos processos industriais, o encapsulamento enzimático desempenha um papel importante e vantagens, como: aumentar o número de moléculas de enzimas por unidade de área, aumento da reutilização das enzimas, evitar contaminação enzimática no produto final, melhorar a atividade enzimática e evitar a perda de atividade (DEMIRKAN, *et al.*, 2017).

Existem várias técnicas de encapsulamento e imobilização de enzimas, que são divididos de acordo com seu mecanismo de formação das partículas em físicos, químicos e os físico-químicos (BARROSO *et al.*, 2021). Neste trabalho foi utilizado o método físico-químicos, na qual está incluído a técnica de gelificação iônica que é acessível e de baixo custo.

A técnica é baseada na capacidade de reticulação de polímeros naturais incluindo alginato, quitosana, pectina e celulose, que possuem cargas quando expostos aos íons monovalente, divalente ou trivalente. Esses biopolímeros são de fácil manipulação, tem propriedades desejáveis e estáveis a pHs superiores a 3,5 e são de grande interesse devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e tem estabilidade química (RIBEIRO, 2014; DEMIRKAN, *et al.*, 2017).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e encapsular a enzima microbiana protease obtida por fermentação semissólido utilizando substrato regional.

2. Metodologia

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no campus avançado da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de Imperatriz, Maranhão, nos laboratórios de Microbiologia e Tecnologia de Cereais do Curso de Engenharia de Alimentos.

Os substratos utilizados foram: mesocarpo do coco babaçu (MB) obtido na Associação de Quebradeiras de Coco da cidade de Cidelândia, MA/BR, a fibra da casca do babaçu (FCB) foi cedida pela indústria Tobasa Bioindustrial de Babaçu localizada na cidade do Tocantinópolis, TO/BR e o farelo de trigo (FT) foi comprado no comércio local na cidade de Imperatriz, MA/BR.

Os principais equipamentos utilizados nesta pesquisa foram: Fluxo laminar com recirculação de ar - Pachane, Autoclave Vertical CS - Primatec, Incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) - SOLAB SL - 117, centrífuga refrigerada - Daiki, balança analítica - Marte, espectrofotômetro UV/Visível com varredura - GEHAKA UV 340G, Liofilizador LS3000 TERRONI.

2.1 Agente de Fermentação

O microrganismo utilizado nas fermentações foi o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CCBP 001, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical e gentilmente cedido à Universidade Federal do Maranhão. Os esporos do fungo foram ativados em tubos de ensaios com meio ágar batata dextrose inclinado e incubados a 30 °C por 7 dias em incubadora DBO (SOLAB, SL - 117), esse processo foi repetido transferindo esporos do ágar inclinado para um novo tubo com ágar batata dextrose inclinado e incubados a 30 °C por 7 dias em incubadora DBO. Na terceira etapa de ativação os esporos do ágar inclinado foram inoculados em meio a 10 g farelo de trigo umedecido com 5 mL de solução 1,7 % NaH_2PO_4 e 2 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estéril a 1 atm a 121 °C em Erlenmeyer de 125 mL e incubados por 5 dias a 30 °C em incubadora DBO (marca SOLAB, SL - 117). Para soltar os esporos das partículas de farelo de trigo utilizou-se 50 mL de solução Tween 0,3 % (v/v) e agitando com um auxílio de bastão de vidro, em sequência, a suspensão foi filtrada em gaze estéril e o tamanho do inóculo foi determinado utilizando a contagem de esporos em câmara de Neubauer.

2.2 Difração de Raios - X (DRX)

As medidas de difração de raios - X foram realizadas no laboratório LDRX na UFMA – Imperatriz, Campus Avançado.

O DRX é uma técnica empregada para fazer a identificação da cristalinidade dos compostos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, dessa forma, a técnica é um dos fatores importantes para determinar as propriedades estruturais dos materiais lignocelulósicos, presente nesta pesquisa.

As amostras MB, FT e FCB foram submetidas à análise de DRX com auxílio de um difratômetro Epyrean da PANanalytical, usando varredura angular (2θ) de 5° a 50°, com passo angular de 0,02° e tempo por passo de 2 s.

2.3 Meio de fermentação semissólida e Planejamento de mistura

Realizou-se um estudo de formulação do meio de fermentação através de delineamento experimental de mistura tipo Simplex-Centroid com Pontos Interiores, visando compreender as proporções de substrato na formulação para obtenção de maior atividade proteolítica.

No Delineamento Experimental de Misturas tipo Simplex-Centroid utilizou-se os substratos em proporções para compor as misturas contendo 10 g em cada ensaio, no total de 10 ensaios experimentais, como podemos observar na Tabela 1, correlacionando o planejamento com o crescimento do *Aspergillus oryzae* em 96 h fermentação. O inóculo foi de 10^7 esporos de *Aspergillus oryzae* por gramas de meio, incubados por 96 h a 30 °C em incubadora DBO (marca SOLAB, SL -

117). Para todos os ensaios, as extrações dos extratos enzimáticos foram obtidas a partir da adição de água destilada e incubação de 1 hora a 30 °C e filtração para a separação do sobrenadante. O sobrenadante foi armazenado em -6 °C para a determinação enzimática proteolítica e demais testes realizados neste estudo.

Tabela 1 - Planejamento experimental de 3 fatores: simplex-centroid + pontos interiores, Mesocarpo do babaçu (MB), Farelo de Trigo (FT) e Fibra do Coco Babaçu (FCB).

Pontos Experimentais	(MB) %	(FT) %	(FCB) %
1	100 %	0 %	0 %
2	0 %	100 %	0 %
3	0 %	0 %	100 %
4	50 %	50 %	0 %
5	50 %	0 %	50 %
6	0 %	50 %	50 %
7	33 %	33 %	33 %
8	66 %	17 %	17 %
9	17 %	66 %	17 %
10	17 %	17 %	66 %

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com 90 % de confiança, utilizando o software STATISTIC versão 7.0.

2.4 Determinação de Atividade Proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado o método de FREITAS et. al., (2015), o extrato enzimático foi diluído em 1 mL de solução de azocaseína 0,5 % em tampão acetato 50 mM, pH 5 aos tubos, seguindo da incubação em banho maria a 37 °C, por 40 min. A reação foi paralisada com ácido tricloroacético, centrifugada por 15 min a 3000 rpm, e o sobrenadante reagindo com KOH (5%), seguindo da leitura no espectrofotômetro UV/Visível com varredura. A atividade enzimática determinada foi considerada uma unidade de atividade proteolítica (U) definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto de reação.

2.5 Purificação parcial do extrato proteolítico

Uma fermentação para obtenção de volumes maiores de extrato enzimático foi realizada utilizando a formulação do meio com melhor proporção de substrato para a obtenção da enzima no planejamento de mistura. Após a obtenção do extrato enzimático, este foi submetido à precipitação em solução de sulfato de amônio na concentração de 60 % de saturação (Bracht e Ishii-Iwamoto, 2003), na dissolução da amônia utilizou-se banho de gelo para manter a solução em baixa temperatura. Em seguida a proteína precipitada foi dialisada em membrana de celulose para dessalinização, posteriormente a fração proteica foi liofilizada em Liofilizador LS3000 TERRONI em condições a vácuo com -40 °C. Após a concentração do extrato, fez-se a determinação da atividade de protease, coagulação do leite e análises térmicas.

2.6 Coagulação do leite pelo extrato proteolítico

O extrato enzimático liofilizado foi dissolvido na proporção de 1mg/20 mL em solução de cloreto de cálcio 10 mM (pH = 8.22), o tempo de coagulação foi medido utilizando-se a mistura de 1 mL da enzima dissolvida em cloreto de cálcio 10 mM com 1 mL da solução de leite em pó desnatado marca Piracanjuba dissolvido em cloreto de cálcio 10 mM (12 %), e incubadas a 37 °C no banho maria até o tempo de coagulação do leite.

2.7 Caracterização por Análises térmicas

As medidas de análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas no Laboratório de Análises térmicas (LAT) da UFMA – Imperatriz, Campus Avançado. As medidas de TGA e DTA do extrato enzimático liofilizado foram realizadas de forma simultânea em um analisador termogravimétrico Shimadzu DTG-60, em cadinho de α -alumina aberto, sob atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL/min), numa faixa de 25 a 700 °C, com taxa de aquecimento 10 °C/min.

2.8 Encapsulamento

Para encapsular o extrato enzimático liofilizado, utilizou os seguintes reagentes: Alginato de sódio – (Sigma-Aldrich), cloreto de cálcio PA, Dihidratado (Proquímios) e água deionizada.

Preparou-se uma solução de alginato de sódio 1 % e cloreto de cálcio 1 %, a qual essas soluções ficaram sob agitação magnética por 5 h. Solubilizou-se o extrato liofilizado em água deionizada, sob 3 h de agitação magnética. Adicionou-se 20 mL da solução de alginato de sódio 1 % à solução do extrato enzimático (Figura 1a), após 1 h sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa, gotejou-se a mistura (extrato enzimático e alginato de sódio 1%) na solução de cloreto de cálcio 1 % (Figura 1b). A solução resultante contendo os particulados esféricos enzimáticos foi deixada em repouso a temperatura ambiente durante 1 h. Após as microesferas serem filtradas, mediu-se o diâmetro de 10 esferas (média amostral).

Foram feitos teste de coagulação do leite e determinação da atividade proteolítica com as enzimas encapsuladas.

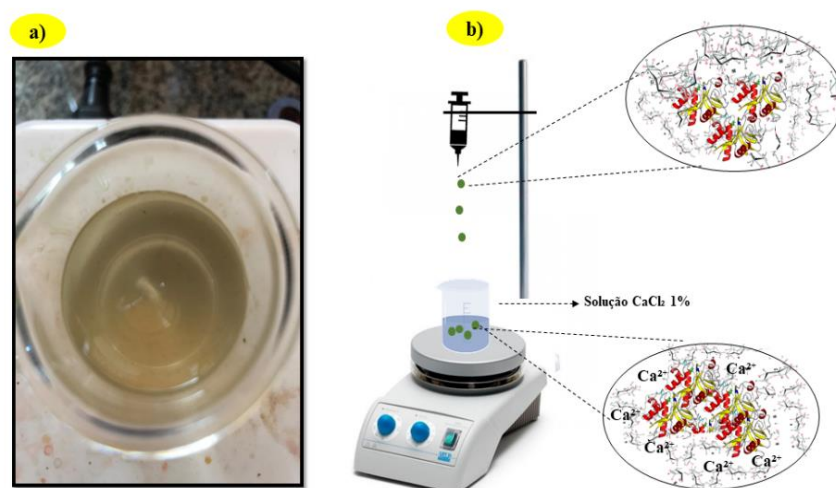


Figura 1 - Procedimento do encapsulamento do extrato enzimático, a) mistura do extrato enzimático com 20 mL alginato de sódio 1 %; b) representação do método de encapsulamento.

Na determinação de atividade proteolítica e coagulação do leite dos encapsulados, utilizou o mesmo procedimento do item 2.3 e 2.5, modificando apenas a troca do extrato diluído pela quantidade de capsulas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Difração de Raios – X

A Figura 2 apresenta os difratogramas obtido para os substratos (mesocarpo do babaçu (MB), farelo de trigo (FT) e fibra do coco babaçu (FCB)) na faixa angular de 5 a 50°, 2 θ . Conforme observado, no difratograma da amostra do MB, revela três halos parcialmente amorfos entre 2 θ = 13° e 25°, que se apresenta de forma mais intensa quando comparados ao difratograma do FT e FCB. Os halos centrados em 2 θ = 15° e 17° da amostra MB, são característicos da presença de lignina e o halo amorfo em 2 θ = 23°, pode ser atribuído a celulose. No difratograma da amostra do FT, observamos um halo amorfo entre 2 θ = 15° a 25°, na sua forma menos intensa que é característica da presença de celulose. Enquanto que no difratograma da amostra da FCB, analisamos dois halos amorfos, o primeiro centrado em 2 θ = 16° característica da presença de lignina e em 2 θ = 22° atribuída a presença de celulose. Além disso, a ausência de picos cristalinos no padrão de DRX indica que o material apresenta uma estrutura amorfa, e com isso, podemos indicar a quebra desses materiais lignocelulosicos durante processo de fermentação semissólido.

Segundo a literatura os picos alargados centralizados por volta de 2 θ = 15°-18° são característicos da presença de lignina e os localizados em torno de 2 θ = 20 - 25° podem ser atribuídos a celulose contida no resíduo, sendo estes compostos característicos de materiais lignocelulósicos (ANDRADE-MAHECHA, 2012; SILVA, 2021).

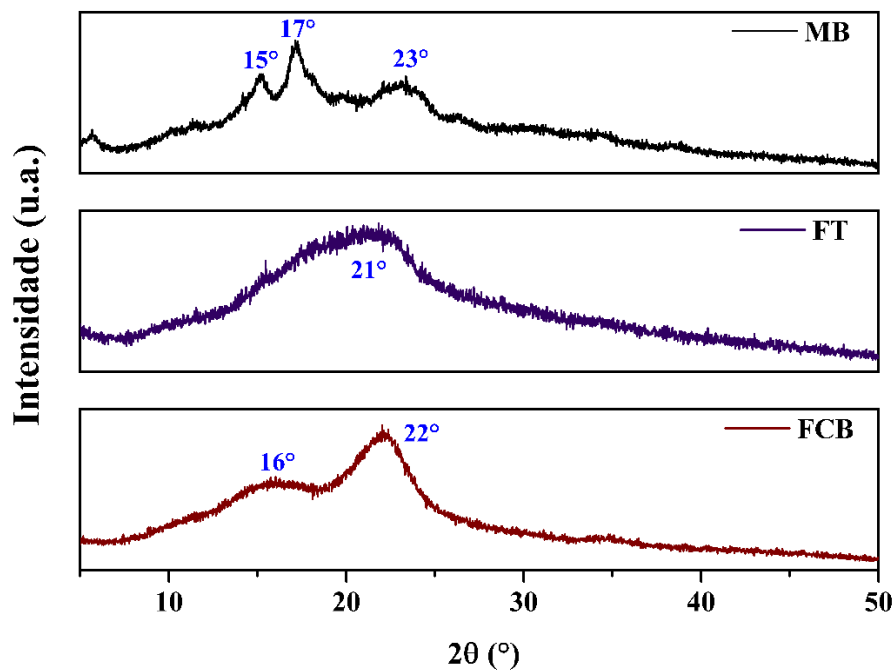


Figura 2 - Padrão de difração de raios - X das amostras MB, FT e FCB.

3.2 Composição dos substratos e Atividade proteolítica

Na Figura 3, podemos observar o crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* CCBP 001 em temperatura de 30 °C após 96 h de fermentação em frascos Erlenmeyer com umidade de 35 % para diferentes formulações dos substratos com os dados das produções de atividade de protease, como observamos na Tabela 2.

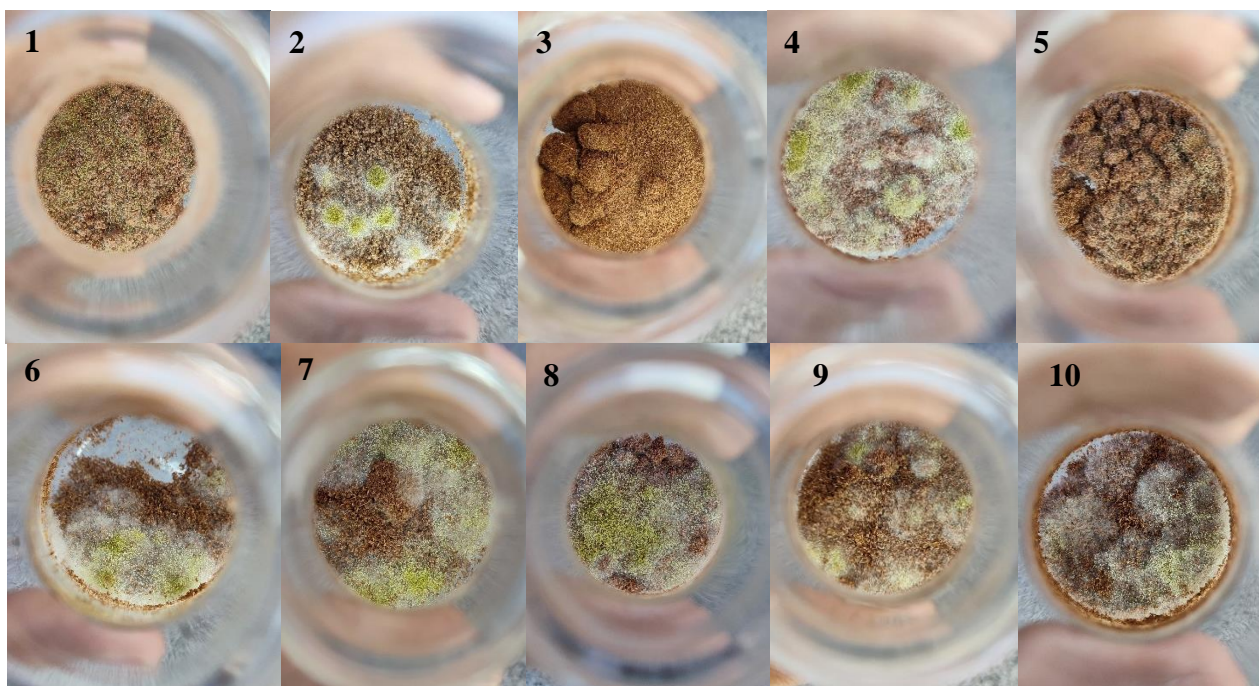


Figura 3 - Crescimento do *Aspergillus oryzae* em 96 h fermentação com 10 ensaios de misturas.

A maior atividade de protease ocorreu nos meios com 100 % do farelo de trigo (51,625 U/g), a segunda maior produção foi de 41,75 U/g foi quando misturou 50 % de farelo de trigo e 50 % de fibra do coco babaçu (ponto experimental 6), sendo observado na Tabela 2. A terceira melhor formulação para obtenção da atividade de protease foi o ponto experimental 9 com 66 % de farelo de trigo 17 % de fibra de coco babaçu e 17 % mesocarpo do babaçu onde obteve-se 39,25 U/g, e a quarta melhor produção com 33,75 U/g apresentando proporções iguais de substratos.

Tabela 2 - Planejamento experimental com quantidades em gramas das variáveis independentes reais relacionadas a produção de atividade proteolítica.

Pontos Experimentais	Massa de Mesocarpo do babaçu (g)	Massa de Farelo de Trigo (g)	Massa de Fibra do coco babaçu (g)	Atividade de protease (U/g)
1	10	-	-	0,75
2	-	10	-	51,63
3	-	-	10	6,13
4	5	5	-	30,00
5	5	-	5	2,88
6	-	5	5	41,75
7	3,33	3,33	3,33	33,75
8	6,67	1,67	1,67	16,13
9	1,67	6,67	1,67	39,25
10	1,67	1,67	6,67	8,00

Os quatro melhores resultados que apresentaram atividade proteolítica considerável, foram devidas as condições de temperatura, umidade, aeração e substrato no meio. Os substratos utilizados na formulação do meio apresentam nas suas estruturas, segundo a literatura, celulose, hemicelulose, lignina, amido, proteínas e fibras que fazem estes substratos sólidos servirem de fontes de carbono e energia para o desenvolvimento do *Aspergillus oryzae*, e com isso, confirmando que as enzimas fúngicas são altamente desejáveis para a fermentação de base sólida, pois penetram em substratos

duros e aceleram o processo de hidrólise (SILVA et. al., 2018). Visando custo e benefício, indicou-se otimizar substrato contendo a fibra do coco babaçu.

3.3 Análise Estatística do Planejamento Experimental

Para a análise estatística do planejamento experimental, inicialmente foram ajustados os resultados para o modelo linear, com 10 termos, na qual foi observado que apenas o coeficiente de regressão que considera a linearidade na formulação com farelo de trigo apresentou evidência significativa, para 90 % de confiança. Tabela 3 apresenta os resultados dos coeficientes do modelo e seus respectivos intervalos de confiança. A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação de 0,8966 e $F_{\text{Calculado}}$ de 30,36357.

Tabela 3 - Análise de variância para atividade de protease no planejamento de mistura.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade (v)	Média quadrática	$F_{\text{Calculado}}$	F_{Tabelado}	p-valor
Regressão	2740,755	2	1370,378	30,36357	3,26	0,000355
Resíduos	315,926	7	45,132			
Total	3056,681	9	339,631			
% de variação explicada (R^2)			0,8966	R^2_{ajustado}	0,8671	

A partir da obtenção da atividade proteolítica do ensaio de mistura, observamos na Figura 4a, a curva de contorno ternária modelo linear do planejamento experimental de mistura para a atividade de protease em função das proporções de substratos, sendo visualizado na Figura 4b, na qual, medida que aumenta as proporções de farelo de trigo é possível obter maior atividade proteolítica na superfície vermelha, onde, a mistura dos subprodutos foram Mesocarpo do babaçu (MB), Farelo de trigo (FT) e Fibra do coco babaçu (FCB). É possível analisar que o planejamento de mistura dos substratos para o meio fermentativo é satisfatório para a escolha do meio em que a produção de protease resulta em maiores valores de atividade proteolítica, onde, a primeira maior atividade de protease foi 51,625 U/g e segunda com produção de 41,75 U/g.

E com isso, o uso de misturas substratos apresenta melhor balanço energético e um menor impacto ambiental do que substratos puros.

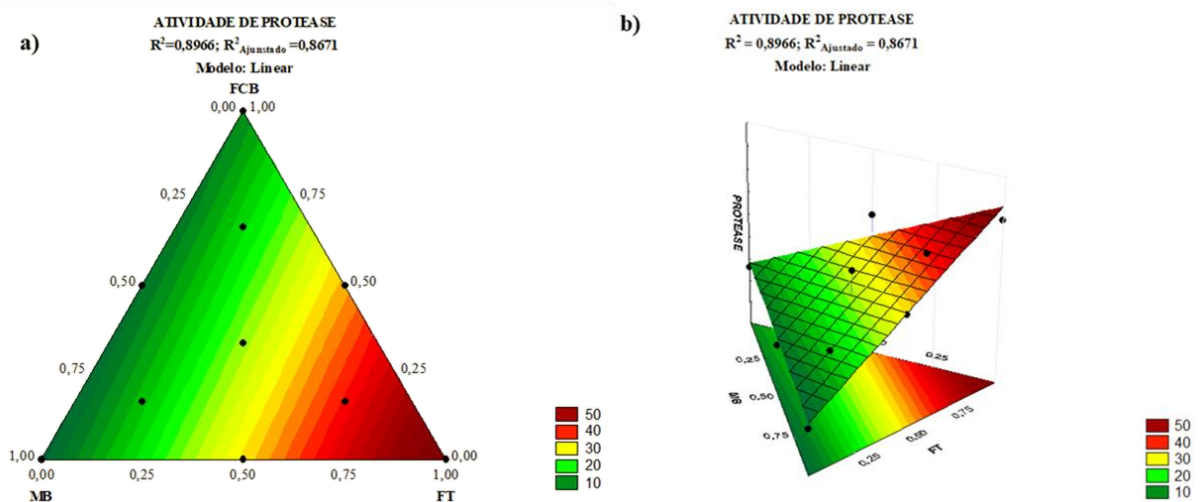


Figura 4 - Gráfico do planejamento de mistura (a) Superfície de contorno; (b) Superfície de resposta ternária visando a obtenção de maior atividade proteolítica.

A fermentação em meio semissólido, apresenta características vantajosas utilizando substratos com fontes altas de energias e baixa atividade de água.

O mesocarpo do babaçu é uma fonte rica em amido (68,30 %), contendo vitaminas e sais minerais (FRANÇA *et al.*, 2014). A formulação ternária, do mesocarpo do babaçu, farelo de trigo e fibra do coco babaçu apresenta um substrato como grande potencial para a produção de enzimas proteolíticas, onde, a composição de amido, celulose e fibras são fatores decisivos no processo fermentativo semissólido. Na composição de trigo contém cerca de 70 % de carboidratos e os outros 30 % são proteínas, vitaminas e minerais. Já o farelo de trigo tem em média 31 % de celulose, 26 % de hemicelulose, 24 % de lignina e 7 % cinzas, sendo um substrato considerado como fonte de nutrientes para produção de enzimas (BAKKER, 2017; SANTOS *et al.*, 2008). Dessa forma, o presente estudo, utilizando apenas farelo de trigo, apresentou maior quantidade de atividade proteolítica.

Além de ser rico em proteínas, ácidos graxos e carboidratos, o farelo de trigo tem também características físicas como textura e porosidade que podem facilitar a dispersão dos fungos, contribuindo para a maior produção enzimática quando comparado aos demais fermentativos em questão (PANDEY, 2013). Fibra do coco babaçu possui propriedades de absorção de água, fibroso, arenoso e lignocelulósico (SILVA *et al.*, 2018), em conjunto com as composições de mistura binária de farelo de trigo com a fibra do coco babaçu, esse substrato desempenha um papel importante na produção de enzimas.

Na Figura 5, analisando os resíduos brutos dos resultados obtidos com o planejamento de mistura podemos observar que os substratos têm um segmento de reta no ajuste linear, justificando pelas proximidades dos pontos sendo significantes as quantidades de substratos utilizados neste trabalho.

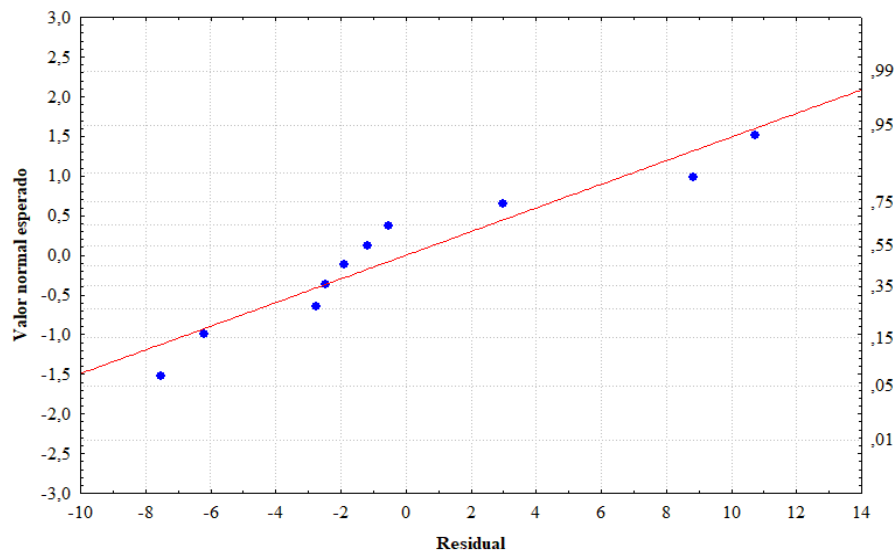


Figura 5 - Análises de resíduos brutos do planejamento de mistura no modelo linear.

3.4 Otimização Enzimática

A partir das análises estatística observou-se que o modelo linear apresenta um comportamento mais adequado na análise de variância (ANOVA), dessa forma, a segunda melhor produção foi otimizada para poder incluir a fibra do coco babaçu que é um produto regional de grande valor nas comunidades das quebradeiras de coco na região do Maranhão, e por ser um resíduo bastante areoso sendo de fácil obtenção, reaproveitamento sustentável e de grande influência nos processos fermentativos em estado sólido devido a rápida taxa de difusão de oxigênio na película de água em torno dos particulados fibrosos.

Utilizando o ponto experimental 6 (Tabela 2) da segunda melhor condição do planejamento experimental de mistura, obtido a partir das condições favoráveis de substrato, umidade e atividade enzimática, de acordo com na Figura 6, observamos o crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* CCBP 001 em otimizações de temperatura de 30 °C com 96 h de fermentação, umidade de 40 % e composição do substrato de 50 % de farelo de trigo e 50 % de fibra do coco babaçu. A extração se deu da mesma forma do planejamento de mistura, sendo obtido 500 mL de extrato enzimático. Com essa composição e condição de umidade favorável para o crescimento do *Aspergillus oryzae*, obteve-se o extrato enzimático com pH de 7,92 e produção de 85 U/g atividade de proteolítica.

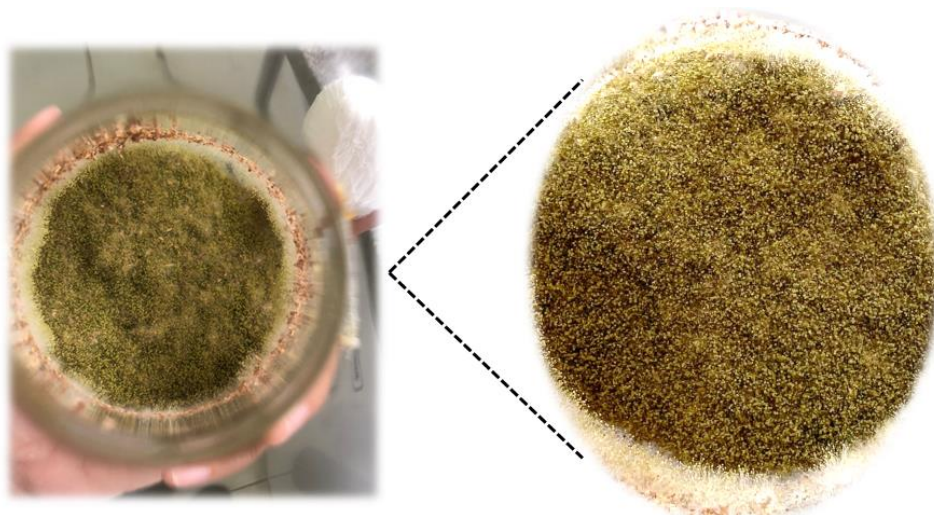


Figura 1 - Crescimento do *Aspergillus oryzae* em 96 h fermentação com FT e FCB.

3.5 Purificação e Liofilização Enzimática

Na solubilização de 0,017 g de extrato proteolítico em pó em 10 mL de H₂O destilada, obteve uma produção de protease de 261,5 U/g. A qual em comparação com a atividade obtida apenas do extrato diluído com água destilada, a concentração de enzimas proteolíticas é bem maior quando se tem o extrato liofilizado. O desempenho da protease na coagulação do leite para a produção de queijo pode ser avaliado pela relação entre a capacidade para formar coágulo e a hidrólise total das caseínas do leite (KOBLOITZ, 2019). Logo, para a coagulação do leite desnatado, utilizando 1 mL do extrato diluído em CaCl₂ a uma temperatura de 37 °C em banho maria, verificou-se que o leite coagulou em menos de 5 min, confirmando a concentração da enzima após a purificação e liofilização.

Visto isso, a adição de enzimas proteolíticas diretamente ao leite ou à coalhada é boa alternativa para acelerar este processo (JUSTINA, *et al.*, 2018).

3.6 Análises Térmicas

Na Figura 7, analisamos o comportamento do extrato enzimático liofilizado por meio das curvas TGA e DTA com o aumento da temperatura. Na qual, para as medidas de TGA-DTA utilizou-se 2,019 mg de massa do extrato enzimático para um intervalo de temperatura entre 25 °C a 701 °C.

De acordo com o comportamento da curva DTA, observa-se um evento endotérmico entre 30 °C e 117 °C, onde mostra uma perda de massa de aproximadamente 11,4 %, cerca de 0,230 mg, pela curva TGA, atribuída à saída das moléculas água residual e associada ao pico endotérmico da curva DTA em 52 °C, confirmando a desidratação do extrato enzimático. No segundo evento apresentado na curva TGA, correspondendo à perda de 54 % de massa, cerca de 1,085 mg foi observado no intervalo de 231 °C a 486 °C, sendo relacionado ao pico exotérmico da curva DTA

em 364 °C, confirmando a decomposição das substâncias proteicas, vitaminas e fibras do extrato e sobrando apenas cinzas, os minerais.

Dessa forma, por meio das análises térmicas observamos que o extrato enzimático possui estabilidade térmica até 40 °C, pois a partir dessa temperatura o extrato começa a desidratar e decompor compostos orgânicos, que são substâncias que podem trazer sabores e odores desagradáveis, e com isso, a partir do aumento da temperatura o extrato começa a perder sua atividade enzimática.

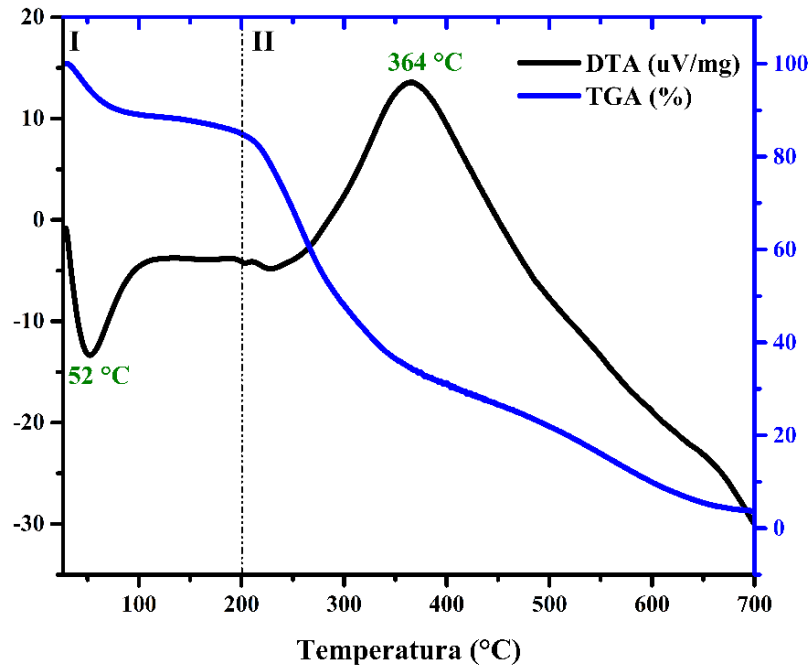


Figura 2 - Curvas TG e DTA do extrato enzimático liofilizado.

Nos estudos sobre atividade enzimática e estabilidade térmica da β – Gatactosidase de *kluveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, Bosso (2012), constatou-se diferença entre a atividade das enzimas extraídas da levedura *K. lactis* e fungo filamentosos *A.oryzae* na hidrólise da lactase, onde a enzima de *K. lactis* apresentou boa estabilidade a 40 °C enquanto que, a enzima de *A. oryzae* atuou melhor em 55 °C.

No trabalho de Magalhaes *et al.*, (2019) sobre a Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae), observou-se que a enzima protease de *Lentinus crinitus* apresenta estabilidade a temperatura de 60 °C.

3.7 Encapsulamento da Enzima

Utilizando a técnica de gelificação iônica, foi possível observar que o método foi rápido e simples. Para as análises dos encapsulados enzimáticos foram selecionadas 10 amostras, onde essas 10 representam o tamanho amostral de todos os encapsulados obtidos durante o processo. As mesmas apresentaram média de diâmetro igual a 0,1965 cm, desvio padrão de 0,0298 e coeficiente de variação 0,1521. Na Figura 8, observamos uma melhor visualização das capsulas obtidas no microscópio.

O alginato de sódio e cloreto de cálcio utilizados para o encapsulamento das enzimas contribuíram para atividade proteolítica, uma vez que, íons metálicos têm sido descritos na literatura aumentando e estabilizando a atividade enzimática, onde os íons podem estar envolvidos nos processos catalíticos, participando das reações de redox ou de transferência de elétrons (MAGALHÃES, *et al.*, 2019).

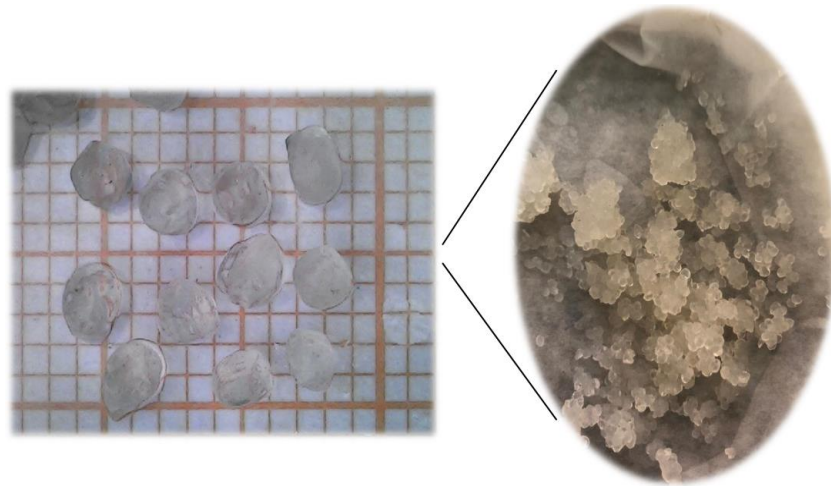


Figura 3 - Encapsulamento enzimático.

Com a obtenção dos encapsulados enzimático, fez-se testes da atividade de protease e teste de coagulação do leite. Utilizando 20 amostras para o teste de atividade proteolítica e 25 amostras para coagular o leite. Confirmou a obtenção da atividade proteolítica pela formação de um composto de cor rosa. O teste feito serviu para analisar a eficiência da enzima obtida, na qual o encapsulado enzimático liberou enzimas e ocorreu a degradação por protease, logo, a enzima encapsulada pode ser facilmente separada da solução reacional por centrifugação, determinando a proteólise. E as 25 amostras adicionadas em 1 mL de leite solubilizado com CaCl_2 10 mM, coagulou o leite em 3 h e 25 min, onde observamos na Figura 9. Apesar do tempo prolongado na coagulação, a enzima encapsulada apresenta uma boa aplicação na maturação de queijos artesanais.

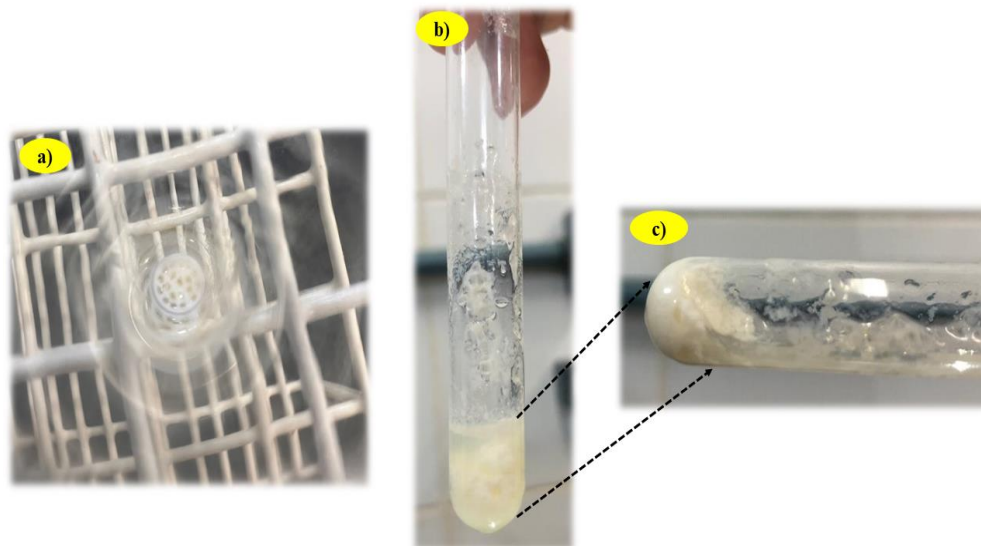


Figura 4 - Coagulação do leite com encapsulados enzimáticos a partir de 3 h e 25 min a 37 °C em banho maria.

Contudo, de acordo com a literatura e estudos experimentais, a adição direta do extrato enzimático pode apresentar desvantagens, como a grande perda de enzimas no soro, má distribuição da enzima na coalhada, formação de sabor e textura indesejável, devido ao ataque direto sobre o substrato pelas enzimas. E uma forma de contornar esse efeito é a utilização de enzimas encapsuladas, onde as mesmas são fisicamente separadas do substrato, o que impede o ataque direto nos estágios iniciais da maturação, sendo liberadas controladamente ao meio durante o tempo de maturação (JUSTINA, *et al.*, 2018; GULER-AKIN *et al.*, 2012).

Desta forma, a aplicação de enzimas proteolíticas encapsuladas é uma técnica altamente eficiente e econômica e está progressivamente substituindo as abordagens convencionais em escala laboratorial e em níveis industriais para produtos maturados e na produção de queijos artesanais, que utilizam enzimas com estabilidade de temperatura até 40 °C.

4. Conclusão

Neste trabalho foi possível obter atividade proteolítica do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* CCBP 001 por fermentação semissólida, utilizando substratos mesocarpo do babaçu, farelo de trigo e fibra do coco babaçu por meio do planejamento de misturas. Verificou-se que por meio do planejamento de mistura o substrato com farelo de trigo foi o melhor substrato para produção da enzima e a composição de 50 % farelo de trigo e 50 % fibra do coco babaçu obteve a segunda melhor produção da enzima. Formulações contendo farelo de trigo em maior proporção também obtiveram resultados expressivos quanto à atividade de protease, sendo elas: farelo de trigo combinado com fibra de coco babaçu e farelo de trigo combinado com fibra do coco babaçu e mesocarpo do coco babaçu, logo, a análise estatística do planejamento de mistura foi de suma importância na otimização de obtenção enzimática de *Aspergillus oryzae*.

A difratometria por raios -X (DRX) identificou que as amostras dos substratos estudadas apresentaram características parcialmente amorfas com presença de halos amorfos de celulose e lignina.

Na otimização da obtenção do segundo melhor resultado de atividade proteolítica de *Aspergillus oryzae* CCBP 001, foi possível obter um extrato enzimático com 85 U/g de atividade enzimática nas condições de 40% de umidade a 30 °C. A secagem do extrato enzimático proteolítico possibilitou-se a determinação da atividade em maiores quantidades, concentração da enzima, determinação da estabilidade térmica, encapsulamento do extrato e maior rendimento na coagulação do leite.

A enzima purificada e liofilizada teve uma produção de protease de 261,5 U/g, onde confirmamos que a enzima tem maior concentração no estado sólido sem moléculas de água no meio. A purificação da enzima por precipitação com sulfato de amônio apresentou atividades suficientes, coagulando o leite em menos de 5 min.

Por meio das análises de TGA e DTA, foi observado que o extrato enzimático liofilizado apresenta estabilidade térmica até 40 °C, sofrendo em seguida desidratação, decomposição dos compostos orgânicos em maiores temperaturas.

O encapsulamento do extrato enzimático apresentou estabilidade e atividade proteolítica. Os encapsulados enzimático coagulou o leite em um tempo mais prolongado, porém de forma eficiente e gradual.

Referências

- Andrade-Mahecha, M. M. (2012). *Microcompósitos, nanocompósitos e coberturas a base de materiais biodegradáveis obtidos a partir do biri (Canna indica L.)*. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- Aquarone, E., Schmidell, W., de Almeida Lima, U., & Borzani, W. (2001). *Biotecnologia industrial – processos fermentativos e enzimáticos*. (1ª Edição). Editora Blucher, p351-367.
- Bakker, C. M. C. N. (2017). *Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduos farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido*. Tese de Doutorado em engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, RN, Brasil.
- Barroso, T. L. C. T., Alexandre, J. B., Silva, L. C., Castelo, R. M., Ribeiro, L. B., Furtado, R. F., Zambelli, R. A. (2021). *Tecnologia de encapsulamento na área de alimentos: Uma revisão*.

- Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, 2525-3409. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16728>.
- Batista, C. P., Torres, O. J. M., Matias, J. E. F., Moreira, A. T. R., Colman, D., Lima, J. H. F., Macri, M. M., Jr, R. J. R., Ferreira, L. M., & Freitas, A. C. T. (2006). Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, n. 3, pp. 26-32. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000900005>.
- Bosso, A. (2012). *Atividade Enzimática e Estabilidade Térmica da β – Gactosidase de *kluveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Londrina, PR, Brasil.
- Bracht, A., Ishii-iwamoto, E.L. (2003). *Métodos de Laboratório em Bioquímica*. Ed. Manole, São Paulo.
- de Castro, R. J. S., de Freitas, A. C., & Pinto, G. (2009). Efeito da quantidade inicial de água na síntese de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. In Embrapa Agroindústria Tropical, Artigo em anais de congresso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., Natal.
- da Silva Magalhães, A. A., de Amorim Silva, T., Teixeira, M. F. S., Cruz Filho, R. F., da Silva, S. D., Gomes, D. M. D., & Pereira, J. O. (2019). Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais*, 14(3), 453-462. doi: <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.231>.
- Demirkan, E., Avci, T., & Aykut, Y. (2018). Protease immobilization on cellulose monoacetate/chitosan – blended nanofiber. *Journal of Industrial Textiles*, 47(8), 2092-2111. doi: 10.1177/1528083717720205.
- dos Santos, A. F. A., de Andrade, V. D., Cardoso, B. A., da Silva, O. S., de Oliveira, R. L., Porto, A. L. F., ... & Porto, C. S. (2020). Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 25663-25676. doi:10.34117/bjdv6n5-135.
- França, R. C., Chagas-Junior, A. F., Carvalho, E. E. N., Guimarães, L. G. L., Erasmo, E. A. L. & Oliveira, L. A. (2014). Mesocarpo de coco babaçu (*Orbignya* sp.) como fonte de carbono para produção de meios de cultura para *Trichoderma*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 5, n. 1, p. 88-94, 2179-4801. doi: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v5n1.franca>.
- Freitas, A. C. (2013). *Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* ccbp 001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida*. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE, Brasil.
- Güler-Akin, M. B., Akin, M. S., Atasoy, A. F., Kirmaci, H., & Eren-Karahan, L. (2012). Accelerated Kashar cheese ripening with encapsulated lipase and protease enzymes. *Italian Journal of Food Science*, 24(4), p358-366.
- Harangozó, G., & Zilahy, G. (2015). Cooperation between business and non-governmental organizations to promote sustainable development. *Journal of Cleaner Production*, 89, 18-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.092>.
- Justina, M. D., Justina, M. B. D., & Skoronski, E. (2018). O uso das enzimas na indústria de laticínios: uma breve revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora* v. 73, n. 3, p. 172-184. doi: 10.14295/2238-6416.v73i3.679.
- Koblitz, M. G. B. (2019). *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ISBN: 978-85-277-34477-6.
- Lima, E. E. (2016). *Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungo Filamentosos e Aplicação Biotecnológica*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.
- Lorenzi, H., Souza, H. M. D., Costa, J. T. M., Cerqueira, L. S. C. D., & Ferreira, E. J. L. (2004). *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*.

- Mukhtar, H. & Haq, I. (2013). Comparative Evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *Bacillus subtilis* in submerged and Solid State Fermentation. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538067>.
- Palma, M. B. (2003). Produção de xilanases por *Thermoascus Aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81–84. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3).
- Pereira, J. L. (2014). *Produção de enzimas amilolíticas por Aspergillus oryzae através de fermentação no estado sólido*. Monografia (Graduação em Farmácia), Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Ribeiro, L. N. M. (2013). *Síntese e caracterização de bionanocompósitos magnéticos para liberação controlada de fármacos*. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, SP, Brasil.
- Rigo, D., Gayeski, L., Tres, G. A., Camera, F. D., Zeni, J., Valduga, E., ... & Backes, G. T. (2021). Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 9232-9254. doi: 10.34117/bjdv7n1-624.
- Santos, S. F. M., Macedo, G. R., Silva, F. L. H., Souza, R. L. A. & Pinto, G. A. S. (2008). Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 1-2. doi: 10.1590/S0100-40422008000800010.
- Silva, C. B. S., Ribeiro, F. T. R., Malveira, J. Q., Rios, M. A. S. (2018). Caracterização energética da casca do coco babaçu. In: XXXVI Encontro de Iniciação Científica, Encontros Universitários da UFC.
- Silva, D. F. (2021). *Aplicação da Fermentação em Estado Sólido com Aspergillus niger ATCC 1004 em Casca de Mandioca para Produção de Biogás*. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, BA, Brasil.
- Silva, J. S., Santos, M. L., Filho, E. C. S., Carvalho, M. G. F. M., & Nunes, L. C. C. (2019). Subprodutos do babaçu (*Orbignya sp*) como novos materiais adsorptivos: uma revisão. *Revista Matéria*, v. 24, n. 3, ISSN 1517-7076, doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620190003.0730>.
- Silva, L. A. (2017). *Produção e caracterização de protease alcalinam a partir de substrato do coco babaçu (Orbignya Speciosa)*. Monografia de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão - UFMA, Imperatriz, MA, Brasil.
- Valdeperas, M., Talaiakis, M., Dhayal, S. K., Velicka, M., Barauskas, J., Niaura, G. & Nylander, T. (2019). Encapsulation of Aspartic Protease in Nonlamellar Lipid Liquid Crystalline Phases. *Biophysical Society*, 117, 829-843. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.031>.
- Vieira, A. P., Santana, S. A. A., Bezerra, C. W. B., Silva, H. A. S., Chaves, J. A. P., Melo, J. C. P., Filho, E. C. S., & Airoidi, C. (2011). Removal of textile dyes from aqueous solution by babassu coconut epicarp (*Orbignya speciosa*). *Chemical Engineering Journal*, v. 173, n. 2, pp. 334-340. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.043>.
- Viniegra-González, G. (1997). Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. *Advances in Solid State Fermentation*, p. 5-22.
- Yuen, T. W., Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Kasim, F. H., Yaakub, A. R. W., LakshmiPriya, T. & Lee, C. G. (2019). Encapsulation of fungal extracellular enzyme cocktail in cellulose nanoparticle: enhancement in enzyme stability. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v. 56, p. 475-483. doi: 10.56042/ijbb.v56i6.29251.