VETOR

Produção associada de amilases e celulases através de fermentação submersa

Associated production of amylases and cellulases through submerged fermentation

Samuel Teixeira Lopes[1], Leticia Eduarda Bender[2,†], Gabrielle Fusiger Berwian[3], Luciane Maria Colla[2,3]

[1] Curso de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia, Universidade de Passo Fundo Curso, Passo Fundo – RS – Brasil.
[2] Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola de Ciências Agrárias, Inovação e Negócios, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS – Brasil.
[3] Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola de Ciências Agrárias, Inovação e Negócios, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS – Brasil.
[†]**Autor correspondente:** letiiciabender@gmail.com

Resumo

O estudo objetiva estudar a otimização da produção homemade associada de enzimas amilolíticas e celulolíticas por fermentação submersa. A produção de enzimas foi realizada utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farinha de triticale como substratos do meio fermentativo, utilizando bactérias isoladas de resíduos agroindustriais. Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto à atividade amilolítica e celulolítica. As variáveis significativas ($p<0,05$) sobre a produção amilolítica foram a bactéria e a fonte de nitrogênio, para produção celulolítica foram a bactéria, concentração e fonte de nitrogênio. Ademais, as atividades enzimáticas máximas foram obtidas no tempo de 120 h para ambas as enzimas estudadas. Neste sentido, a fermentação poderia ser encerrada em 120 h devido a elevada produção das enzimas de interesse (6,02 U/mL para atividade amilolítica e 5,52 U/mL para a atividade celulolítica). Uma segunda fermentação submersa foi realizada, fixando as variáveis que não apresentaram significância segundo o delineamento Plackett-Burman e avaliando duas concentrações de sulfato de amônio (0,25 e 0,50%). A partir disso, foi possível determinar as condições otimizadas para a produção *homemade* e associada de amilases e celulases bacterianas, sendo a Bactéria B em meio de cultivo com suplementação de 0,25% de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Palavras-chave

Produção enzimática • Bioprocessos • Bactérias • Enzimas hidrolíticas

Abstract

The study aims to optimize the homemade production of amylolytic and cellulolytic enzymes by submerged fermentation. Enzyme production was carried out using sugarcane bagasse and triticale flour as substrates for the fermentation medium, using bacteria isolated from agro-industrial residues. Enzymatic extracts were evaluated for amylolytic and cellulolytic activity. The significant variables ($p<0.05$) in the amylolytic production were the bacteria and the nitrogen source, for cellulolytic production the bacteria, the nitrogen concentration, and the source. Furthermore, the maximum enzymatic activities were obtained at 120h for both studied enzymes. In this sense,

fermentation could be ended in 120 h due to the high production of the enzymes of interest (6.02 U/mL for amylolytic activity and 5.52 U/mL for cellulolytic activity). A second submerged fermentation was carried out, fixing the variables that did not show significance according to the Plackett-Burman design and evaluating two concentrations of ammonium sulfate (0.25 and 0.50%). Enzyme production by bacteria A and B showed no statistical difference ($p>0.05$) between the experiments, demonstrating that using 0.25% ammonium sulfate is preferable. This allowed for determining the optimized conditions for producing and combining bacterial amylases and cellulases at home, using Bacteria B in a culture medium supplemented with 0.25% ammonium sulfate as the nitrogen source.

Keywords

Enzyme production • Bioprocesses • Bacteria • Hydrolytic enzymes

1 Introdução

As enzimas são biocatalisadores utilizados na biotecnologia, elas apresentam alta demanda no mercado mundial devido a sua utilização em diversos setores industriais e na pesquisa. A sua ampla utilização é reflexo da especificidade dessas biomoléculas com diferentes substratos, atuando na catálise de diversas reações [1]. Além disso, atuam em condições mais brandas que catalisadores químicos e, geralmente, com maior seletividade [2].

As enzimas são produzidas para uma variedade de aplicações industriais, seja alimentícia, farmacêutica, sucroalcooleira, polímeros, entre outras [3, 4]. Entre as enzimas produzidas estão as amilases, que são capazes de degradar o amido em unidades de glicose [5]. Entre as enzimas amilolíticas estão as α-amilases, endoenzimas que atuam na hidrólise do amido em oligossacarídeos, e as amiloglicosidases e β-amilases que atuam nas extremidades não redutoras, liberando glicose como produto [5, 6]. As celulases, por sua vez, são um complexo enzimático que atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose em açúcares simples, como celobiose e glicose [7]. As celulases podem ser classificadas em três complexos: as endoglucanases, as exoglucanases e as β-glicosidases, baseadas no estágio de despolimerização da celulose em que atuam [7, 8].

As amilases e celulases têm um papel importante em aplicações biotecnológicas visto que a hidrólise enzimática de polissacarídeos como amido e celulose são de interesse para a produção de oligossacarídeos e biocombustíveis [5, 9]. É esperado que o mercado mundial de enzimas atinja a marca de 7 bilhões de dólares em 2023, com 20% desse valor representado pelo mercado de celulases e 30% pelo mercado de amilases [6, 10–13].

A produção de enzimas pode ser realizada utilizando técnicas de fermentação, seja em cultivos submersos ou em estado sólido. A fermentação submersa é aquela em que microrganismos são inoculados em um meio fermentativo líquido, em que os nutrientes para seu desenvolvimento ficam solubilizados ou em suspensão [2], [14]. A fermentação submersa é o principal processo para a produção enzimática a nível industrial devido ao controle de parâmetros como temperatura, pH, oxigenação e homogeneidade do meio de cultura e maior facilidade na recuperação das enzimas extracelulares [15, 17]. Entretanto, o custo de produção dessas enzimas é um gargalo para sua aplicação. Com isso, pesquisas estão em andamento para reduzir o custo através da utilização de substratos alternativos para a fermentação [1]. A produção enzimática depende das condições do processo de fermentação, juntamente com a necessidade da otimização dessas condições a fim de reduzir o custo e aumentar o rendimento de produção [7].

Neste contexto, a utilização de subprodutos agroindustriais como nutrientes é uma alternativa para a redução de custos envolvendo esses bioprocessos [18, 19]. Devido a esses resíduos apresentarem baixo valor comercial, são recursos com grande potencial para a utilização em processos biotecnológicos gerando produtos de alto valor agregado [14, 19]. Os resíduos agroindustriais são compostos por nutrientes como proteínas, açúcares e minerais, propiciando o crescimento microbiano em fermentações submersas ou em estado sólido [12] Alguns resíduos já estudados para com esse objetivo incluem farelo de arroz [20], farelo de trigo [21] e bagaço de cana [22]. Outro substrato alternativo é o triticale, um cereal amiláceo de baixo consumo e alta atividade amilolítica [23]. Essas biomassas são compostas de lignocelulose ou amido, que representam os polissacarídeos mais abundantes na natureza [5].

A fração lignocelulósica é uma rede complexa e resistente composta por celulose, hemicelulose e lignina. Essas estruturas formam macrofibras responsáveis pela estabilidade e alta rigidez da parede celular, sendo a celulose a fração mais rígida [5, 12]. Devido as estruturas complexas, os microrganismos inoculados são induzidos a excretar enzimas hidrolíticas para utilização do substrato como fonte energética [24].

Baseando-se nesse cenário, este trabalho busca estudar a otimização da produção *homemade* de enzimas amilolíticas e celulolíticas por fermentação submersa utilizando bactérias e substratos alternativos como bagaço de cana-de-açúcar e farinha de triticale.

2 Materiais e Métodos

2.1 Delineamento Experimental

A otimização das condições de produção de amilases e celulases foi estudada a partir de um delineamento experimental Plackett-Burman, a fim de se avaliar a influência de sete variáveis sobre a produção de amilases e celulases, totalizando 12 experimentos. Foram estudadas as variáveis microrganismo, pH, fonte e concentração das fontes de nitrogênio, concentração de glicose, a concentração da solução de micronutrientes e o pré-tratamento dos substratos da fermentação. A fonte e a concentração de nitrogênio foram estudadas no mesmo delineamento para explorar as interações complexas e efeitos combinados sobre a atividade enzimática, além da possível redução de experimentos. As Tabelas 1 e 2 apresentam as variáveis estudadas, bem como os níveis reais e codificados para cada variável independente estudada.

Tabela 1: Níveis reais e codificados das variáveis independentes estudadas na otimização da produção enzimática.

Fatores	Símbolo	Nível codificado	
		-1	+1
Microrganismo	X1	Bactéria A	Bactéria B
pH	X2	5,0	6,0
Fonte de N	X3	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$
Concentração da fonte de N (m/v)	X4	0,25%	1,0%
Concentração de glicose (m/v)	X5	0%	0,5%
Solução de micronutrientes (m/v)	X6	5%	10%
Pré-tratamento do substrato	X7	Não	Sim

Tabela 2: Matriz do delineamento experimental utilizado para a avaliação da produção de celulases e amilases por bactérias via fermentação submersa.

Experimentos	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

2.2 Fermentação Submersa

2.2.1 Preparo do pré-inóculo das bactérias

Foram estudadas bactérias isoladas de mix de frutas (Bactéria A) e de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar (Bactéria B) visando a produção de amilases e celulases. As bactérias foram inoculadas em meio Plate Count (PC) composto por 5 $g.L^{-1}$ de triptona, 2,5 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura e 1 $g.L^{-1}$ de glicose, a partir das cepas isoladas em meio PCA. Aproximadamente 50 mL do meio PC foram adicionados em biorreatores do tipo Erlenmeyer (250 mL), sendo inoculadas duas alçadas da colônia de cada bactéria com posterior incubação a 30 °C por 48 h.

2.2.2 Preparo do meio de cultivo para a fermentação submersa

Foram empregados o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farinha de triticale (FT) como substratos da fermentação submersa, de acordo com a metodologia de Rodrigues [14], com adaptações. A proporção entre os substratos foi 80% de FT e 20% de BCA (m/m), escolhida a partir de testes preliminares realizados pelo grupo de pesquisa. O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar a 50 °C durante 72 h. Após, foi triturado em liquidificador industrial e peneirado a fim de diminuir sua granulometria. Os grãos de triticale também foram triturados em liquidificador industrial para redução do tamanho de partícula.

Os meios de cultivo foram preparados através da adição de 80 g de FT e 20 g de BCA em 1 L de água destilada. Essa suspensão foi submetida, conforme a necessidade prevista no delineamento experimental apresentado na Tabela 1, à sonicação por 600 segundos, com ciclos de 30 segundos de sonicação (150 W) e 10 segundos de repouso. A temperatura da suspensão foi controlada com o auxílio de um béquer com gelo. Após, a suspensão foi mantida em repouso durante 2 h e conduzido à cocção durante 30 minutos a 90±2 °C. Posteriormente, o meio foi filtrado para a remoção dos sólidos e foi adicionada a solução de micronutrientes, composta de 2 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,225 g de $CaCl_2$ e 10 $mL.L^{-1}$ de solução traço (0,63 $mg.L^{-1}$ de $FeSO_4.7H_20$, 0,01 $mg.L^{-1}$ de $MnSO_4$, e 0,62 $mg.L^{-1}$ de $ZnSO_4$).

De acordo com o delineamento experimental, foi adicionada a fonte de carbono simples (glicose) e a fonte suplementar de nitrogênio ($NaNO_3$ ou $(NH_4)_2SO_4$). O pH do meio foi medido em pHmetro digital e ajustado conforme necessidade através da adição de NaOH 1 $mol.L^{-1}$ e CH_3COOH 1 $mol.L^{-1}$. Ao final, o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos e resfriado a temperatura ambiente para utilização.

2.2.3 Condução das fermentações submersas

Após o preparo do meio de cultivo esterilizado, foi inoculado 10% da suspensão do pré-inóculo das bactérias com absorbância de 0,8 em comprimento de onda de 610 nm ($\lambda 610 = 0{,}800$).

A primeira fermentação submersa foi conduzida ao longo de 7 dias em Erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio de cultivo, com as condições definidas no delineamento experimental de Plackett-Burman. Os biorreatores foram mantidos em incubadora a 30 °C com agitação de 100 rpm. Foram realizadas amostragens de 30 mL nos tempos 0, 24, 72, 120 e 168 h as quais foram filtradas em algodão para a remoção de sólidos particulados e obtenção dos extratos enzimáticos, submetidos à determinação das atividades amilolítica e celulolítica. Todas as determinações analíticas foram realizadas em duplicata.

Após a avaliação da cinética de produção de amilases e celulases e dos efeitos obtidos para as sete variáveis estudadas no delineamento experimental, foi realizada a segunda fermentação submersa, a fim de definir a concentração ótima da fonte de nitrogênio e a bactéria para maior produção enzimática. As variáveis que não apresentaram significância segundo a análise estatística da primeira fermentação foram fixadas. Os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Condições dos experimentos realizados na segunda fermentação.

Experimentos	Bactéria	Concentração de sulfato de amônio
1	-1 (A)	-1 (0,25%)
2	-1 (A)	+1 (0,50%)
3	+1 (B)	-1 (0,25%)
4	+1 (B)	+1 (0,50%)

2.3 Determinações Analíticas

2.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade amilolítica foi determinada a partir da quantificação de açúcares redutores liberados durante a sacarificação enzimática do amido, utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [25]. Para tal, 1 mL do extrato enzimático foi adicionado em 4 mL de solução de amido a 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 mol.L^{-1} em pH 7,0. A mistura foi incubada em banho termostático por 30 minutos a 37 °C. Após, foi realizada a inativação das enzimas com adição de 1 mL de NaOH 1 mol.L^{-1} e aquecimento a 100 °C por 1 minuto.

A atividade celulolítica foi determinada a partir da quantificação de açúcares redutores liberados durante a sacarificação enzimática de carboximetilcelulose (CMC). Assim, 1 mL do extrato enzimático foi adicionado em 1 mL de CMC a 1% (m/v) em tampão citrato 50 mM em pH 4,8. A mistura foi incubada em banho termostático por 30 minutos a 50 °C. Ao final, a reação de hidrólise foi paralisada com a adição de 1 mL de NaOH 1 mol.L^{-1} e aquecimento a 100 °C por 1 minuto.

A determinação dos açúcares redutores liberados durante a sacarificação enzimática do amido e CMC foi realizada a partir da adição de 1 mL de reagente DNS e 1 mL de NaOH 1 mol.L^{-1} em 1 mL do hidrolisado. Essa mistura foi mantida em banho termostático a 100 °C por 5 min e posteriormente resfriada em banho de gelo por 5 min. Os tubos foram avolumados para um total de 10 mL com água destilada e a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 546 nm. Os dados foram quantificados utilizando uma curva analítica pré-estabelecida para glicose anidra, com concentrações variando de 0 a 2 g/L, representada pela equação ($y = 0{,}5626x - 0{,}0049$), com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9893.

Para ambas as determinações de atividade enzimática, uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de açúcares redutores (AR) liberados por mL do extrato enzimático a cada minuto (caracterizado como U=μmolAR.mL^{-1}.min^{-1}), sob as condições dos métodos propostos. As atividades amilolíticas e celulolíticas foram calculadas através da Eq. (1) [26]:

$$AE = \frac{[AR]}{MM \times t} \tag{1}$$

Sendo:

AE: a atividade enzimática;
[AR]: a concentração de açúcares redutores (mg.mL^{-1});
MM: a massa molar da glicose (mg.μmol^{-1});
t: o tempo de reação (min).

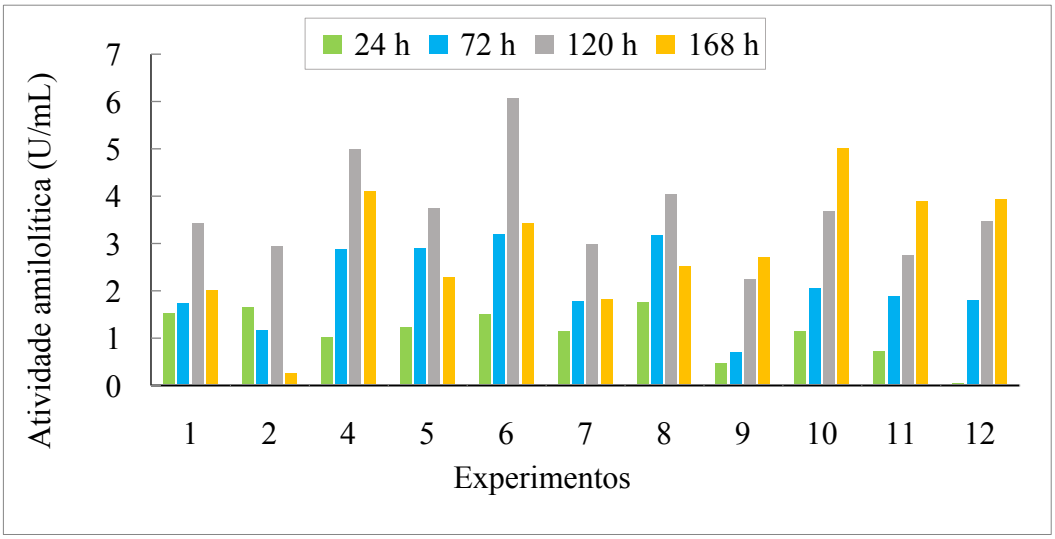
2.4 Tratamento De Dados

Os resultados de atividade amilolítica e atividade celulolítica ao longo do tempo de fermentação foram subtraídos dos valores apresentados no tempo inicial (0 h). As atividades enzimáticas máximas foram avaliadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), sendo calculados os efeitos estimados para as sete variáveis estudadas.

3 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da Condição Ótima de Produção de Amilases e Celulases

O acompanhamento da cinética de produção de enzimas amilolíticas e celulolíticas foi realizado nos tempos 24, 72, 120 e 168 h. A atividade enzimática amilolítica está apresentada na Fig. 1.



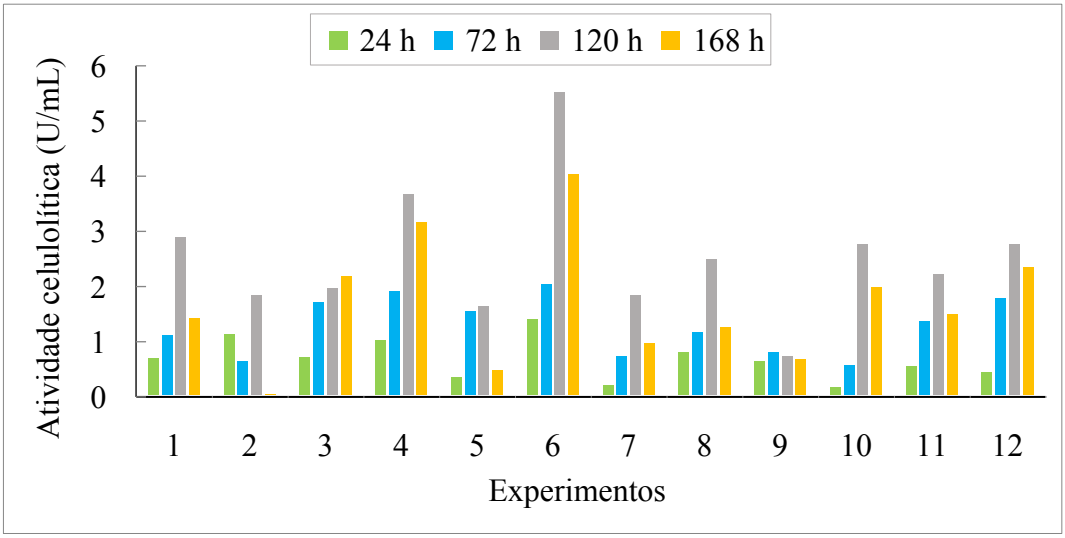
Resultados expressos como média±desvio padrão

Figura 1: Atividade amilolítica avaliada ao longo da fermentação submersa.

Conforme observado, houve uma tendência de aumento da atividade amilolítica (AA) ao longo do tempo de fermentação, sendo os menores resultados no tempo inicial e um pico de AA em 120 h para os experimentos 1 a 8 e 168 h para os experimentos 9 a 12. Essa tendência de aumento na produção enzimática ao longo do tempo foi verificada em trabalhos anteriores [27-29], e é relacionada com o crescimento microbiano. Nos tempos iniciais, ocorre a fase de latência, com baixa produção enzimática, visto a adaptação inicial do microrganismo ao meio de cultivo, com posterior aumento da atividade enzimática durante a fase de crescimento exponencial. Nos tempos finais, a redução de AA observada nos experimentos 1 a 8 pode estar relacionada com o esgotamento de nutrientes ou síntese de inibidores enzimáticos [14, 29]. Destaca-se os experimentos 4 e 6, que, entre os ensaios, apresentaram as maiores atividades enzimáticas no tempo de 120 h (respectivamente 5,00 U/mL e 6,08 U/mL) e os experimentos 10, 11 e 12, com maiores atividades em 168 h (5,01 U/mL, 3,89 U/mL e 3,94 U/mL, respectivamente).

A produção de enzimas é induzida pela presença de nutrientes e do substrato utilizado no processo fermentativo [14]. Dessa forma, a presença de farinha de triticale visa a indução da excreção de enzimas degradantes do amido pelas bactérias estudadas. Assim, o elevado teor de amido presente na farinha de triticale, entre 66 e 73% [30], pode ser considerado um indutor para a produção dessas enzimas. Além disso, é relatado que as fibras afetam positivamente o crescimento microbiano e a síntese enzimática [29]. Sendo o bagaço de cana-de-açúcar composto de, em média, 11 a 13% de fibras, pode-se levantar a hipótese de que este substrato é igualmente promissor como substrato para a produção de enzimas.

Os resultados da atividade enzimática celulolítica para os experimentos realizados estão apresentados na Fig. 2.



Resultados expressos como média±desvio padrão.

Figura 2: Atividade celulolítica avaliada durante a fermentação submersa.

Semelhante à produção de enzimas amilolíticas, os resultados de atividade celulolítica apresentaram uma tendência de aumento ao longo do tempo, com pico em 120 h. Da mesma forma, este comportamento é característico de uma curva de crescimento microbiano, com a fase de latência/adaptação e baixa produção enzimática, sucedida por uma fase exponencial de crescimento com maior produção de enzimas. Por fim, o declínio da atividade enzimática pode ser atribuído à formação de metabólitos inibidores e/ou esgotamento nutricional [14]. Entretanto, a atividade enzimática celulolítica foi menor em comparação à atividade amilolítica para os mesmos ensaios. O experimento 6 apresentou a maior atividade celulolítica tanto em 120 h (5,52 U/mL), quanto no tempo de 168 h (4,03 U/mL) entre todos os experimentos. A composição hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar pode favorecer a produção enzimática, visto que, por ser uma estrutura bastante complexa, há a indução na excreção de enzimas degradantes desse substrato a fim de tornar um nutriente assimilável pelo microrganismo [24]. Ademais, há a presença de celulose e hemicelulose nas cascas dos grãos de triticale, o que também favorece a secreção dessas enzimas [29].

O crescimento de microrganismos e a secreção de enzimas são afetados por fatores como temperatura, pH, composição e disponibilidade nutricional do meio de fermentação. Portanto, o meio de fermentação e as condições de crescimento precisam ser otimizados a fim de se obter uma maior produção de enzimas de interesse. Para isso, foram avaliados os efeitos estimados das variáveis estudadas neste trabalho, a partir da análise dos resultados das atividades enzimáticas apresentadas em 120 h subtraídas da atividade enzimática inicial. Os efeitos das variáveis para a produção de enzimas amilolíticas estão apresentados na Tabela 4. A Tabela 5 mostra os efeitos estimados para a produção de enzimas celulolíticas, avaliados a partir da atividade celulolítica máxima.

Tabela 4 - Efeitos estimados das variáveis estudadas no delineamento experimental para a produção de enzimas amilolíticas.

Variável	Efeitos estimados	Nível de significância (p)
Bactéria (X1)	1,094	0,005
pH (X2)	-0,086	0,801
Fonte N (X3)	0,925	0,014
N% (X4)	-0,214	0,532
Glicose (X5)	0,338	0,328
Micronutrientes (X6)	0,377	0,275
Pré-tratamento (X7)	-0,315	0,361

Tabela 5 - Efeitos estimados das variáveis estudadas no delineamento experimental para a produção de enzimas celulolíticas.

Variável	Efeitos estimados	Nível de significância (p)
Bactéria (X1)	1,080	0,003
pH (X2)	-0,117	0,705
Fonte N (X3)	0,945	0,007
N% (X4)	-0,778	0,021
Glicose (X5)	0,258	0,410
Micronutrientes (X6)	0,533	0,099
Pré-tratamento (X7)	0,020	0,949

A Fig. 3 apresenta o diagrama de Pareto com o valor absoluto dos efeitos estimados das variáveis estudadas na produção amilolítica. Os resultados obtidos a partir do desenvolvimento do delineamento de Plackett-Burman indicaram as variáveis bactéria (X1) e fonte de nitrogênio (X3) como fatores significantes para a produção de enzimas amilolíticas ($p<0,05$). A Tabela 6 e a Fig. 6 mostram que ambos os fatores apresentaram efeito positivo, indicando que as maiores produções amilolíticas foram obtidas no nível superior, sendo a bactéria B como microrganismo e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Sabe-se que o tipo de microrganismo e a suplementação de nitrogênio são alguns dos parâmetros que influenciam na síntese de enzimas, o que corrobora com os resultados obtidos [2, 31]. Em relação ao sulfato de amônio apresentar influência significativa para a produção amilolítica em comparação ao nitrato de sódio, pode-se discutir sobre a concentração molar de nitrogênio nesses sais. A molécula de sulfato de amônio possui dois mols de nitrogênio ($(NH_4)_2SO_4$), em comparação à molécula de nitrato de sódio ($NaNO_3$), que possui apenas um mol de nitrogênio. Como a suplementação da fonte de nitrogênio foi realizada em porcentagem, verifica-se que a suplementação utilizando sulfato de amônio foi maior, o que pode ter influenciado positivamente para a maior produção enzimática. A utilização da fonte de nitrogênio apropriada é crucial para o processo fermentativo, visto que esse nutriente favorece diretamente o crescimento celular e é um dos principais constituintes enzimáticos [32]. Assim como nesse estudo, foi observado que a adição de sulfato de amônio favoreceu a síntese de enzimas lipolíticas [33] e já foram obtidas maiores atividades proteolíticas a partir da suplementação de $(NH_4)_2SO_4$, demonstrando ser uma fonte de nitrogênio adequada para a produção de enzimas [34]. Além disso, a utilização de sulfato de amônio é eficaz para a síntese de enzimas devido ao sulfato ser necessário para a síntese de aminoácidos, tendo atividade direta na síntese de proteínas [35].

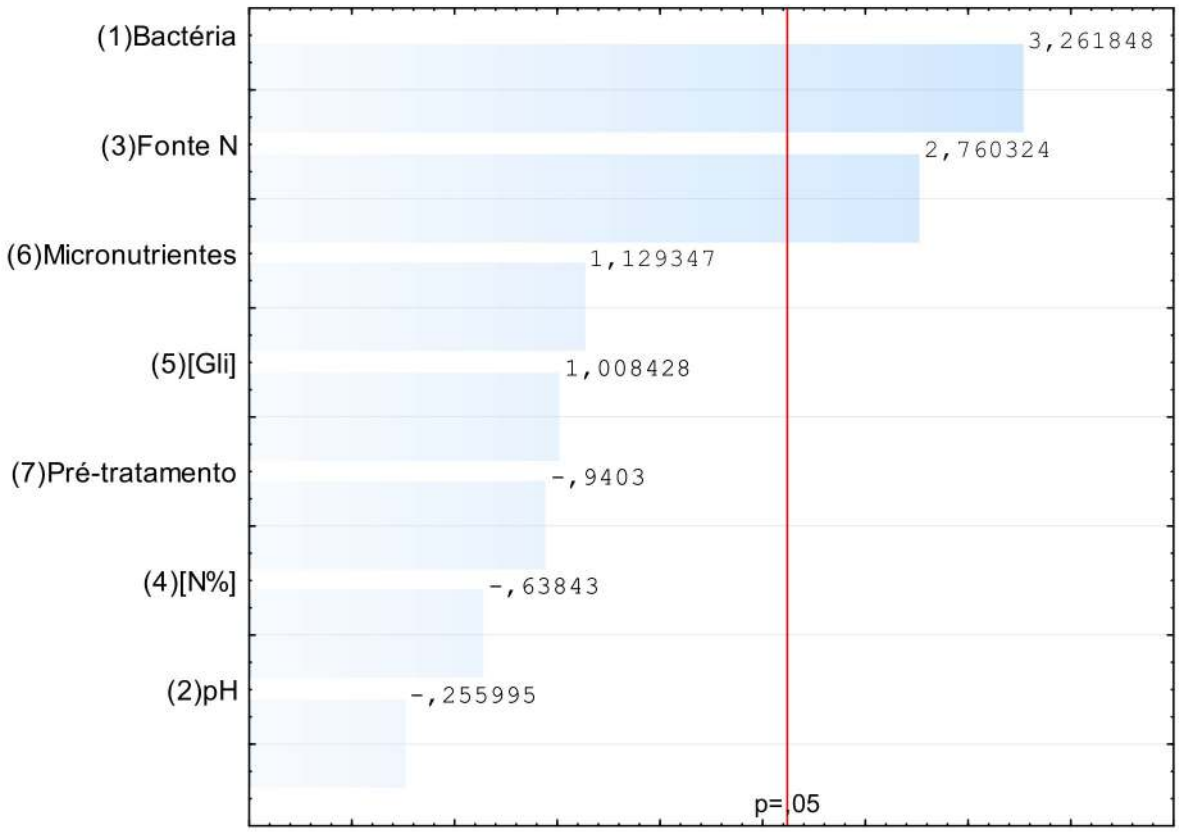


Figura 3: Diagrama de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a atividade amilolítica máxima.

A Fig. 4 apresenta o Diagrama de Pareto com o valor absoluto dos efeitos estimados para a produção celulolítica.

Pode-se verificar que, assim como para a produção amilolítica, as variáveis bactéria e fonte de nitrogênio foram significativas ($p<0,05$) para a síntese de enzimas celulolíticas, com efeito positivo, demonstrando que a bactéria B e a suplementação de sulfato de amônio influenciaram positivamente a produção enzimática, corroborando com os resultados anteriores. Sabe-se que os ambientes dos quais os microrganismos são isolados desempenham um papel crítico nas características que expressam [36]. A bactéria B utilizada neste estudo foi isolada de bagaço de cana-de-açúcar, o que pode ter conferido os melhores resultados em relação à produção celulolítica, já que os genes responsáveis pela excreção de celulases são influenciados pelo ambiente em que a cepa foi isolada [36].

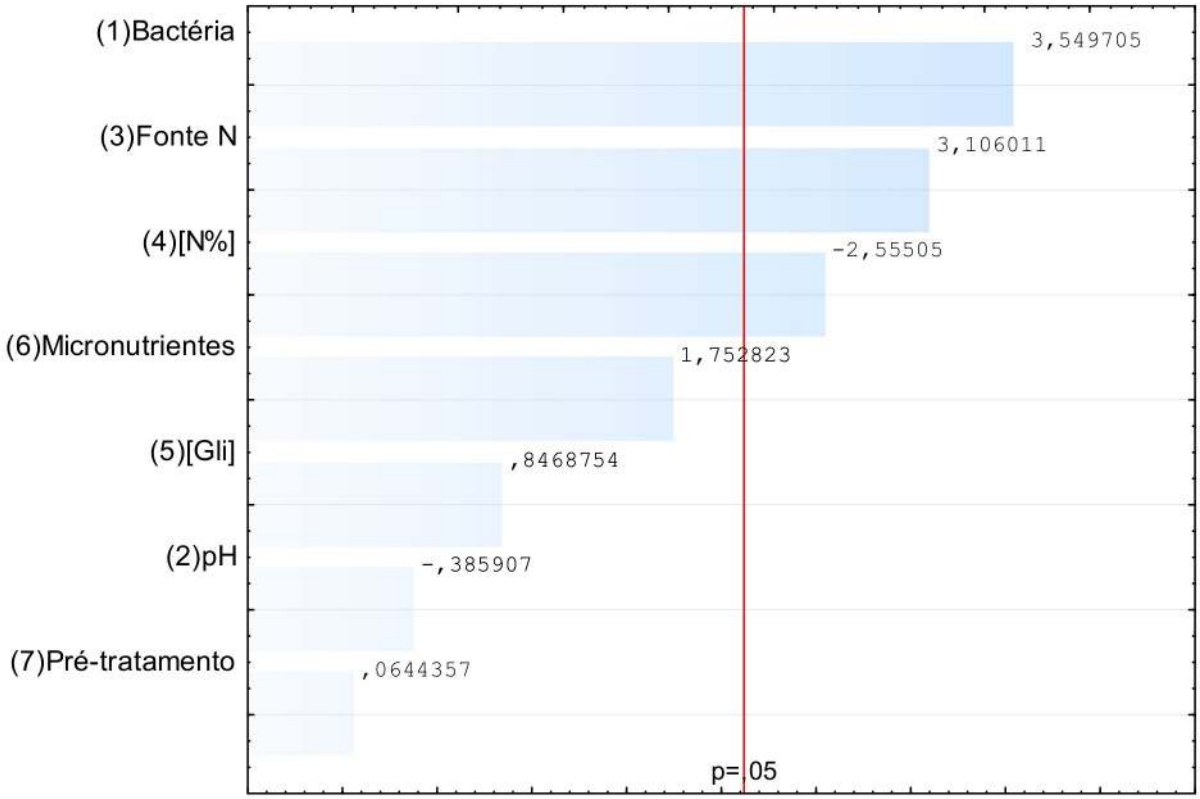


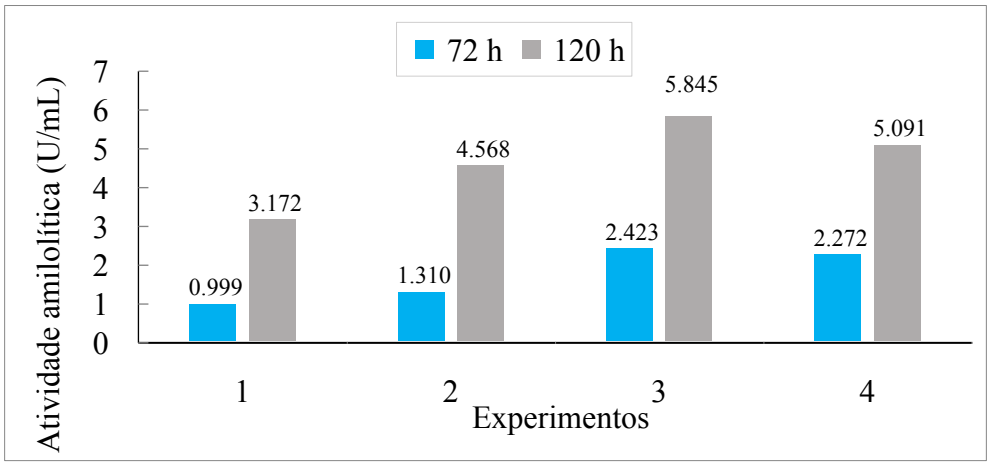
Figura 4: Diagrama de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a atividade celulolítica máxima.

Além disso, a concentração da fonte de nitrogênio também apresentou influência significativa ($p<0,05$), porém com efeito negativo, indicando que o nível baixo dessa variável (0,25%) foi mais eficaz. Corroborando com esses resultados, o experimento 6, que apresentou os maiores valores de AC durante a fermentação, apresentava esses três fatores em seus níveis ótimos. A avaliação da utilização do bagaço de cana-de-açúcar em estudos anteriores demonstrou que o pré-tratamento adequado, seja químico, físico ou biológico, desse substrato pode contribuir para a maior exposição da celulose, apresentando maior rendimento na produção de celulases [37, 38]. A composição do material lignocelulósico pode variar entre as matérias-primas, afetando a produção enzimática e que a eficiência de produção depende da composição química do substrato [36]. No entanto, a produção enzimática também depende da digestibilidade da fonte de carbono, que por sua vez está relacionada ao método de pré-tratamento empregado. A principal finalidade do pré-tratamento é aumentar a acessibilidade e digestibilidade da fonte de carbono pelos microrganismos [29]. Entretanto, não foi observada influência significativa no pré-tratamento escolhido, o que pode estar relacionado à ineficiência das condições utilizadas, sendo necessário novos estudos em relação ao tempo e frequência de ultrassom durante o pré-tratamento.

Por fim, após a avaliação dos efeitos dos fatores na produção de amilases e celulases, as variáveis glicose, micronutrientes e pré-tratamento foram fixadas em seu nível baixo e o pH em seu nível alto.

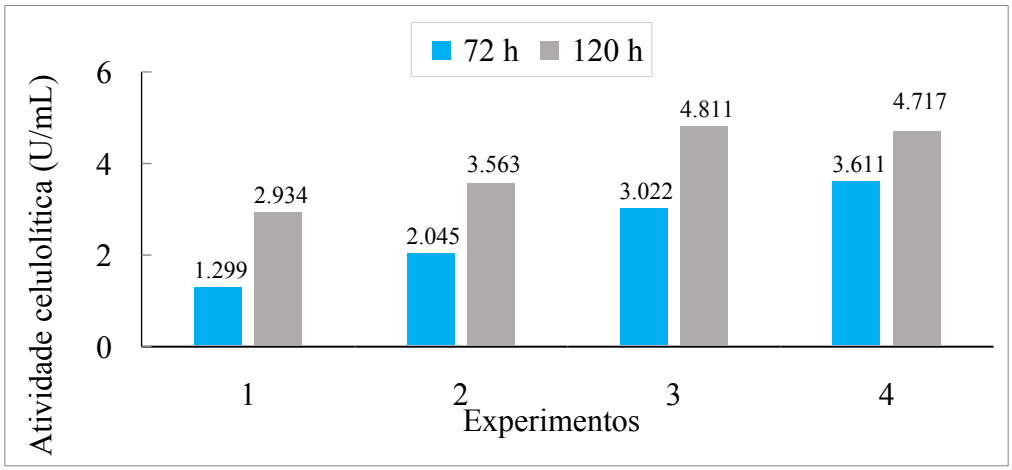
3.2 Determinação das Condições Ótimas para a Produção de Enzimas

Após a avaliação da cinética de produção de amilases e celulases e dos efeitos obtidos para as sete variáveis estudadas, realizou-se uma segunda fermentação submersa, a fim de definir a concentração ótima da fonte de nitrogênio e a bactéria para maior produção enzimática. A fermentação foi mantida durante 5 dias, com amostragens nos tempos 0, 72 e 120 h. Não ocorreu a adição de glicose, pré-tratamento do substrato, nem ajuste de pH do meio de fermentação. Como fonte de nitrogênio, utilizou-se 0,25% e 0,50% de sulfato de amônio. A produção enzimática foi novamente avaliada pelas bactérias A e B, totalizando quatro experimentos. Os resultados para a atividade amilolítica estão presentes na Fig. 5 e para atividade celulolítica na Fig. 6.



Experimento 1: bactéria A e 0,25% de sulfato de amônio. Experimento 2: bactéria A e 0,50% de sulfato de amônio. Experimento 3: bactéria B e 0,25% de sulfato de amônio. Experimento 4: bactéria B e 0,50% de sulfato de amônio. Resultados expressos como média±desvio padrão.

Figura 5: Atividade amilolítica da segunda fermentação.



Experimento 1: bactéria A e 0,25% de sulfato de amônio. Experimento 2: bactéria A e 0,50% de sulfato de amônio. Experimento 3: bactéria B e 0,25% de sulfato de amônio. Experimento 4: bactéria B e 0,50% de sulfato de amônio. Resultados expressos como média±desvio padrão.

Figura 6: Atividade celulolítica da segunda fermentação.

Através da análise da cinética de produção de amilases e celulases para a segunda fermentação, verificou-se que as concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ estudadas (0,25 e 0,50%) não diferiram a um nível de significância de 95%. Dessa forma, visando a diminuição do uso de reagentes químicos e consequentemente no custo de produção dessas enzimas, é preferível a utilização de 0,25% de sulfato de amônio. Além disso, novamente as maiores atividades enzimáticas foram obtidas com a bactéria B como microrganismo da fermentação. A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar as condições ótimas de produção amilolítica e celulolítica.

4 Conclusão

Foi conduzida a fermentação submersa de farinha de triticale e bagaço de cana-de-açúcar a fim de se produzir enzimas amilolíticas e celulolíticas. A combinação do bagaço de cana-de-açúcar e da farinha de triticale mostra-se uma estratégia interessante para a redução de custos com nutrientes na produção de enzimas por fermentação submersa.

Estudou-se a otimização da produção enzimática através do planeamento experimental de Plackett-Burman. Entre os experimentos que apresentaram os melhores resultados de atividade amilolítica, destaca-se o experimento 4 (5,00 U/mL) e 6 (6,08 U/mL). Além disso, o experimento 6 apresentou também a maior atividade celulolítica, com um pico de 5,52 U/mL. As máximas atividades enzimáticas foram obtidas no tempo de 120 h. Neste sentido, a fermentação poderia ser encerrada nesse tempo com uma elevada produção de ambas as enzimas estudadas.

Observou-se que o pH, glicose, concentração da solução de micronutrientes e pré-tratamento do substrato não apresentaram significância na produção de amilases e celulases ($p>0,05$). Dessa forma, essas variáveis foram fixadas para conduzir uma nova fermentação submersa, avaliando novas concentrações de sulfato de amônio. Observou-se que a adição de 0,25% ou 0,50% de $(NH_4)_2SO_4$ não apresentou diferença na síntese enzimática, sendo preferível a concentração de 0,25% de sulfato de amônio a fim de reduzir os custos do processo fermentativo. A bactéria B apresentou a maior produção de enzimas em comparação à bactéria A. A partir disso, foi possível determinar as condições otimizadas para a produção homemade e associada de amilases e celulases bacterianas, sendo a Bactéria B em meio de cultivo com suplementação de 0,25% de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Referências

[1] A. Jukola, "Enzyme recovery with microfiltration: effect of spacer size and improvement of membrane cleaning," Dissertação de Mestrado, School of Engineering Sciences: Chemical Processes R&D, Lappeenranta University of Technology, Finlândia, 2018. Disponível em: https://lutpub.lut.fi/handle/10024/158662

[2] T. Oliveira, "Avaliação Da Produção De Enzimas Celulolíticas Por Fungos Isolados Da Região Dos Campos Gerais", Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Brasil, 2020. Disponível em: http://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/23800

[3] K. C. Lee, W. Y. Tong, D. Ibrahim, T. Arai, Y. Murata, Y. Mori, e A. Kosugi , "Evaluation of Enzymatic Deinking of Non-impact Ink Laser-Printed Paper Using Crude Enzyme from *Penicillium rolfsii* c3-2(1) IBRL," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 181, pp. 451–463, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12010-016-2223-4

[4] B. Danso, S. S. Ali, R. Xie, e J. Sun, "Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase- and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species," *Fuel*, vol. 310, p. 122333, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122333

[5] A. Sidar, E. D. Albuquerque, G. P. Voshol, A. F. J. Ram, E. Vijgenboom, e P. J. Punt, "Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00871

[6] S. Kiran, S. Kumari, A. Singh, C. Prabha, e S. Kumari, "Extracelluar amylase production under submerged fermentation by *Bacillus Subtilis* RK6," *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 8, no. 1, pp. 376-383, 2018. Disponível em: https://www.ijpbs.com/ijpbsadmin/upload/ijpbs_5ad6e1390b158.pdf

[7] A. A. Al Mousa, A. M. A. Hassane, A. E.-R. F. Gomaa, J. A. Aljuriss, N. D. Dahmash, e N. F. Abo-Dahab, "Response-Surface Statistical Optimization of Submerged Fermentation for Pectinase and Cellulase Production by Mucor circinelloides and M. hiemalis," *Fermentation*, vol. 8, no. 5, p. 205, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/fermentation8050205

[8] J. G. W. Siqueira, C. Rodrigues, L. P. de S. Vandenberghe, A. L. Woiciechowski, e C. R. Soccol, "Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review," *Biomass and Bioenergy*, vol. 132, p. 105419, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419

[9] Z. Su, J. Luo, X. Li, e M. Pinelo, "Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation," *Separation and Purification Technology*, vol. 243, p. 116840, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116840

[10] S. Saldarriaga-Hernández, C. Velasco-Ayala, P. L. Flores, M. J. Rostro-Alanis, R. Parra-Saldivar, H. M. N. Iqbal,

e D. Carrillo-Nieves, “Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 161, pp. 1099–1116, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.047

[11] A. Singh, S. Bajar, A. Devi, e D. Pant, “An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 14, p. 100652, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652

[12] P. Leite, D. Sousa, H. Fernandes, M. Ferreira, A. R. Costa, D. Filipe, M. Gonçalves, H. Peres, I. Belo, e J. M. Salgado,, “Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes,” *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 27, p. 100407, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407

[13] L. F. Rojas, P. Zapata, e L. Ruiz-Tirado, “Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy,” *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 34, p. 100585, 2022, Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100585

[14] E. F. Rodrigues, “Produção e purificação de enzimas amilolíticas para hidrólise enzimática de biomassa de Spirulina,” Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil, 2016. Disponível em: http://tede.upf.br:8080/jspui/handle/tede/1350

[15] G. H. Hansen, M. Lübeck, J. C. Frisvad, P. S. Lübeck, e B. Andersen, “Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation,” *Process Biochemistry*, vol. 50, no. 9, pp. 1327–1341, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017

[16] J. Liu , J. Yang, R. Wang, L. Liu, Y. Zhang, H. Bao, J. M. Jang, E. Wang, e H. Yuan, “Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 152, pp. 288–294, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256

[17] D. G. L. Lemos, “Utilização de bagaço de malte da indústria cervejeira para produção de amilase por amostras de Aspergillus spp. isolados de amostras do solo da Caatinga de Pernambuco,” Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2021. Disponível em: http://tede2.unicap.br:8080/handle/tede/1481

[18] R. Sirohi, A. Singh, A. Tarafdar, N. C. Shahi, A. K. Verma, e A. Kushwaha, “Cellulase Production from Pre-treated Pea Hulls Using *Trichoderma reesei* Under Submerged Fermentation,” *Waste Biomass Valorization*, vol. 10, no. 9, pp. 2651–2659, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12649-018-0271-4

[19] S. Bajar, A. Singh, e N. R. Bishnoi, “Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus,*” *Applied Water Science*, vol. 10, no. 6, p. 153, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13201-020-01236-w

[20] G. Janarny e K. D. P. P. Gunathilake, “Changes in rice bran bioactives, their bioactivity, bioaccessibility and bioavailability with solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae*,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 23, p. 101510, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101510

[21] P. Dhaver, B. Pletschke, B. Sithole, e R. Govinden, “Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa,” *Mycology*, vol. 13, no. 4, pp. 271–292, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2079745

[22] B. C. Aita, S. S. Spannemberg, S. Schmaltz, G. L. Zabot, M. V. Tres, R. C. Kuhn, e M. A. Mazutt, “Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 7, no. 3, p. 103193, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193

[23] J. D. Pejin, L. V. Mojović, D. J. Pejin, S. D. Kocić-Tanackov, D. S. Savić, S. B. Nikolić, e A. P. Djukić-Vuković, "Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition," *Fuel*, vol. 142, pp. 58–64, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.077

[24] A. Hemati, M. Nazari, B. Asgari Lajayer, D. L. Smith, e T. Astatkie, "Lignocellulosics in plant cell wall and their potential biological degradation," *Folia Microbiol (Praha)*, vol. 67, no. 5, pp. 671–681. 2022, Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12223-022-00974-5

[25] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ac60147a030

[26] A. Rempel, T. Machado, H. Treichel, E. Colla, A. C. Margarites, e L. M. Colla, "Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes," *Bioresource Technology*, vol. 263, pp. 163–171, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.114

[27] A. S. Qureshi, I. Khushk, C. H. Ali, Y. Chisti, A. Ahmad, e H. Majeed, "Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 8, pp. 146–151, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.006

[28] A. L. C. C. Simões, "Produção de Amilases dor Cultivo em Estado Sólido e Hidrólise Enzimática de Resíduos de Mandioca," Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/21944

[29] R. J. B. Devos, "Produção de enzimas e bioetanol a partir de matérias-primas amiláceas e resíduos de hortifruti," Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil, 2022. Disponível em: http://tede.upf.br:8080/jspui/handle/tede/2204

[30] C. Mori, A. J. Nascimento, e M. Z. Miranda, "Aspectos econômicos e conjunturais da cultura de triticale no mundo e no Brasil," Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do150.htm (acessado em 22 de agosto de 2023).

[31] M. A. Farooq, S. Ali, A. Hassan, H. M. Tahir, S. Mumtaz, e S. Mumtaz, "Biosynthesis and industrial applications of α-amylase: a review," *Archives of Microbiology*, vol. 203, no 4, pp. 1281–1292, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y

[32] F. A. Santos, L. C. T. Carvalho-Gonçalves, A. L. C. Cardoso-Simões, e S. F. M. Santos, "Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates," *Bioresource Technology Reports*, vol. 14, p. 100648, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648

[33] E. M. Penha, L. A. N. Viana, L. M. F. Gottschalk, S. C. Terzi, E. F. Souza, S. C. Freitas, J. O. Santos, e T. F. C. Salum, "Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*," *Ciência Rural*, vol. 46, no 4, pp. 755–761, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131673

[34] J. Furhan, N. Salaria, M. Jabeen, e J. Qadri, "Partial purification and characterisation of cold-active metalloprotease by Bacillus sp. Ap1 from apharwat peak, kashmir," *Pakistan Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 47–54, 2019. Disponível em: https://pjbt.org/index.php/pjbt/article/view/48

[35] P. Biswas, A. K. Bharti, A. Kadam, e D. Dutt, "Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper," *Bioresources*, vol. 14, no 3, pp. 5788–5806, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.15376/biores.14.3.5788-5806

[36] O. C. Amadi, E. J. Egong, T. N. Nwagu, G. Okpala, C. O. Onwosi, G. C. Chukwu, B. N. Okolo, R. C. Agu, e A. N. Moneke, "Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by

Saccharomyces cerevisiae SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design," *Heliyon*, vol. 6, no 7, p. e04566, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566

[37] V. M. Vasconcellos, P. W. Tardioli, R. L. C. Giordano, e C. S. Farinas, "Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems," *Process Biochemistry*, vol. 50, no 11, pp. 1701–1709, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.011

[38] N. Srivastava, A. Mohammad, R. Singh, M. Srivastava, A. Syed, D. B. Pal, A. M. Elgorban, P. K. Mishra, e V. K. Gupta, "Evaluation of enhanced production of cellulose deconstructing enzyme using natural and alkali pretreated sugar cane bagasse under the influence of graphene oxide," *Bioresource Technology*, vol. 342, p. 126015, 2021, Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126015