

## OTIMIZAÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA A PARTIR DA TORTA DE LICURI

**Andreza Borba<sup>1</sup>, Elisa Teshima<sup>2</sup>, Andrea Limoeiro Carvalho<sup>2\*</sup>**

1. Estudante da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

2. Professora da UEFS - Departamento de Tecnologia

3. Orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana.

### Resumo

O Licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) é uma palmeira importante nativa do Semiárido Brasileiro, sendo o seu principal produto o óleo obtido através da amêndoa. O subproduto desta extração é pouco explorado, o qual seria capaz de colaborar com o desenvolvimento econômico e social das regiões onde se encontra o licuri, empregando-o como biomassa, por meio da produção de enzimas. Pode-se obter enzimas microbianas tanto pelo processo líquido submerso, como por fermentação em estado sólido (FES), de forma a aumentar o aproveitamento de resíduos sólidos de diversas origens. Este trabalho objetivou a otimização do meio fermentativo para a obtenção de protease, utilizando torta e casca de licuri como substrato, com ou sem a adição de farelo de trigo ao meio. Para tanto foram avaliadas 42 actinobactérias, para investigação de produção de proteases, e duas actinobactérias previamente selecionadas como produtoras de lipases.

**Palavras-chave:** Actinobactéria; enzimas; FES.

**Apoio financeiro:** FAPESB; UEFS.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana.

### Introdução

O Licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) é uma das principais palmeiras nativas do Semiárido Brasileiro. Ele é importante para a subsistência do sertanejo, sendo muito utilizado na alimentação do gado, servindo de alimento para aves e animais silvestres. A amêndoa seca fornece 38% de um óleo incolor, transparente, de densidade de 0,921 a 15°C. Entretanto existe uma vertente que ainda não foi explorada e que pode incrementar o valor comercial dessa planta, promovendo o desenvolvimento econômico e social das regiões onde o licuri é encontrado, que é o da biotecnologia, representada pelo desenvolvimento de produtos de elevado valor agregado como as enzimas.

A utilização de enzimas na produção de alimentos envolve a seleção de enzimas apropriadas para converter o substrato em molécula alvo. Dentre estas enzimas, as proteases são essências para modificação intencional das proteínas dos alimentos e sua principal função é a hidrólise de proteínas; as pectinases, que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica e são utilizadas em larga escala nas indústrias como de sucos de frutas; e as lipases, cuja função biológica é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos em reações, tais como esterificação e transesterificação (BOBBIO, 1989; COSTA *et al.*, 2009; DIAZ *et al.*, 2006).

As enzimas microbianas podem ser obtidas tanto em processo líquido submerso, quanto em fermentação em estado sólido (FES). A fermentação em estado sólido ou em estado semissólido caracteriza-se por ser um processo fermentativo realizado em uma matriz sólida, configurada pela ausência ou pela baixa quantidade de água livre. Entretanto, o substrato utilizado deve ter quantidade de água suficiente, através a umidade da matriz, necessária ao desenvolvimento microbiano (PANDEY, 2003 apud SINGHANIA *et al.*, 2009). Este trabalho teve por objetivo otimizar o meio fermentativo para a produção de lipases e pectinases, assim como distinguir, entre as actinobactérias avaliadas, a de maior capacidade produtora de protease, dispondo da torta e casca de licuri como substrato, adicionando-se ou não o farelo de trigo ao meio, possibilitando a obtenção de um produto de elevado valor agregado, oriundo do subproduto torta de licuri.

### Metodologia

Para a determinação das atividades de protease e lipase, os substratos utilizados neste estudo foram a torta e casca de licuri, os quais foram adquiridos junto à COOPES, e o farelo de trigo, adquirido no comércio local. As actinobactérias utilizadas neste estudo foram obtidas junto ao LAPEM.

Para a produção de protease as actinobactérias foram transferidas para placas contendo meio YM, favorável ao seu crescimento e manutenção de sua viabilidade. Das placas foram transferidos "plugs" de 5 mm de cultura para frascos reagentes com arroz parboilizado (previamente hidratado e esterilizado a 120°C/ 55 min). Logo após, foram incubados a 28°C em BOD por 10 a 12 dias até que todo o arroz foi coberto pelo crescimento celular. Depois desse período, foram adicionados 75 mL de solução NaCl 0,85% e o frasco foi submetido a agitação leve em banho agitado, a temperatura ambiente por 30 minutos, para obtenção do inóculo. Em seguida o arroz

fermentado foi filtrado em gaze estéril em frascos reagentes estéreis. O inóculo foi então incubado em meio FES, contendo torta e casca de licuri, farelo de licuri e outros nutrientes necessários ao seu desenvolvimento por 12 dias a 30°C, com umidade de 67%.

Para a validação dos experimentos de otimização de meio para a produção de pectinases e lipases, as duas cepas de actinobactérias avaliadas foram *Arthrobacter polychromogenes* e *Streptomyces violaceoruber*. Foi utilizado um percentual de umidade considerando a capacidade de adsorção de água pelos componentes do meio; e proporções de Farelo de trigo e Torta de licuri de F/T (%) 70/0 e 0/70. O percentual de casca de licuri foi mantido constante e igual a 30%.

A extração das enzimas produzidas foi feita adicionando-se água ao meio fermentado, a solução formada foi macerada e submetida a agitação por uma hora a 100 rpm. Após esse tempo, a solução foi filtrada e centrifugada para a retirada do sobrenadante. O sobrenadante foi então avaliado quanto à produção de proteases, lipases e pectinases.

### Resultados e Discussão

Das 42 actinobactérias analisadas quanto à produção de proteases, nenhuma demonstrou resultados positivos. Os fatores que podem ter influenciado a ausência de atividade de protease, são as condições do ambiente, a formulação do meio ou alguma variação referente ao controle dos parâmetros de fermentação propriamente ditas. Os resultados obtidos com os experimentos de validação da otimização de meio para a produção de lipases e pectinases são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Atividade enzimática das Lipases e Pectinases e seus respectivos desvios.

Micro-organismo	Licuri/Farelo de trigo (%)	Lipase (U/g )	Pectinase (U/g )
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	70/0	466,61 ± 22,24	0,0
	0/70	149,79 ± 76,26	0,0
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	70/0	399,21 ± 15,89	0,0
	0/70	850,85 ± 0,00	0,0

Observando os dados presentes na Tabela 1, verifica-se que, apesar das duas cepas utilizadas demonstraram atividade para lipase. No trabalho anterior foram usadas as mesmas condições para a produção de lipases, variando-se umidade e a proporção entre torta de licuri e farelo de trigo, verificando-se que a umidade foi o fator determinante para a resultância de atividade enzimática, por ambas as cepas, sendo que, quanto maior a umidade, maior foi a produção de enzimas [2]. Verifica-se, ainda, que a atividade de lipase obtida por *A. polychromogenes* foi de 466,61 U/g de substrato seco e 149,79 U/g de substrato seco para a torta de licuri e o farelo de trigo, respectivamente, apontando 67,89% de diferença, a depender do substrato utilizado, verificando-se que a produção foi maior com o primeiro do que com o segundo. Já para *S. violaceoruber*, por sua vez, os resultados apresentados para a atividade variaram de 399,21 U/g de substrato seco até 850,85 U/g substrato seco, para a torta de licuri e o farelo de trigo, respectivamente, apontando uma diferença de 95,4% na produção de lipase entre os dois substratos avaliados. No trabalho de Rodrigues [2], o modelo previu atividades acima de 450 U/g de substrato seco quando se utiliza maiores concentrações de farelo de trigo no meio, valor este superado ao se utilizar apenas farelo de trigo como substrato. Quando comparados com outros trabalhos encontrados na literatura, tem-se que os resultados obtidos por outros autores, apesar de utilizarem unidades um pouco diferentes em alguns casos, foram menores do que os obtidos no presente trabalho. Considerando que a ideia do projeto é fomentar outras aplicações para a torta de licuri, resíduo da extração do óleo, pelas comunidades produtoras, tem-se que os resultados obtidos por ambas as cepas, utilizando apenas a torta de licuri como substrato se apresenta como uma boa alternativa para agregar valor ao subproduto desta atividade.

### Conclusões

Os resultados indicaram um considerável potencial do emprego do Licuri (torta e casca), como condição para o desenvolvimento de enzimas lipolíticas, levando em consideração as condições ambientais avaliadas, reforçando a influência positiva da umidade e que é possível produzir lipases apenas com o licuri, sem a necessidade de um coadjuvante de meio.

Contudo não foram obtidos resultados positivos para proteases, pois as condições estudadas neste trabalho não forneceram subsídios para o desenvolvimento destas. Vale ressaltar também a importância das actinobactérias no decorrer das atividades realizadas neste trabalho, mostrando sua eficácia quanto a produção de enzimas.

### Referências bibliográficas

- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 231p, 1989.
- BONDAR, G. **O licurizeiro (*cocus coronata* Mart.) e suas potencialidades na economia brasileira**. Salvador: Instituto Central de Fomento Econômico da Bahia, v. 2, 18 p. 1938.
- BONINE, B.M. **Produção de lipase pelo fungo *Mycelio phthora* sp. F. 2.1.4, caracterização e imobilização da solução enzimática bruta**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista. 2011.
- da COSTA, R.P.; QUEIROZ, A.E.S.de F.; da SILVA, A.C.; SOUZA-MOTTA, M.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F.; SOCCOL, C.R.; MOREIRA, K.A. Produção de proteases por fermentação no estado sólido. In: JEPEX 2009 – IX

- Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife. **Anais Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Recife: UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.
- DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microb. Technol.**, v.39, p.1042-1050, 2006.
- OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1995.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- RODRIGUES, H.C.S.R. **Produção de lipase e pectinase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de licuri como substrato**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2017.
- UMSZA GUEZ, M.A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo** -Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. 2009.