



BIOPROCESSOS: PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E IMOBILIZAÇÃO PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

LETÍCIA OLIVEIRA SANTANA; JESSICA FERREIRA DE ALMEIDA; RAYNNE OLIVEIRA ALVES; NAYÁRA BEZERRA CARVALHO; ALEX FERNANDO DE ALMEIDA

RESUMO

É crescente a busca de alternativas sustentáveis no meio industrial alinhados aos critérios estabelecidos pela química verde. Diante disso, na tecnologia enzimática emerge destaca-se os microrganismos para a produção de enzimas por meio de processos fermentativos, enfatizando os avanços tecnológicos e as estratégias de otimização desse método. Além disso, a importância da imobilização de enzimas como uma abordagem promissora para aumentar a estabilidade térmica e química, possibilidade de reutilização dessas biomoléculas, facilidade de separação, controle de velocidade da reação, melhoria da seletividade, aplicação em reatores contínuos e compatibilidade em diferentes meios reacionais, promovendo então processos de catálise seguros, seletivos e sustentáveis, culminando em resultados industriais notáveis. Neste contexto, o presente trabalho objetivou realizar uma revisão bibliográfica abrangente sobre a aplicação de enzimas como biocatalisadores, abordando os microrganismos na produção de enzimas por fermentação, a imobilização de enzimas por diferentes técnicas e a aplicação industrial de enzimas imobilizadas. O estudo qualitativo buscou meios de fundamentação teórica nas renomadas revistas acadêmicas científicas disponíveis on-line a partir do ano de 2018, realizando a coleta, análise, interpretação, comparação, síntese e apresentação dos dados encontrados nas fontes consultadas. Conclui-se, com uma análise crítica dos avanços recentes, a importância de oferecer insights constantes sobre futuras tendências na área, destacando perspectivas promissoras para a evolução tecnológica e aplicações inovadoras no campo da biotecnologia enzimática.

Palavras-chave: biotecnologia; biocatálise; fermentação; indústria de alimentos.

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, a fermentação foi simplificada e definida; no entanto, à medida que o entendimento dessa prática evoluiu, tornou-se evidente que o processo fermentativo não se limita apenas a um mecanismo anaeróbio de produção. Em vez disso, revelou-se como a utilização estratégica de microrganismos capazes de se reproduzir a partir de fontes de nutrientes específicas, resultando na produção de substratos, incluindo a notável produção de enzimas. Os bioprocessos fermentativos, por sua vez, representam a ação intrínseca de microrganismos, destacando-se bactérias, leveduras, fungos e outros agentes, na conversão de substratos ou bioprodutos. Essa abordagem tem se destacado como uma técnica amplamente empregada na fabricação de uma variedade de produtos, englobando desde produtos químicos até alimentos e medicamentos (MARTIN e LINDNER, 2022).

As enzimas são responsáveis pela vida celular, sendo o pilar dos processos fermentativos, tendo algumas origens, como animal, vegetal e microbiano. Usualmente,

para obter uma produção de larga escala em um curto período de tempo, as de origem microbiana são as mais utilizadas, já que possuem um alto crescimento e apresentam vantagens aos vegetais e animais, como custos baixos de produção. Ademais, o processo enzimático mais utilizado da história da sociedade humana é a fermentação (SILVA, et al, 2020). A imobilização de enzimas surgiu como alternativa à utilização de enzimas na forma livre, está em constante evolução aplicada à indústria de alimentos e se faz necessário o desenvolvimento gradual para a utilização de enzimas em novos processos com novas metodologias a fim de uma melhor compreensão das técnicas atuais (SANTIAGO *et. al.*, 2021).

O emprego de enzimas na indústria alimentícia vai além, proporcionando melhorias na qualidade, textura, sabor, cor e otimização de tempo, resultando em processos de fabricação mais rápidos e alimentos de maior durabilidade. Além disso, a característica de reutilização dessas moléculas permite que permaneçam intactas após a reação, catalisando múltiplos reagentes antes de sua degradação, resultando em economia de reagentes, tempo e energia - aspectos cruciais na eficiência industrial (RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Neste contexto, o trabalho tem como objetivo compactar, transmitir e comparar informações acerca do tema produção e imobilização de enzimas para a indústria de alimentos, identificando as especialidades atuais ao comparar informações de diferentes fontes da literatura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é uma revisão da literatura, realizada no período de novembro à dezembro de 2023, englobando estudos que abordam enzimas, processos fermentativos, imobilização de enzimas, e aplicação na indústria de alimentos, que foram publicados entre 2018 e 2023. Para tanto, trabalhos acadêmicos e científicos pesquisados estão divulgados nas bases de dados SciELO, Scopus, Science Direct, Redalyc, Periódico Capes e Google Acadêmico. Foram aplicados os indexadores em português e inglês (microrganismos; bactérias; leveduras; fungos; enzima; enzimas; produção de enzima, fermentação; produção de enzimas por fermentação; imobilização de enzimas; adsorção física; ligação covalente; encapsulamento; aplicação industrial de enzimas; biocatalisadores imobilizados; produção de biocatalisadores). Após a identificação do material que continha os descritores acima relacionados, seguindo um método rigoroso de busca e seleção de pesquisas, prosseguiu-se para avaliação da relevância e validade das pesquisas encontradas, coleta, síntese e interpretação dos dados oriundos dos trabalhos, a fim de se tecer algumas considerações acerca do objeto de estudo desta pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das referências que abordavam o tema em questão, 56 foram analisadas, das quais, 33 foram excluídas através das leituras seletiva e analítica por não se adequarem ao objetivo do presente estudo. Dos 23 artigos selecionados (1 publicado em 2018, 2 em 2019, 2 em 2020, 7 em 2021, 5 em 2022 e 6 em 2023) foi realizada a apresentação abaixo como resultados, os que tem sido divulgado na literatura referente ao subtema da área de estudo como os tópicos: microrganismos na produção de enzimas; produção de enzimas por fermentação; imobilização de enzimas; aplicação industrial de enzimas.

Microrganismos na Produção de Enzimas: As principais fontes de fabricação de enzimas são os microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos. A partir destes são produzidas enzimas como as proteases, amilases e lipases (SOARES, 2021). Segundo Silva *et al* (2020), as fontes microbianas são as mais utilizadas, e baseando-se no uso recorrente dos microrganismos para produção de enzimas se encontram bactérias do

gênero *Bacillus*. No âmbito da produção de enzimas, a escolha dos microrganismos seguros se torna crucial, já que conter alta capacidade de síntese e resistência a condições de temperaturas diversas é um diferencial. A seleção de microrganismos na produção de enzimas envolve a sua identificação, onde podem ser encontrados a partir de fontes como o solo, água e plantas, ou na transformação de resíduos e subprodutos (RIGO *et al.*, 2021).

A produção se inicia no isolamento do microrganismo, com base nas propriedades de sintetizar e excretar a enzima desejada, e em sua capacidade de crescer e se reproduzir em ambientes de cultivo controlado com meios de cultura apropriados fornecendo os nutrientes necessários, além de condições como temperatura e pH, para otimizar a produção das enzimas (RIGO *et al.*, 2021). Após o microrganismo produzir as enzimas, é feita a purificação que pode possuir várias etapas, como filtração, precipitação e cromatografia, dependendo do tipo de enzima e do meio de cultura utilizado. Ademais, este processo requer a otimização das condições de crescimento e produção, como meios de cultura apropriados, temperatura, pH, entre outros fatores. A fase da otimização dos parâmetros experimentais desempenha um papel fundamental em empreendimentos científicos e tecnológicos, sendo uma prática essencial logo no início da pesquisa.

Produção de Enzimas por Fermentação: Existem dois processos fermentativos que são comumente utilizados para produção de enzimas, em estado sólido (FES) e submerso (FS). A FES é um processo de crescimento microbiano em um substrato sólido e de baixo custo, utilizando pouca água e algumas vezes nenhuma água (NEMA *et al.*, 2019). A FS é mais utilizada pela possibilidade de utilização em escala industrial (HUSSEN *et al.*, 2018).

De acordo com o estudo sobre a produção de lipase por *Aspergillus niger* em (FES), realizado por NEMA *et al.* (2019). Foi investigado o efeito de diferentes variáveis, como substrato pH, temperatura, aeração e concentração de esporos. Concluiu-se que o substrato, que consistia em uma mistura de casca de arroz, semente de algodão e casca de grama vermelha, foi o mais adequado. Além disso foi observado uma temperatura ideal de 40°C, pH ideal de 6,0, concentração de esporos de 5,4 milhões por mL e a aeração não possuiu efeito significativo na produção das lipases.

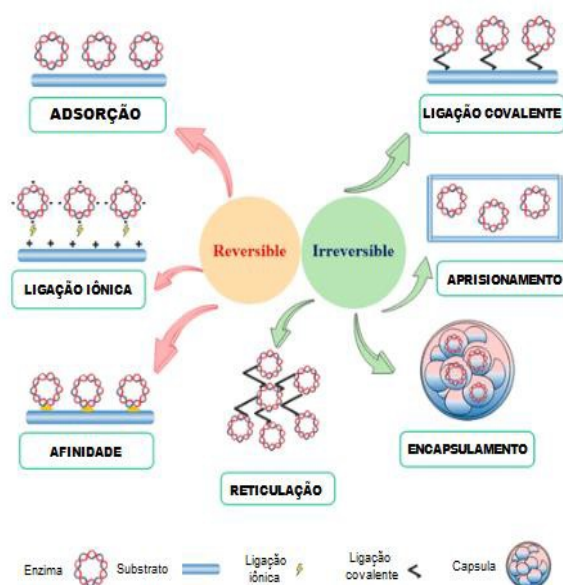
Já o estudo realizado por HUSSEIN *et al.* (2018). Foi feita a produção de enzimas hemicelulolíticas através seis fungos isolados diferentes empregando a (FS), que consistiu na utilização de xilana de sabugo de milho como fonte de carbono e na estimulação da produção enzimática em diferentes períodos da incubação. Foram analisados fatores como fonte de carbonos e nitrogênio, concentração de nutrientes, pH, temperatura, agitação e o tamanho do inóculo. Obteve-se os resultados de 150 rpm e temperatura de 30°C como parâmetros para a produção da enzima xilanase. Também foi observado que a escolha da (FS) pode permitir um maior rendimento, porém existe o risco de contaminação pois envolve a reposição do meio nutriente e a análise em intervalos regulares.

Imobilização de Enzimas: A imobilização enzimática é um processo que envolve a fixação de enzimas em um suporte, onde permite que as enzimas imobilizadas, também conhecidas como biocatalisadores, sejam recuperadas facilmente e reutilizadas. Essas apresentam maior resistência às mudanças das condições dos processos em comparação às enzimas livres (BADGUJAR *et al.*, 2022). As indústrias têm apresentado um notável interesse no desenvolvimento de novas abordagens eficientes para imobilizar enzimas, com foco no melhoramento da eficiência catalítica e reutilização. É uma estratégia com intuito de reduzir a perda das enzimas livres, solucionando os problemas com o alto custo e atendendo à alta demanda por enzimas em diversos processos industriais através da sua reutilização (BHARDWAJ *et al.*, 2023).

As técnicas mais utilizadas para imobilizar enzimas se diferenciam em físicos (encapsulamento e adsorção) e químicos (ligação covalente e reticulação). Os métodos

também podem ser divididos em reversíveis que incluem adsorção, ligação iônica e ligação por afinidade, e irreversíveis que incluem ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e reticulação, como esquematizado na Figura 1 (NUNES *et al.*, 2021; MAGHRABY *et al.*, 2023). Existem diferentes técnicas e tipos de suporte para a imobilização de enzimas, que variam de acordo com o método e o processo (BHARATI *et al.*, 2023). O tipo de material utilizado nos suportes pode ser dividido em orgânicos, como a agarose e a quitosana, e inorgânicos, como o sílico, o metacrilato e o poliestireno. Também é possível aumentar a eficiência do suporte utilizando ativadores, como o glutaraldeído, a divinil sulfona, os líquidos iônicos e a epícloridrina (NUNES *et al.*, 2021; BENÍTEZ-MATEOS e CONTENTE, 2021; PINHEIRO *et al.*, 2019).

Figura 1. Diagrama ilustrando os principais métodos de imobilização enzimática.



Fonte: MAGHRABY *et al.*, 2023.

Com isso, os biocatalisadores apresentam grande vantagem por serem reutilizáveis, assim como podem ser obtidos através de uma ampla gama de espécies apresentam vantagens no âmbito social e ambiental, por apresentarem maior sustentabilidade, economia de custos e não afetarem o meio ambiente (KUO *et al.*, 2022). No entanto, ainda são necessárias melhorias no processo de imobilização, mais pesquisas em busca de novos materiais viáveis, econômicos, com alta capacidade e de fácil preparação, assim como também devem ser sustentáveis (BHARDWAJ *et al.*, 2023).

Aplicações de Biocatalisadores Imobilizados na Indústria de Alimentos: As enzimas imobilizadas apresentam uma ampla gama de aplicações industriais, em especial nas indústrias alimentícias, de detergentes, têxtil e farmacêutica, assim como em estações de tratamento de água (MAGHRABY *et al.*, 2023). Nas últimas décadas houveram avanços na engenharia genética e nas configurações dos biorreatores, o que contribuiu para a utilização das enzimas imobilizadas em diversas áreas industriais (PARREÑAS, 2022). Processos com enzimas imobilizadas em biorreatores permitem uma rápida recuperação dos produtos e das enzimas, onde elas podem ser reutilizadas nos processos enzimáticos contínuos e uma gama mais ampla de designs. Os biorreatores apresentam um papel crucial na produção industrial, por permitirem o cultivo controlado de microrganismos ou de células geneticamente modificadas (BORNFEIT, 2023).

A preservação da atividade enzimática é de suma importância para a operação eficaz do reator, especialmente quando as enzimas são suscetíveis à instabilidade. A

imobilização não apenas pode aumentar a eficiência, mas também simplifica significativamente a recuperação das enzimas, permitindo seu reuso contínuo. Além disso, ao utilizar enzimas imobilizadas, o projeto do biorreator ganha em versatilidade, possibilitando a realização de diversas otimizações no processo. Esse método flexível oferece oportunidades para melhorias contínuas (SENSHARMA *et al.*, 2023).

No trabalho de Benucci *et al.* (2020) a protease alcalina foi imobilizada por reticulação com quitosana e foi utilizada para eliminar o glúten da cerveja. A imobilização aumentou a eficácia da enzima na redução do teor de glúten da cerveja original, após 10 horas de tratamento, de 65 mg/kg para 15 mg/kg. Na pesquisa de Guan *et al.* (2021), observaram que nanotubos feitos de α -lactalbumina foram utilizados como veículos para as lipases, permitindo a liberação de quantidades substancialmente maiores (cerca de 1,5 vezes mais) de ácidos graxos livres em comparação com as enzimas livres, ou seja, nos queijos com baixo teor de gordura, os nanotubos contendo lipase demonstraram uma liberação de ácidos graxos livres duas vezes maior em comparação com os queijos comuns de baixo teor de gordura. Isso resultou em produtos finais com teor de gordura semelhante ao do leite, proporcionando um queijo com reduzido teor de gordura e ao mesmo tempo, apresentando um sabor aprimorado.

Avanços Tecnológicos e Futuras Tendências: Avanços tecnológicos têm impulsionado consideravelmente o uso de enzimas imobilizadas na indústria de alimentos, proporcionando melhorias substanciais na eficiência, qualidade e segurança dos produtos. Essas inovações abrem portas para possíveis aplicações futuras, transformando a forma como os alimentos são processados e oferecendo soluções para desafios específicos do setor.

Uma das tendências emergentes é a microencapsulação de enzimas. Essa técnica envolve a incorporação das enzimas em materiais de revestimento, garantindo proteção adicional durante o armazenamento e processamento dos alimentos. A microencapsulação pode viabilizar o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos, oferecendo benefícios adicionais à saúde dos consumidores (MAGHRABY *et al.*, 2023).

Outro avanço promissor reside na aplicação da nanotecnologia na imobilização de enzimas. Nanomateriais como nanotubos, nanopartículas e nanofibras proporcionam uma área de superfície maior, permitindo maior eficiência na imobilização e controle preciso das propriedades dos suportes enzimáticos. Isso pode resultar em reações enzimáticas otimizadas e aprimoramento significativo na produção de alimentos. Essas tecnologias têm potencial para aplicações específicas em processos alimentares. A imobilização de enzimas pode ser direcionada para reduzir o teor de gordura, melhorar a textura, eliminar alérgenos ou desenvolver alimentos saudáveis de maneira mais eficiente (GUAN *et al.*, 2021).

Essas aplicações têm o objetivo de atender às crescentes demandas dos consumidores por produtos alimentícios mais saudáveis e de alta qualidade. No entanto, alguns desafios precisam ser superados para a plena integração dessas tecnologias na indústria de alimentos. A estabilidade e a preservação da atividade enzimática durante longos períodos são questões críticas, assim como questões relacionadas ao custo também é importante, pois materiais de suporte de baixo custo são fundamentais para a viabilidade econômica dessas tecnologias. Encontrar métodos de imobilização que mantenham a atividade da enzima, especialmente em condições adversas de processamento, é essencial. Estabelecer normas e regulamentos para garantir a segurança e qualidade dos alimentos produzidos com enzimas imobilizadas é essencial para sua ampla adoção.

Em resumo, as perspectivas futuras para o uso de enzimas imobilizadas na indústria alimentícia são promissoras, mas superar desafios relacionados à estabilidade,

escalabilidade de produção e aceitação regulatória e do consumidor é fundamental para sua integração efetiva e bem-sucedida no setor.

4 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho torna-se de grande importância para os profissionais da área de biotecnologia. A pesquisa também contribui para a comunidade acadêmica em geral, para que mais pesquisas sejam desenvolvidas acerca de aplicação de biocatalisadores na indústria de alimentos, visando um processo ambientalmente amigável. Os benefícios da pesquisa ainda ampliam os conhecimentos de novos processos de fermentação e imobilização de enzimas destacados na literatura atual.

REFERÊNCIAS

BADGUJAR, K. C.; BADGUJAR, V. C.; BHANAGE, B. M. Recent update on use of ionic liquids for enzyme immobilization, activation, and catalysis: A partnership for sustainability. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 36, 2022.

BENÍTEZ-MATEOS, A. I. E CONTENTE, M. L. Agarose vs. Methacrylate as Material Supports for Enzyme Immobilization and Continuous Processing. **Catalysts**, v. 11, iss 7, pp. 814, 2021.

BENUCCI, I.; CASO, M. C.; BAVARO, T.; MASCI, S.; KERSIENE, M.; ESTI, M. ProlylEndopeptidase from *Aspergillus Niger* Immobilized on a Food-Grade Carrier for the Production of GlutenReduced Beer. **Food Control**, v. 110. 2020.

BHARATI, A.; TRUNOV, D. N.; SEDLÁŘOVÁ, I.; BELLUATI, A.; SOOS, M. Effective lipase immobilization on crosslinked functional porous polypyrrole aggregates, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 667, pp. 131362-131362, 2023.

BHARDWAJ, N.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Enzyme Immobilization. **Genomics Approach to Bioremediation: Principles, Tools, and Emerging Technologies**, v. 5, pp. 35-51, 2023.

BORNFELT, P. O. A Dynamic Defect Generation Strategy for Efficient Enzyme Immobilization in Robust Metal-Organic Frameworks for Catalytic Hydrolysis and Chiral Resolution. **Angewandte Chemie**, v. 135, n. 20, 2023.

GUAN, T.; LIU, B.; WANG, R.; HUANG, Y.; LUO, J.; LI, Y. The enhanced fatty acids flavor release for low-fat cheeses by carrier immobilized lipases on O/W pickering emulsions. **Food Hydrocoll**, v. 116, 2021.

HUSSEIN M. M.; KHEIRALLA Z. H.; AHMED H. A.; EL-GENDY N. S. Enhanced production of xylanase enzyme by *Fusariummoniliforme* using submerged fermentation **Journal of Scientific Research in Science**, v. 35, pp. 227-236, 2018.

KUO, C. H.; HUANG, C. Y.; SHIEH, C. J.; DONG, C. D. Enzymes and Biocatalysis. **Catalysts**, v. 12, Iss: 9, pp. 993-993, 2022.

MAGHRABY, Y. R.; EL-SHABASY, R. M.; IBRAHIM, A. H.; AZZAZY H. Enzyme

Immobilization Technologies na Industrial Applications. **ACS omega**, v. 8, n. 6, pp. 5184- 5196, 2023.

MARTIN, J. G. P.; LINDNER, J. D. D. Microbiologia de alimentos fermentados. 1. ed. São Paulo: **Blucher**, 2022. v. 1.

NEMA, A.; PATNALA, S. H.; MANDARI, V; KOTHA, S.; DEVARAI, S. K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019.

NUNES, Y. L.; MENEZES, F. L.; SOUSA, I. G.; CAVALCANTE, A. L. G.; CAVALCANTE, F. T.; MOREIRA, K. S.; OLIVEIRA, A. L. B.; MOTA, G. F.; SOUZA, F. R. S.; FALCÃO, I. T. A.; ROCHA, T. G.; VALÉRIO, R. B. S.; FECHINE, P. B. A.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, J. C. S. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy?. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, pp. 1124-1170, 2021.

PARRENÃS, R. S. Industrial applications of immobilizes enzymes: Food and other areas. **Biocatalyst immobilization**, pp. 365-401, 2022.

PINHEIRO, B.; RIOS, N. S.; AGUADO, E. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T. M.; FECHINE, P. B. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, pp. 798-809, 2019.

RODRIGUEZ, K.; BERNAL, C.; MARTINEZ, R. Immobilized Biocatalyst Engineering: High throughput enzyme immobilization for the integration of biocatalyst improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.170, pp. 61-70, 2021.

RIGO, D., GAYESKI, L., TRES, G. A., CAMERA, F. D., ZENI, J., VALDUGA, E., CANSIAN, R. L., & BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, pp. 9232–9254, 2021.

SANTIAGO, P. A. L.; DA SILVA SANTIAGO, S. R. S.; DOS SANTOS GOMES, A. M.; PEREIRA, K. D. D. E.; DA COSTA BARROSO, J.; LIMA, Y. V. V.; DE OLIVEIRA, E. C. A. Avaliação enzimática e morfológica de fungos associados a um basidiomiceto da região Amazônica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9831-9850, 2021.

SENSHARMA, S.; KUMAR, G.; SARKAR, A. Immobilized enzyme reactors for bioremediation. **Metagenomics to Bioremediation**, pp. 641-657, 2023.

SILVA, L. S.; MARTINS, A. C.; KUPSKI, L.; RUIZ, J. B. Fermentação Em Estado Sólido E Submerso Para Produção De Celulase: Revisão Bibliográfica. **CIAGRO**, 2020.

ZHANG, H.; JIANG, Z.; XIA, Q.; ZHOU, D. Progress and perspective of enzyme immobilization on zeolite crystal materials. **Biochemical Engineering Journal** 172,

2021.