

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

Andreza Borba¹Andrea Limoeiro Carvalho²

1. Bolsista PEVIC, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: borba.andreza@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: limoeiro@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Licuri, Fermentação semissólida, Protease.

INTRODUÇÃO

O Licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) é uma das principais palmeiras nativas do Semiárido Brasileiro. Na região de origem, é capaz de suportar secas prolongadas, florescendo e frutificando por um longo período do ano. Ele é importante para a subsistência do sertanejo, sendo muito utilizado na alimentação do gado, servindo de alimento para aves e animais silvestres. A polpa e as amêndoas são consumidas in natura. Delas extrai-se um óleo usado na culinária (BONDAR, 1938). A amêndoa seca fornece 38% de um óleo incolor, transparente, de densidade de 0,921 a 15°C. As amêndoas são utilizadas, também, como substitutas do milho para a alimentação de aves. 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 moléculas alvo. Dentre estas enzimas, as proteases são essenciais para modificação intencional das proteínas dos alimentos e sua principal função é a hidrólise de proteínas onde estão envolvidas no processo de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e transporte de proteínas através de membranas; as pectinases, que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica e são utilizadas em larga escala nas indústrias de sucos de frutas, na fermentação de chá, café e cacau; 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).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação das atividades de protease, lipase e pectinase, 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 validação dos experimentos de otimização de meio para a produção de lipases e pectinases, 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% (RODRIGUES, 2017).

Para a determinação de atividade enzimática, as actinobactérias, após terem sido ativadas e seu crescimento ter sido estimulado foram incubadas em meios de fermentação semissólida contendo torta de licuri e outros nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Cada isolado foi individualmente testado para secreção da enzima desejada. 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 enzimática.

Determinação de atividade proteolítica: A atividade de protease foi determinada usando 0,4 mL de solução de caseína 0,5% em água, acionada a 0,4 mL de solução tampão acetato 0,2 M com pH ajustado para as enzimas produzidas. Posteriormente, 0,2 mL do sobrenadante serão adicionados à solução com o substrato e a reação foi induzida por 30 minutos a 60°C, sob agitação leve. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 1 mL de TCA 10% e resfriamento em banho de gelo. Após a temperatura ser reduzida a solução foi centrifugada por 5 min a 5000 rpm e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV a 280 nm de comprimento de onda. Para complementar a leitura foi feito o controle de substrato. Com a construção da curva padrão de caseína foi possível determinar a atividade da enzima produzida (UMSZA-GUEZ, 2009).

Determinação de atividade de Pectinase: As amostras foram preparadas com 0,8 mL de pectina em TP acetato mais 0,2 mL do extrato com enzima, posteriormente se retirou 1 mL da solução resultante, adicionando 0,8 mL desta para a amostra levando a 60°C em agitação leve para a ativação da enzima, depois, em outro tubo de retirou 0,2 mL da solução anterior com 0,8 mL mais 1 mL de DNS, fervendo este por 10 minutos e depois direcionados ao banho de gelo e adicionando 8 mL de água, ao final desta etapa se fez a leitura em uma margem de 540 nm. Os outros 0,2 mL foi adicionado junto a 0,8 mL de água mais 1 mL de DNS para o controle, em água fervente no tempo de 10 minutos, depois levado ao banho de gelo e adicionando 8 mL de água, e logo após realizando a leitura deste (UMSZA-GUEZ, 2009).

Determinação de atividade de Lipase: Para as amostras e controle de substrato foram adicionadas 1 mL de solução A mais 9 mL de solução B (soluções previamente preparada e com seus respectivos cálculos analisados adequadamente). O preparo da mistura (A + B) foi feito lentamente sob agitação contínua imediatamente antes do uso. Posteriormente foi retirado 0,9 mL da mistura (A + B) a 37°C até que sua temperatura fosse estabilizada. Para a amostra foi adicionado 0,1 mL do extrato com enzima a uma temperatura de 37°C com agitação leve e para o controle adicionou-se 0,1 mL de TP fosfato sob as mesmas condições de temperatura e a agito da amostra. Ao final desta etapa foi feita a leitura deste em 410 nm (BONINE, 2001).

Após a coleta de dados, realizou-se o cálculo das atividades de protease, lipase e pectinase, de acordo com a equação abaixo:

$$U/g = \mu\text{mol}/g \text{ min} = \frac{[] \times V_{\text{Total}} \times V_{\text{Ext}}}{V_{\text{Amostra}} \times t \times m_{\text{Subs}}} \times \text{Diluição}$$

Onde [] corresponde à concentração de L-tirosina, ácido D-galacturônico e p-nitrofenol, respectivamente, em mmol/mL; V_{Total} , V_{Amostra} , e V_{Ext} são o volume total da análise, da amostra e da água utilizada na extração das enzimas, respectivamente, em mL; t , o tempo da reação enzimática, em min; e m_{Subs} , a massa de substrato seco, em g.

RESULTADOS

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

Observando os dados presentes na Tabela 1, verifica-se que, apesar das duas cepas utilizadas para a produção de enzimas terem crescido nos meios preparados, estas demonstraram atividade para lipase, mas não para pectinase. Todavia, no trabalho que antecedeu a este, os resultados de atividade de lipase e pectinase foram positivos. Uma possível explicação para a ausência de atividade pectinolítica seria por ter ocorrido contaminação da cepa no início dos experimentos, sendo preciso a recuperação destas, fazendo com que o micro-organismo tivesse sua capacidade de produzir enzima diminuída, devido à competição por nutrientes ocorrida. Corroborando com essa hipótese, tem-se que, de acordo com Oliva-Neto (1995) em seus estudos sobre fermentação alcoólica, a contaminação bacteriana leva a uma queda no rendimento fermentativo na faixa de 14 a 90%.

Ainda analisando os resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que a atividade de lipase obtida por *A. sulfonivorans* 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. Comparando com os valores obtidos no trabalho anterior, onde o modelo previu valores acima de 600 U/g para as melhores condições operacionais avaliadas, observa-se uma redução na produção de aproximadamente 22%, considerando a atividade lipolítica, neste trabalho em relação ao anterior. Entretanto, demonstram que existe produção enzimática, e que, ao contrário do que previu o modelo obtido por Rodrigues (2017), a produção foi maior quando se utilizou apenas torta e casca de licuri como substrato.

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 (2017), o modelo previu atividades acima de 450 U/g de substrato seco quando se utilizasse 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.

CONCLUSÃO

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

- 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.