



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos



HEB CRISTYNI SANTA ROSA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE E PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI COMO
SUBSTRATO**

SALVADOR

2017

HEB CRISTYNI SANTA ROSA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE E PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI COMO
SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Coorientadora: Prof^a. Dr.^a Andrea Limoeiro Carvalho

SALVADOR

2017

R696

Rodrigues, Heb Cristyni Santa Rosa
Produção de lipase e pectinase por fermentação em estado
sólido utilizando residuo de licuri como substrato / Heb
Cristyni Santa Rosa Rodrigues. -- Salvador, 2017.
62 f. : il

Orientador: Marcelo Andrés Umsza Guez.
Coorientadora: Andrea Limoeiro Carvalho.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciência
de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2017.

1. Fermentação em estado sólido. 2. FES. 3. Enzima. 4.
Licuri. 5. Actinobactéria. I. Umsza Guez, Marcelo Andrés. II.
Carvalho, Andrea Limoeiro. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

HEB CRISTYNI SANTA ROSA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE E PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DE LICURI COMO
SUBSTRATO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 30 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia
Orientador



Dr. César Augusto Piedrahíta Aguirre
Universidade Federal da Bahia



Dr. Marília Lordêlo Cardoso Silva
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a sabedoria e por colocar em meu caminho as pessoas, situações e recursos necessários para a obtenção desta conquista.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez pela orientação, paciência e incentivo.

À minha coorientadora, Dra. Limoeiro Carvalho pela orientação, apoio e incentivo durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

À UFBA e ao PGAlí, pela oportunidade de adquirir mais conhecimentos e de me tornar mestre em Ciência de Alimentos.

À UEFS e ao DTEC pela concessão da estrutura para realização dos experimentos e das análises.

À FAPESB e ao CAPES pelo financiamento do projeto de pesquisa e da bolsa de estudos.

Aos professores e colegas da UFBA e UEFS que colaboraram, de forma direta e indireta e pela disponibilidade para me auxiliar.

À minha família, especialmente meu esposo, minha mãe, minha sogra e meu sogro por todo o suporte, compreensão e incentivo para que eu pudesse me dedicar a esse trabalho. À minha filha, por aumentar ainda mais em mim a vontade e a necessidade de me aprimorar.

RESUMO

A utilização de enzimas em diversos processos industriais tem se tornado cada vez mais frequente. Adicionadas a processos produtivos podem acelerar reações e gerar uma série de novos produtos. Nos últimos 10 anos, ao mesmo tempo em que foi verificado aumento nas importações de enzimas no Brasil, também foi verificado um crescimento, no cenário mundial, no número de depósitos de patentes de obtenção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES). A China é detentora da maioria das patentes depositadas. Uma forma de obtenção de enzimas é através da FES que tem sido cada vez mais utilizada. Dentre os microorganismos utilizados em FES, os fungos filamentosos têm sido os mais pesquisados, mas há trabalhos envolvendo também bactérias, inclusive actinobactérias. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas de interesse alimentício, como lipases e pectinases, obtidas por fermentação em estado sólido utilizando torta de licuri como substrato e casca de licuri como material inerte. A fermentação ocorreu em escala de bancada com frascos Erlenmeyers e foram usadas duas cepas de actinobactérias: CDPI-30 (*Arthrobacter polychromogenes*) e CDPA-32, resíduos de licuri (torta e casca) e farelo de trigo (FT). A FES foi realizada a 28°C por 12 dias. Diferentes proporções de FT/ torta de licuri desengordurada (TLD): 0/70%, 10/60%, 35/35%, 60/10% e 70/0% e casca de licuri (CL), fixada em 30%, foram utilizadas. A umidade do meio variou de 29 a 67%. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central foi adotado. A proporção FT/TLD não afetou a produção das enzimas com a CDPI-30. Com a CDPA-32 a proporção foi significativa para a produção de lipase, mas não para a produção de pectinase. Os meios preparados com umidade de 67% e iguais proporções de FT e TLD (35/35%) apresentaram as maiores atividades enzimáticas para as duas enzimas, sendo 840,46 U/g para lipase e 15,53 U/g para pectinase. Os resíduos do licuri apresentaram-se como uma opção de substrato para a produção de lipase e pectinase por FES. Apesar do potencial biotecnológico para utilização de resíduos de licuri e actinobactérias em FES para obtenção de enzimas, ainda faltam pesquisas utilizando-os em escala industrial. Assim, os resultados obtidos são promissores e sugerem futuras pesquisas de aplicação das enzimas obtidas.

Palavras-chave: FES, torta de licuri, enzima, lipase, pectinase, actinobactéria.

ABSTRACT

The use of enzymes in various industrial processes has become increasingly frequent. Added to productive processes can accelerate reactions and generate a number of new products. In the last 10 years, at the same time that there was an increase in the imports of enzymes in Brazil, there was also a growth, in the world scenario, in the number of patent deposits of enzymes obtained by solid state fermentation (SSF). China holds most of the patents filed. One way of obtaining enzymes is through SSF that has been increasingly used. Among the microorganisms used in SSF, filamentous fungi have been the most researched, but there are also works involving bacteria, including actinobacteria. The objective of this work was to evaluate the potential of production of enzymes of interest to food, such as lipases and pectinases, obtained by SSF using licuri cake as substrate and licuri shell as inert material. The fermentation occurred on a bench scale with Erlenmeyer flasks and two strains of actinobacterias: CDPI-30 (*Arthrobacter polychromogenes*) and CDPA-32, licuri residues (cake and shell) and wheat bran (WB) were used. SSF was performed at 28°C for 12 days. Different proportions of WB / deoiled licuri cake (DLC): 0/70%, 10/60%, 35/35%, 60/10% and 70/0% were used. The solid medium moisture varied from 29 to 67%. A Rotational Central Compound Design (RCCD) of type 2², including 4 axial condition tests and 3 center point repetitions was adopted. The WB / DLC ratio did not affect the production of the enzymes with CDPI-30. With CDPA-32 the ratio was significant for lipase production but not for pectinase production. The medium prepared with moisture 67% and equal proportions of WB and DLC (35/35%) showed the highest enzymatic activities for the two enzymes, being 840.46 U / g for lipase and 15.53 U / g for pectinase. The residues of the licuri were shown to be a substrate option for the production of lipase and pectinase by solid-state fermentation. Despite the biotechnological potential for the use of licuri residues and actinobacteria in SSF to obtain enzymes, researches are still lacking using them on an industrial scale. Thus, the results obtained are promising and suggest future research on the application of the enzymes obtained.

Key words: SSF, licuri cake, enzyme, lipase, pectinase, actinobacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1 - Importação e exportação de enzimas no Brasil, em toneladas

Figura 2 - Importação e exportação de enzimas no Brasil, em US\$

Figura 3 - Extração de licuri no Brasil, em toneladas

Capítulo II

Figura 1 - Evolução anual de depósito de patentes de produção de enzimas por FES

Figura 2 - Número de patentes por código de classificação internacional

Figura 3 - Número de patentes por país depositante

Figura 4 - Distribuição das patentes depositadas por tipo de depositante

Figura 5 - Número de patentes por depositante

Figura 6 - Número de patentes por inventor

Figura 7 - Tipos de enzimas obtidas nas patentes depositadas

Capítulo III

Figure 1 - Produção de lipases por actinobactérias CDPI-30 (a) e CDPA-32 (b) e de pectinases por CDPI-30 (c) e CDPA-32 (d) em função da umidade e da proporção FT/TLD durante a fermentação em estado sólido

APÊNDICE A

Figura 1 - Cacho de licuri (a) e amêndoa de licuri (b)

Figura 2 - Produtos feitos a partir de licuri: Kiosque (a), cosméticos (b) e artesanato (c)

Figura 3 - Actinobactérias: CDPA-32 (a) e CDPI-30 (b)

Figura 4 - Substratos sólidos: torta de licuri desengordurada (a), farelo de trigo (b) e cascas de licuri

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Exemplos de atividades de lipases obtidas por diferentes micro-organismos e substratos em FES

Tabela 2 - Total de documentos obtidos por busca no Espacenet Worldwide Database

Capítulo II

Tabela 1 - Termos e códigos usados na busca de patentes depositadas na base de dados Espacenet.

Tabela 2 - Significados dos códigos de patentes segundo IPC

Capítulo III

Tabela 1 - Valores utilizados no DCCR 2² para produção de enzimas

Tabela 2 - Atividades de lipase e pectinase obtidas pela CDPI-30 e pela CDPA-32

Tabela 3 - ANOVA para atividades de lipase obtidas por FES com actinobactérias e resíduos de licuri e farelo de trigo

Tabela 4 - ANOVA para atividades de pectinase obtidas por FES com actinobactérias e resíduos de licuri e farelo de trigo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
Capítulo I.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	16
3.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FES.....	17
3.3 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS EM FES.....	18
3.4 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS EM FES.....	20
3.5 ENZIMAS.....	22
Capítulo II.....	35
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. METODOLOGIA.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4. CONCLUSÃO.....	44
Capítulo III.....	46
PRODUÇÃO DE LIPASE E PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI COMO SUBSTRATO.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Micro-organismos, manutenção da cultura e preparo dos inóculos.....	49
2.2 Desengorduramentoda torta de licuri.....	49
2.3 Análise do Teor de lipídeos.....	50
2.4 Preparação dos meios e fermentação.....	50
2.5 Extração das enzima.....	51
2.6 Quantificação da Atividade Enzimática.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4. CONCLUSÃO.....	57
Capítulo IV.....	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
Capítulo V.....	63
APÊNDICE A.....	64

1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. No Brasil, que possui grande atividade agrícola, extrativista e também de beneficiamento de produtos, estima-se que as taxas de desperdícios cheguem a 20% dos grãos produzidos e 30 a 40% das hortaliças e frutas cultivadas. Diante desses números, além de ações para redução do volume de resíduos gerados, a destinação final destes carece de melhorias e alternativas de tratamentos para melhor aproveitamento (PINTO *et al*, 2005; MARTINS, FARIAS, 2002).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado. Dentre eles destacam-se as enzimas (PINTO *et al*, 2005).

A fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido é o nome dado ao processo de crescimento de micro-organismos em substratos sólidos na ausência de água livre (RAIMBAULT, 1998). A FES tem sido cada vez mais pesquisada e aplicada também devido às suas vantagens de apresentar, frequentemente, boa produtividade e por ser uma tecnologia de baixo custo (ROBINSON, SINGH, NIGAM, 2001; AGUILAR *et al.*, 2008). Os fatores que mais interferem no desempenho da FES são: o tipo de substrato empregado; o micro-organismo utilizado e a umidade do meio (ABRUNHOSA, VENÂNCIO, TEIXEIRA, 2011).

Fungos filamentosos têm sido os micro-organismos mais utilizados em FES, mas verificam-se também, na literatura, relatos de pesquisas com leveduras e bactérias, inclusive actinobactérias (SOCCOL *et al*, 2017). Quanto aos substratos, os de melhor potencial para utilização em FES têm sido os resíduos agrícolas e florestais por serem abundantes, baratos e subutilizados, como exemplo: bagaço de cana-de-açúcar, farelos de trigo, de arroz, de aveia, de soja, polpa e cascas de café, cascas de frutas, resíduos após a extração de óleos, etc. (FARINAS, 2015). A torta do licuri (*Syagrus coronata* - (Martius) Beccari), resíduo gerado a partir da extração do óleo de suas amêndoas, devido à sua composição (41% de substâncias não azotadas, 19% de proteínas, 16% de celulose e 11% a 12% de óleo) é um outro possível substrato para FES ainda pouco estudado (GOMES, 1977 citado por SANTOS, SANTOS, 2002).

Dentre as enzimas de grande interesse e produzidas por FES, encontram-se carboidrases (amilases, celulasas, xilanasas, pectinases), proteases e lipases (RODRIGUES *et al*, 2016). As lipases atuam hidrolisando óleos e gorduras e liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Apresentam larga possibilidade de aplicações tendo sido empregadas nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica; de cosméticos; de couros; de papel e celulose; de rações; de tecidos e em tratamento de efluentes (KOBLITZ, 2008). As pectinases são enzimas que atuam sobre os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Têm sido usadas nas indústrias de sucos de frutas, de vinhos, de tecidos, de papel, de chá, café, extração de óleo, tratamento de efluentes líquidos e outros materiais contendo pectina (KOBLITZ, 2008; SALAZAR, JAYASINGHE, 1999; RICARD, REID, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o potencial de produção de enzimas de interesse alimentício, lipases e pectinases, obtidas por fermentação em estado sólido utilizando torta de licuri e farelo de trigo como substrato e casca de licuri como material inerte.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Realizar uma prospecção baseada em documentos de patentes depositadas no mundo sobre a aplicação de FES para produção de enzimas;
- (2) Avaliar o potencial de produção de enzimas por actinobactérias utilizando resíduos de licuri e farelo de trigo em FES;
- (3) Avaliar e otimizar o substrato (resíduos de licuri + farelo de trigo) como principal fonte nutritiva para FES;

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A FES pode ser definida como um processo fermentativo que ocorre em uma matriz sólida na ausência ou quase ausência de água livre, porém com um conteúdo de umidade que permite o crescimento e metabolismo de micro-organismos. O ambiente proporcionado na FES se assemelha ao habitat natural de muitos micro-organismos (SINGHANIA, PATEL E PANDEY, 2009).

A utilização da FES data de milhares de anos atrás, com processamento de pão de queijo e de *Koji* e atualmente tem sido amplamente empregada na produção de vários produtos como: alimentos orientais fermentados (*tempeh*, *miso*, *shoyu*, *koji*); enzimas (pectinases, ligninases, proteases, xilanases, fitases, celulases, amilases, lipases, dentre outras); fungos comestíveis (champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) e *shii-take*); queijos (Roquefort, Camembert); enriquecimento protéico de produtos e resíduos agrícolas; outros produtos (ácido cítrico, ácido L (+) láctico, etanol, giberelinas, antibióticos, toxinas, alcalóides e aromas (SOCCOL, 1992).

Um processo de FES envolve as seguintes etapas: preparação do substrato, preparação do inóculo, cultivo, extração e purificação do produto. Os aspectos mais importantes a serem considerados são a escolha do substrato e do micro-organismo, a otimização dos parâmetros de processo, o isolamento e a purificação dos produtos (MANPREET *et al*, 2005; PANDEY, 2003).

Após as escolhas do substrato e micro-organismo ideais, abordados nos subitens 3.3 e 3.4, respectivamente, a definição e otimização dos parâmetros de processo, tais como: tamanho das partículas, umidade inicial, pH, pré-tratamento do substrato, temperatura de incubação, agitação e aeração, idade e quantidade do inóculo, suplementação de nutrientes, extração e purificação dos produtos são de grande importância para se obter sucesso em uma FES.

3.1.1 Efeito da Umidade

A umidade do substrato é um parâmetro fundamental, pois, exerce influência muito grande na atividade microbiana. Em geral, o tipo de micro-organismo que pode crescer em sistemas de FES é determinado pela umidade e a_w . Um teor de umidade elevado diminui a

porosidade do substrato dificultando a penetração de oxigênio. Por outro lado, uma umidade baixa pode levar a uma baixa acessibilidade dos nutrientes, resultando em um crescimento microbiano fraco (PANDEY, 2003).

Para FES os micro-organismos considerados bons em relação à a_w e umidade são os capazes de crescer e realizar suas atividades metabólicas em valores não muito altos. Fungos filamentosos que são os mais utilizados em FES e também algumas leveduras crescem em valores de a_w de 0,6 a 0,7 e umidade que pode variar entre 12% e 80% (p/p) (PRIOR, PREEZ e REIN, 1992; LONSANE *et al*, 1985).

3.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FES

Apesar de muitos processos de fermentação ocorrerem da forma submersa (FSm), Rodríguez-Couto e Sanróman (2006) afirmaram que nos últimos anos muitas pesquisas têm sido feitas com a FES e os produtos obtidos, principalmente enzimas, aromas, corantes e outros produtos de interesse para a indústria alimentícia têm apresentado características melhores e melhor rendimento.

As vantagens dos processos biológicos realizados com FES são: menores custos de capital e de operação (principalmente devido aos custos das matérias-primas utilizadas, que geralmente são resíduos de produções agrícolas, gerados em grandes quantidades e baratos); extratos com maior qualidade e maior atividade; maior rendimento, principalmente de enzimas; não necessitam de solventes orgânicos (que geralmente oferecem algum nível de toxicidade para a extração); requerem menos energia para a esterilização (devido à menor atividade da água), são menos susceptíveis à contaminação bacteriana; benefícios ambientais com o aproveitamento de resíduos industriais e menor produção de águas residuais (MARTINS *et al*, 2011; SINGHANIA *et al*, 2009).

As vantagens dos processos de FSm em relação à FES são em relação à instrumentação e ao controle (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), separação de biomassa após fermentação, mistura, aeração e ampliação (FARINAS, 2015).

Basha *et al* (2009) investigaram a produção de L-asparaginase produzida por actinobactérias (*Streptomyces spp*) através dos dois métodos: FES (com resíduos de soja) e FSm. Os resultados mostraram uma diferença significativa na atividade enzimática entre os 2 métodos. A FES proporcionou a maior atividade para todas as 3 cepas isoladas. A enzima

mostrou uma atividade específica de 662,61 U/ mg, após a purificação, pH ótimo de 7,5 e temperatura ótima de 50°C.

Por outro lado, as principais dificuldades relacionadas à FES são: dissipação do calor com possibilidade de elevação excessiva de temperatura devido à baixa condutividade térmica dos substratos sólidos; controle dos parâmetros de processo como pH e umidade; grande interferência da umidade com possibilidade de compactação ou dificuldade de acessibilidade aos nutrientes se mal dimensionada; necessidade de pré-processamento do substrato e pós-processamento do substrato fermentado para remoção do produto gerado (UMSZA GUEZ, 2009; SINGHANIA *et al*, 2009)..

3.3 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS EM FES

A escolha do substrato sólido a ser utilizado é um dos fatores mais importantes num processo de FES. Deve-se considerar vários fatores principalmente os relacionados a custo e disponibilidade. O substrato além de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento dos micro-organismos, também serve de ancoragem para os mesmos. O conhecimento da composição do substrato é importante não só para a sua escolha, mas também para se fazer combinações e suplementações de forma que sejam mais adequados para o tipo de produto que se espera obter (RODRÍGUEZ-COUTO, SANROMÁN, 2006).

Além de carbono e nitrogênio, para estimular o crescimento dos micro-organismos, induzir a síntese de enzimas ou prolongar a produção de metabólitos secundários, a suplementação com alguns micro e macro nutrientes como fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, manganês, cobre, ferro pode ser requerida (FARINAS, 2015; MANPREET *et al*, 2005; SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003)

Devido às variações nas composições e concentrações de nutrientes nos substratos, como por exemplo: carboidratos, proteínas e fibras, o micro-organismo, durante o processo hidrolítico, podem ser liberadas diferentes enzimas extracelulares como: pectinases, celulasas, hemicelulasas, proteases, amilases e ligninases, entre outras numa mesma fermentação (ZANELATO, 2011).

Outro fator a ser considerado na escolha do substrato é a necessidade ou não de um pré-tratamento para disponibilizá-lo para crescimento microbiano, como por exemplo: corte, moagem, quebra, desengorduramento, tratamento térmico, hidrólise química, etc. O

custo e a viabilidade desses processos adicionais devem ser considerados (MANPREET *et al*, 2005).

O farelo de trigo tem sido amplamente utilizado nas formulações de substratos para FES devido à sua composição (rico em nitrogênio, carbono e sais inorgânicos) e à sua grande disponibilidade. Funciona como fonte de energia facilmente disponível para o metabolismo microbiano e acelerando o processo fermentativo em seus estágios iniciais (EL-HAWARY, MOSTAFA, 2001).

3.3.1 Licuri

Uma outra possível fonte para ser usada como substrato para FES é o resíduo (torta) gerado na extração do óleo do licuri. O licuri (*Syagrus coronata* - (Martius) Beccari) uma palmeira da família *Arecaceae*, que pode chegar até 10m de altura é típica de regiões de clima semi-árido, como a caatinga brasileira, sendo encontrada desde o norte de Minas Gerais até o sul de Pernambuco, incluindo Bahia, Sergipe e Alagoas (DRUMOND, 2007)

Os frutos são produzidos em cachos com cerca de 1357 frutos. Possuem endosperma líquido enquanto verdes que se torna sólido com o amadurecimento. A coloração da casca varia do verde ao amarelo-claro ou alaranjado, dependendo do estágio de maturação (CREPALDI, 2001).

O licuri é uma palmeira de grande importância para o semi-árido e totalmente aproveitável. As folhas são usadas para a produção de vassouras, chapéus, cestas, esteiras, forragem para animais, cobertura de construções, fonte de energia em fornos domésticos (quando secas). O tronco, se transplantado, sobrevive naturalmente e tem potencial paisagístico. A polpa e as amêndoas são usadas para fabricação de cocadas e cuscuz. Delas extrai-se um óleo usado na culinária e em cosméticos. A cera, extraída das folhas, é de boa qualidade, semelhantes à cera da carnaúba e pode ser utilizada na fabricação de papel carbono, graxa para sapatos, móveis e pintura de automóveis. (DRUMOND, 2007).

As amêndoas do licuri possuem alto teor de lipídios (49,2%), 11,5% de proteínas e 9,7% de carboidratos totais, por isso são usadas para extração de óleo. Os resíduos gerados após a extração desse óleo (torta de licuri) são usados, geralmente, para ração animal, CREPALDI *et al*. (2001). Bagaço de licuri com um teor de lipídios de cerca de 30% foi utilizado em testes com ração animal por Melo *et al* (2016).

No que se refere à quantidade de licuri extraído no Brasil, pode-se perceber, analisando a Figura 1 que, no período de 2005 a 2014, essas quantidades vêm caindo

sequencialmente (de 5.178 ton em 2005 para 3.744 ton em 2014).(IBGE 2015). Essa queda pode ser em função da forma com que o licuri é explorado. Segundo Drumond *et al* (2007), o licuri, por ser uma palmeira totalmente aproveitável, vem sendo bastante explorada desde a época colonial, além de ser, normalmente, uma planta explorada por extrativismo. Esses fatores têm levado a uma diminuição na quantidade de palmeiras da espécie e, conseqüentemente, das extrações de licuri.

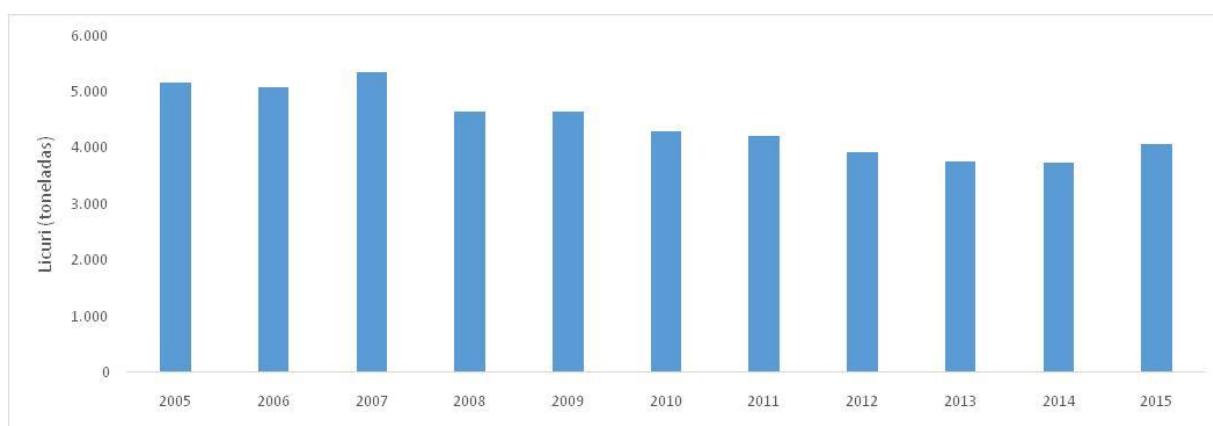


Figura 1 - Extração de licuri no Brasil, em toneladas

Em 2015 houve um aumento de 8,76% em relação a 2014, totalizando 4.072 ton, que movimentaram a economia num total de 4,039 milhões de reais. Bahia e Alagoas são os Estados onde concentram-se as extrações comerciais de licuri. Desse total extraído em 2015 a Bahia respondeu por 99% (IBGE, 2015).

3.4 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS EM FES

A escolha do micro-organismo para fermentação de substratos sólidos juntamente com a escolha do substrato são fatores importantíssimos a serem considerados ao se trabalhar com FES. Consultando diversos trabalhos científicos publicados percebe-se que os mais utilizados têm sido os fungos, a exemplo: *Aspergillus niger*; *Aspergillus sp*; *Aspergillus sojae*; *Rhizopus sp*; *Rhizopus oryzae*; *Rhizopus microsporu*, (DOS SANTOS, 2016; REINEHR, 2016; GONÇALVES, 2016). De acordo com Farinas (2015) os fungos filamentosos são os micro-organismos mais adequados devido à facilidade de adaptação aos ambientes preparados para a FES, que são muito parecidos com os seus habitats naturais (resíduos úmidos, com baixa

atividade de água, acesso a oxigênio do ambiente e nutrientes do substrato) e por serem capazes de sintetizar uma grande quantidade de enzimas e outros metabólitos.

Leveduras que crescem em ambientes com baixa atividade de água também têm sido utilizadas. Algumas bactérias como: *Bacillus subtilis*; *Bacillus megaterium*; *Penicillium restrictum*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* (KAUR, GUPTA, 2017; SEKHON *et al*, 2004; PALMA *et al*, 2000; SOCCOL *et al*, 2017) também têm sintetizado enzimas ao serem submetidas à FES.

3.4.1 Actinobactérias

Uma classe de micro-organismos promissora, mas que sobre a qual se encontram poucas pesquisas aplicadas à FES, são as Actinobactérias, que são um grupo de bactérias, muito encontradas no solo, Gram-positivas, formadora de esporos e de crescimento filamentosos e invasivo, semelhante aos fungos filamentosos. Apresentam boa capacidade de crescimento e colonização de resíduos sólidos e produzem vários tipos de enzimas de interesse industrial e ambiental e de alta resistência a condições extremas (BISPO, 2015; BISPO, 2010; OROZCO *et al*, 2008).

O gênero *streptomyces* é um dos mais importantes do grupo das actinobactérias. As enzimas produzidas por elas são capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros (GOODFELLOW, WILLIAMS, MORDARSKI, 1988).

Basha *et al* (2009) informa que embora os antibióticos têm sido os principais compostos bioativos obtidos de actinobactérias, a capacidade de produzir uma variedade de enzimas é grande. Meena *et al* (2013) ao fazer um *screening* de enzimas extracelulares produzidas por actinobactérias marinhas identificou enzimas com boa estabilidade a altas temperaturas e condições alcalinas com atividades amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas, celulolíticas, de DNase, fosfatase alcalina, gelatinase e urease.

Em se tratando de temperatura, a grande maioria das actinobactérias apresenta valores ótimos de crescimento na faixa de temperatura de 40 a 60°C (GRIGOREVSKI-LIMA *et al*, 2005; JANG, CHEN, 2003). Chi *et al* (2013) testaram uma linhagem que teve pH e temperatura ótimos de 7,0 e 50°C, respectivamente.

Bispo (2010) testou perfil de pH ótimo para atividades de celulase produzida por actinobactérias e verificou que para todos os pH testados (2,0 - 10,0), as enzimas mostraram

atividade relativa superior a 70%. Esta característica pode ser importante quando se pensa em aplicações industriais para as enzimas produzidas.

3.5 ENZIMAS

Enzimas são, em sua maioria, proteínas ou associações de proteínas com moléculas orgânicas ou inorgânicas, altamente especializadas, que têm funções catalisadoras, capazes de acelerar reações químicas. Elas catalisam a maioria das reações nos organismos vivos, mas têm sido também usadas em diversos processos industriais. A exceção das enzimas que não são proteínas são as ribozimas, grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas (NELSON *et al*, 2004).

As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais (sementes, sucos, polpas, raízes. Ex: papaína, bromelina); animais (mucosa gástrica, pâncreas, fígado, sangue. Ex.: renina) e *microbiana* (culturas de bactérias ou fungos, ex.: proteases, pectinases e amilases). As enzimas de origem microbiana têm sido exploradas com bastante frequência devido às suas propriedades, à diversidade de micro-organismos dos quais podem ser obtidas e devido ao potencial ilimitado de suprimentos, além de possibilitar a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animais e vegetais. (GONÇALVES, 2007).

Os benefícios que as enzimas podem proporcionar para os processos industriais, como melhoramento de aspectos sensoriais e nutricionais, aumento do rendimento em extrações, redução de custos, redução de possíveis impactos ambientais, obtenção de novos produtos vêm impulsionando as pesquisas e o aumento nas demandas mundial e nacional ao longo dos anos. Esse crescimento pode ser visualizado no gráfico da Figura 2 que apresenta as quantidades de enzimas, em toneladas, importadas e exportadas pelo Brasil do ano de 2006 ao ano de 2016 (BRASIL 2017a).

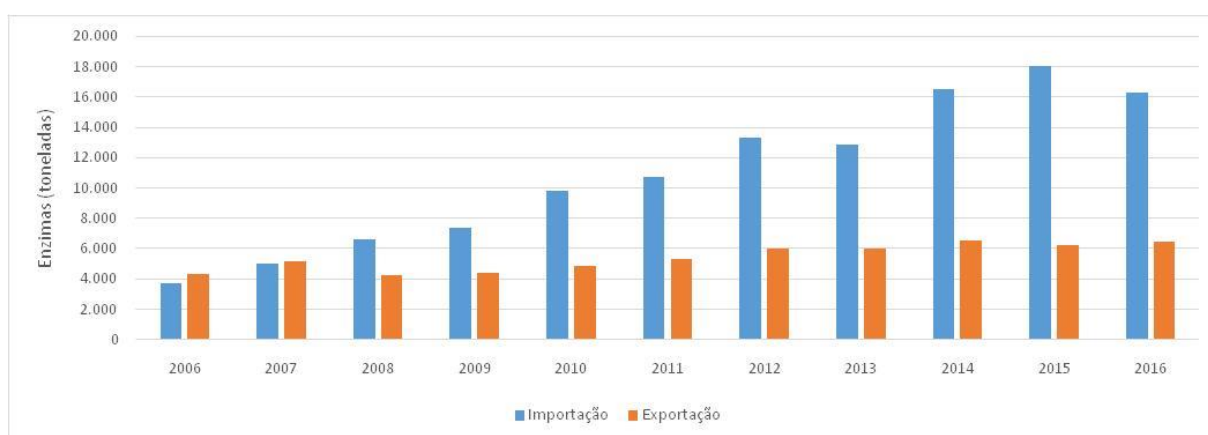


Figura 2 - Importação e exportação de enzimas no Brasil, em toneladas

O volume anual de enzimas importadas nos últimos 10 anos aumentou de 3.727 ton, em 2006, para 16.283 ton, em 2016, um aumento de 337%. Enquanto isso, as exportações subiram de 4.302 ton, em 2006 para 6.468 ton, em 2016, um aumento de 50% (BRASIL, 2017a). Esse cenário mostra que, ao longo desses 10 anos, a utilização de enzimas vem crescendo consideravelmente, bem como houve um aumento na produção e comercialização no Brasil.

Analisando a evolução nas importações e exportações, observa-se que, a partir de 2008, o percentual de importação passou a ser maior que o de exportação, havendo um déficit na balança comercial de enzimas nesse período. No período de 2006 a 2016, o Brasil importou 120.283 toneladas de enzimas e exportou 59.579 toneladas, que corresponde a 102% das importações (BRASIL, 2017a).

Esse crescimento nos últimos 10 anos e o déficit na balança de enzimas também são observados na economia quando se compara a evolução em dólares gastos com importação e exportação nos anos de 2006 a 2016, Figura 3. Nesse período, o total de importações correspondeu a US\$ 1,171 bilhão e o das exportações a US\$ 496,107 milhões correspondendo as exportações a 42% das importações (BRASIL 2017a).

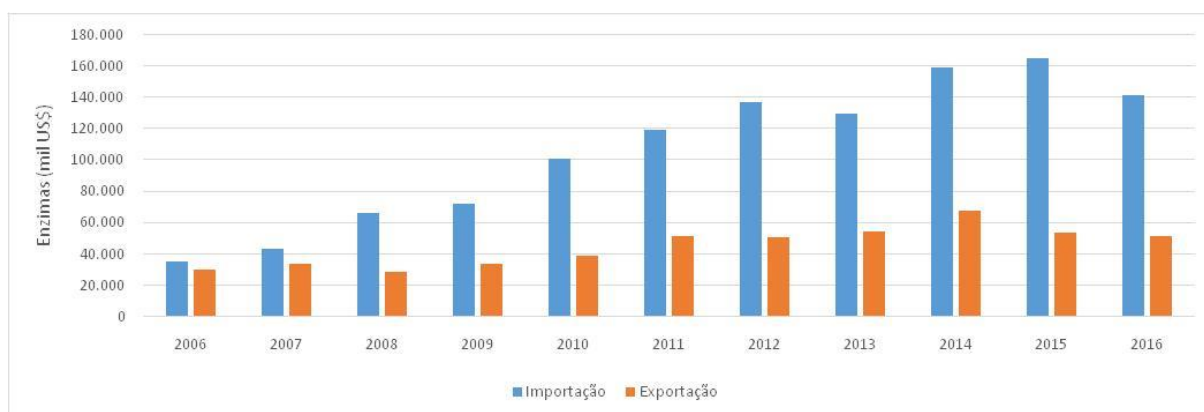


Figura 3- Importação e exportação de enzimas no Brasil, em (mil US\$)

Esse cenário além de mostrar o aumento da demanda por enzimas nesse período também evidencia uma grande oportunidade para o desenvolvimento e aperfeiçoamento do mercado interno de enzimas com o objetivo de suprir sua própria demanda.

Em relação ao mercado mundial, segundo a *Grand ViewResearch* (2016) em seus Relatórios de Pesquisa de Mercado, publicados nos meses de Maio e Junho de 2016, a comercialização de enzimas foi de US\$ 8,18 bilhões em 2015 e as indústrias de alimentos e bebidas, principalmente com as carboidrases, foram responsáveis pela maior participação. Informa também que é esperado um crescimento significativo até 2024, devido à crescente aplicação destas na fabricação de detergentes, produtos farmacêuticos, alimentos e bebidas. No processamento de alimentos e bebidas o crescimento é estimado em 10,9% de 2016 a 2024 e prevê-se um uso extensivo em germinação em cervejarias, pré-digestão de alimentos para bebês, clarificação de suco de frutas, amaciamento de carnes, fabricação de queijo e conversão de amido em glicose. Políticas governamentais para promoção da produção de biodiesel deverão também alimentar a demanda nesses próximos sete anos.

As enzimas são ótimos catalisadores e apresentam vantagens em relação a catalisadores não enzimáticos por não requererem altas temperaturas e valores extremos de pH. Devido à sua grande especificidade, catalisam transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Conseqüentemente, os processos industriais que as empregam são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo (COLEN, 2006).

O processo de produção de enzimas envolve etapas de produção (fermentação), separação, recuperação e purificação. As enzimas produzidas numa fermentação podem ser extracelulares e intracelulares. As primeiras podem ser recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos. As intracelulares são extraídas mediante rompimento da parede celular, através de precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou ultrafiltração, porém isso torna a recuperação destas mais difícil seu rendimento menor, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular (UMSZA GUEZ, 2009).

3.1.1 Lipases

As lipases são um grupo de enzimas capazes de catalisar a hidrólise das ligações ésteres de triacilgliceróis resultando em ácidos graxos livres e glicerol. São produzidas por

animais, vegetais e diferentes micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) (FREITAS *et al.*, 2016; KOBLITZ, 2008).

As lipases microbianas têm sido muito utilizadas em diferentes segmentos como: na indústria de alimentos para maturação acelerada de queijos, panificação, produção de óleos e gorduras (manteiga de cacau, margarinas), surfactantes, entre outros; na indústria química para a formulação de detergentes e síntese de lubrificantes; na área ambiental para tratamento de efluentes; na indústria têxtil para remoção residual de peles/ couros; refino de seda; na indústria de rações para melhorar a palatabilidade; na indústria de cosméticos para auxiliar na penetração de produtos para “permanentes” de cabelo; na indústria farmacêutica para síntese de amidas precursoras de análogos da penicilina; na área da medicina para auxiliar na digestão e em análises clínicas (KOBLITZ, 2008).

A fermentação submersa (FSm) tem sido preferida para a produção de lipases microbianas (MESSIAS *et al.*, 2011), mas se encontram na literatura, muitos trabalhos com obtenção através de FES, utilizando resíduos oleosos ou resíduos fibrosos enriquecidos com óleo, tanto com fungos e bactérias onde foram registradas atividades entre 15 U/ g e 932 U/ g (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de atividades de lipases obtidas por diferentes micro-organismos e substratos em FES

Micro-organismo	Substrato	Atividade de Lipase (U/g)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo e casca de soja	25 U/g	Reinehr (2016)
<i>Aspergillus ibericus</i>	Farelo de trigo e bagaço de azeitona	90,5 U/g	Oliveira <i>et al</i> (2016)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Bagaço de cana de açúcar, semente de girassol e azeite de oliva	72,3 U/g	Liu <i>et al</i> (2016)
<i>Schizophyllum commune</i>	Sementes de <i>Leucaena leucocephala</i>	146,5 U/g	Singh <i>et al</i> (2014)
<i>Thermomucor indiciae</i>	Bagaço de cana de açúcar e óleo de soja	15 U/g	Ferrarezi <i>et al</i> (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Bagaço de cana de açúcar	138.37 U/g	Vaseghi <i>et al</i> (2012)
	Trigo	30 U/g	Vaseghi <i>et al</i> (2012)
	Resíduo da extração de óleo	120 U/g	Santiis-Navarro (2011)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Resíduo de fruto da mamoneira	155U/g	Godoy <i>et al</i> (2011)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Torta de semente de pinhão manso desengordurado	932 U/g	Joshi, Mathur, Khare (2011)
<i>Bacillus megaterium</i>	Farelo de trigo	18,6 U/g	Sekhon <i>et al</i> (2004)

<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo com óleo de oliva	630 U/g	Mahadik (2002)
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de óleo de babaçu	30,3 U/g	Gombert <i>et al</i> (1999)
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Torta de óleo de gergelin e Bagaço de cana de açúcar e torta de oliva	363,6 U/g 79,6 U/g	Kamini (1998) Cordova <i>et al</i> (1998)

3.1.2 Pectinases

As pectinases são um grupo de enzimas produzidas por vegetais e micro-organismos que degradam os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Inicialmente podem ser divididas em: enzimas desmetoxilantes (pectinaesterases) e enzimas despolimerizantes [poligalacturonases (PG), pectatolases ou pectinase]. São classificadas quanto ao: substrato preferencial (pectina, ácido pectico ou oligo-D-galacturonato); mecanismo de ação (transeliminção ou hidrólise) e tipo de clivagem [aleatório (endo) ou terminal (exo)] (KOBLOITZ, 2008; FAVELA-TORRES *et al*, 2006).

As pectinases podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças e são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para: extração e clarificação de sucos de frutas, extração de óleo vegetal, processamento de bebidas alcoólicas, entre outros (KOBLOITZ, 2008; FAVELA-TORRES *et al*, 2006).

Nos últimos anos, trabalhos na literatura têm relatado a produção de pectinases por muitos micro-organismos. Alguns exemplos podem ser observados na Tabela 2, com atividades entre 5,6 U/g a 265 U/g. Jayani, Saxena e Gupta (2005) mencionam que a obtenção de pectinases se dá principalmente por fungos mas que já foram encontradas em bactérias do gênero *Bacillus subtilis*. Jacob e colaboradores (2008) relataram a produção de pectinases por actinobactérias (*Streptomyces lydicus*) isolados de estuários e áreas marinhas.

Tabela 2- Exemplos de atividades de pectinases obtidas por diferentes micro-organismos e substratos em FES

Micro-organismos	Substrato	Atividade de Pectinase (U/g)	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	Polpa cítrica e bagaço de cana	40 U/g	Biz <i>et al</i> . (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Cascas de citros	265 U/g	Rodríguez-Fernández <i>et al</i> (2011)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	Farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de	86,4 U/g	Umsza Guez (2009)

	cana		
<i>Aspergillus awamori</i>	Resíduo de uva	38 U/g	Botella <i>et al</i> (2007)
<i>Aspergillus sojae</i>	Substratos a base de milho	30,55 U/g	Ustok, Tari e Gogusb (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de girassol	45,9 U/g	Patil e Dayanand, (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e farelo de arroz	36,3 U/g	Debing <i>et al</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e farinha de soja	18 U/g	Castilho, Alves e Medronho (2000)
<i>P. viridicatum</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo	5,6 U/g (endo-PG)	Silva <i>et al</i> (2005)
<i>P. viridicatum</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo	46,4 U/g (exo-PG)	Silva <i>et al</i> (2005)
<i>T. aurantiascus</i>	Farelo de trigo e bagaço de laranja	43 U/g	Martins <i>et al</i> (2002).

A estabilidade térmica das enzimas obtidas é importante na seleção para aplicações biotecnológicas. Jayani, Saxena e Gupta (2005) apontaram que a maioria das PG produzidas por diferentes micro-organismos têm pH ótimo entre 3,5 a 5,5 e temperatura ótima entre 30 a 50°C, mas já foram relatadas PG com pH ótimos de 3,0 e outra a 11,0. Singh, Plattner, Diekmann (1999) relataram PG termoestável com atividade máxima a pH 11,0 e temperatura 69 °C. Já para as liases o pH ótimo é numa faixa mais alcalina 7,5 a 10,0 e temperatura ótima de 40 a 50°C, mas também há relato de liase com atividade ótima a pH 5,0.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4. 2011.

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; PRADO-BARRAGÁN, PA; RODRÍGUEZ-HERRERA, R., MARTÍNEZ-HERNANDEZ, JL; CONTRERAS-ESQUIVEL, JC. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 354-366. 2008.

BASHA, N. S.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme l-asparaginase from marine actinomycetes by solid state and submerged

fermentation: Purification and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, 2009.

BISPO, A. S. da R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas - BA. 2010.

BISPO, A. S. R.. **Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas Produzidas por Actinobactérias**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2015.

BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54-62, 2016.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42 p. 98, 2007.

BRASIL. Sistema de Análise de Informações de Comércio Exterior - AliceWeb, Departamento de Comércio Exterior, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em <www.aliceweb.mdic.gov.br/index/home>, acessado em 05/07/2017 (a).

BRASIL. Licuri. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica - Ministério da Educação, 2006. Disponível em <http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/cartilha_licuri.pdf>, acessado em 09/08/2017 (b).

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. LM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 45-50, 2000.

CHI, WJ.; LIM, JH.; PARK, DY.; PARK, JS.; HONG, SK.. Production and characterization of a thermostable endo-type β -xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 11, p. 1736-1743, 2013.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. **Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 5, 75–78. 1998.

CREPALDI, I. C.; ALMEIDA-MURADIAN, L. D.; RIOS, M. D. G.; PENTEADO, M. V. C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, Y.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 244-250, 2006.

DOS SANTOS, T. C.; ABREU F. G.; DE BRITO, A. R.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *aspergillus niger* e *rhizopus sp.* durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222-233, 2016.

DRUMOND, M. A. **Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007.

EL-HAWARY, F. I.; MOSTAFA, Y. S. Factors affecting cellulose production by *Trichoderma koningii*. **Acta Alimentaria**, v. 30, p. 3-13, 2001.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 221, 2006.

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H. SILVA, R. da. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 106-113, 2014.

FRADE, P. Gastronomia Brasileira, ingredientes típicos, licuri, cupuaçu e buriti. Disponível em <http://www.petitgastro.com.br/gastronomia-brasileira-ingredientes-tipicos-licuri-cupuacu-e-buriti/> Acessado em 09/08/2017.

FREITAS, M.; GUDINA, E. J.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R.; GONÇALVES, L. R. B. Produção de lipase a partir de *Candida rugosa* NRRL Y-95 utilizando meio de cultura contendo resíduos agroindustriais. In: **COBEQ 2016-XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química)**, p. 1-8. ABEQ, 2016.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L.; FREIRE, D. M. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945-953, 2011.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D. M. G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using Babassu oil cake as substrate.** *Process Biochem.* 35, 85–90. 1999

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.

GONÇALVES, L. G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista. 2016.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in Biotechnology.** Academic Press, London. 1988.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) And Segment Forecasts To 2024.** Publicado em junho de 2016, nº978-1-68038-022-4. Disponível em <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>>. Acessado em 19/04/2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **Industrial Enzymes Market Analysis By Product (Carbohydrase, Lipases, Proteases, Polymerases & Nucleases and Others), By Application (Textile, Feed Additive and Food Processing), By End-Use (Food & Beverage, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, and Wastewater) And Segment Forecasts To 2024.** Publicado em maio de 2016, nº 978-1-68038-844-2. Disponível em <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market>> Acessado em 04/07/2017.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, 37, 272-277. (2005)

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Tabela 289 – Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo.** 2015. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado>>. Acessado em 05/07/2017.

JACOB, N.; NILADEVI, K. N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. **Microbiological Research**, n. 163, p.538—544, 2008.

JANG, Hung-Der; CHEN, Kuo-Shu. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931 - 2944, 2005.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake.** **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, p. 1-10, 2017.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 7, p. 258-265, 1985.

LICURI BRASIL. Disponível em <https://licuribrasil.16mb.com/index.php?route=common/home>> Acessado em 09/08/2017.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel processing technology**, v. 106, p. 303-309, 2013.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MANPREET, S.; SAWRAJ, S.; SACHIN, D.; PANKAJ, S.; BANERJEE, U. C. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2005.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. de M.. Produção de alimentos x desperdício: Tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola–Revisão. **Revista da FZVA**, v. 9, n. 1, 2002.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365-73, 2011.

MEENA, B.; RAJAN, L. A.; VNITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical by products. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 145, 2013.

MELO, F. V. S. T.; ABREU, R. D.; NETO, M. A. C.; MENDES, D. B.. Inclusão do bagaço de licuri na alimentação de codornas de corte na fase inicial e de crescimento. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 252, 2016.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32(2), 213-234, 2011.

NELSON, D. L.; LENINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed W. H. Freeman, USA, 2004.

OLIVEIRA, F.; MOREIRA, C.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

OROZCO, A. L.; PÉREZ, M. I.; GUEVARA, O.; RODRÍGUEZ, J.; HERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; ARIAS, M. E. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 81, n. 2, p. 247-252, 2008.

PALMA, Marcia B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M.. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, n. 1-9, p. 1137-1145, 2000.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p.2054, 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. de; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C. D.; REIN, P. W. Environmental parameters. **Solid substrate cultivation**, p. 65, 1992.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

REINEHR, C. O.; BORTOLUZZI, L.; DE MORAIS, V. Q.; SMANIOTTO, T. M.; ZEN, C. K.; DE OLIVEIRA, D., ... & COLLA, L. M. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. **RECEN-**

Revista Ciências Exatas e Naturais, v. 18, n. 1, p. 97-115, 2016.

RICARD, M; REID, I. D. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. **Enzyme and microbial technology**, v. 34, n. 5, p. 499-504, 2004.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RODRIGUES, H. C. S. R.; SOUZA, C. O.; UMSZA GUEZ, M. A.; CARVALHO, A. L. Produção de enzimas de interesse alimentício através de fermentação em estado sólido – Prospecção tecnológica. **IV Workshop de pesquisa, tecnologia e inovação (PTI) e II Simpósio internacional de inovação e tecnologia (SIINTEC)**. SENAI-CIMATEC, Salvador –Bahia. 2016.

RODRIGUEZ-COUTO, S.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291, 2006.

SALAZAR, L.; JAYASINGHE, U. Fundamentals of purification of plant viruses. **Techniques in plant virology CIP. Training Manual JO Virus Purification Int Potato Centre, Peru**, p. 1-10, 1999.

SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T., BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource Technology**. 102 (2011) 10080–10084.

SANTOS, HMV; SANTOS, V. de J. **Estudo etnobotânico do licuri *Syagrus coronata* (Martius) Beccari em Senhor do Bonfim, Bahia**. 2002.

SEKHON, A.; DAHIYA, N.; TEWARI, R. P.; HOONDAL, G. S. Production of lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 using wheat bran in solid substrate fermentation. **Indian J. Microbiol.** 44, 219–220. 2004.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SINGH, M. K.; SINGH, J.; KUMAR, M.; THAKUR, I. S. Novel lipase from basidio mycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 92-99, 2014.

SINGH, S. A.; PLATTNER, H.; DIEKMANN, H. Exopolygalacturonatylase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3, p. 420-425, 1999.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, Carlos R. **Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submerge en relation avec la degradation d'amidon cru et la production d'acide l (+) lactique**. Tese (Doutorado). 1992.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal** , Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 205- 218, 2003.

UMSZA GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indiciae-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.

USTOK, F. I.; TARIC.; GOGUSB, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 322, 2007.

VASEGH I. Z.; NAJAFPOUR, G.D.; MOHSENI, S.; MAHJOUR S.; HOSSEINPOUR, M. N. Lipase Production in Tray-Bioreactor via Solid State Fermentation under Desired Growth Conditions. **Iranica Journal of Energy & Environment** 3 (1): 59-65, 2012

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. 2011.

Capítulo II

Artigo I: Produção de enzimas de interesse alimentício através de fermentação em estado sólido - prospecção tecnológica

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

HebCristyni S. R. Rodrigues¹, Carolina Oliveira Souza², Marcelo Andrés Umsza Guez³,
Andrea Limoeiro Carvalho⁴

¹UFBA - Universidade Federal da Bahia, e-mail: hebcristyni@gmail.com

²UFBA - Universidade Federal da Bahia, e-mail: carolinaods@hotmail.com

³UFBA - Universidade Federal da Bahia, e-mail: marcelo.umsza@ufba.br

⁴UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: limoeiro@uefs.br

ENZYMES PRODUCTION OF FOOD INTEREST BY SOLID STATE FERMENTATION - TECHNOLOGICAL PROSPECTION

Resumo: A fermentação em estado sólido, dentre outras aplicações, tem sido empregada para obtenção de enzimas que são amplamente usadas em vários segmentos industriais. O objetivo desta prospecção foi fazer um mapeamento dos documentos de patentes sobre obtenção de enzimas por esse tipo de fermentação e identificar as principais enzimas obtidas. Para isso, foi feita uma pesquisa no Espacenet e usados 54 documentos de patentes. Constatou-se que houve um crescimento no número de depósitos nos últimos 9 anos e que a China é a maior detentora. Observou-se também que tanto universidades quanto empresas estão investindo nas pesquisas. As enzimas mais obtidas foram carboidrases, proteases e oxirredutases. Dentre as carboidrases, destacam-se as celulasas, xilanases e amilases.

Palavras-chaves: *fermentação; enzimas; carboidrases; proteases; oxidorredutases*

Abstract: The solid-state fermentation, among other applications, has been employed to obtain enzymes that are widely used in various industries. The purpose of this prospection was to map patents documents about enzymes production by this type of fermentation and

identify the most obtained enzymes. For this, the research was done in Espacenet and used 54 patent documents. It was found that there was an increase in the number of deposits in the last 9 years and that China holds the majority. It was also observed that both universities and companies are investing in researches. Most obtained enzymes were carbohydrases, proteases and then oxidoreductases. Among the carbohydrases, most were cellulases, xylanases and then amylases.

Keywords: fermentation; enzymes; carbohydrases; proteases; oxidoreductases

1. INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido (FES), segundo Pandey [1], é definida como: “a fermentação de um substrato sólido e úmido na ausência ou quase ausência de água livre”. Quando comparado com processos tradicionais de fermentação submersa, a FES apresenta diversas vantagens como produtos mais estáveis, frequentemente maior produtividade, menor demanda de água, baixo custo de equipamentos envolvidos e baixo custo de subprodutos agroindustriais [2].

Na FES, a natureza do substrato desempenha um papel importante na produtividade de enzimas e deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação de micro-organismos. Também devem prover minerais para a produção de enzima. Os substratos mais comuns para a FES são: arroz e seus derivados, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, palha de trigo, sementes de uva e farelo de mandioca, bagaço de cana e farelo de trigo, farelo de milho, casca de frutas, grãos de cereais, madeira e palha [3, 4, 5].

As enzimas de origem microbiana têm sido exploradas com bastante frequência devido às suas propriedades e à diversidade de micro-organismos dos quais podem ser obtidas.

Segundo informações de Abrunhosa *et al* [6], o mercado global de enzimas foi estimado em US 4.411,6 milhões em 2013. Alimentos e bebidas dominam o mercado global de enzimas respondendo por mais de 35% do volume total. As empresas Novozymes, Danisco e DSM dominam o mercado global respondendo por mais de 70% deste. As carboidrases são as enzimas mais obtidas e o crescimento da demanda por amido nas indústrias de alimentos e bebidas tende a aumentar a utilização destas. Em seguida, aparecem as proteases e depois as

lipases e polimerases/ nucleases. Projeções até 2020, para América do Norte, no mercado de consumo dessas enzimas, apontam crescimento em todas as suas classes.

Na produção de alimentos, as enzimas desempenham papel de destaque pois interferem na composição, processamento e deterioração. Dentre as enzimas de interesse alimentício, algumas das mais usadas são: as pectinases, usadas em processamento de sucos de frutas, processamento de vinhos, etc.; as proteases, usadas na clarificação de cervejas, na produção e na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais como o aspartame; e as lipases, usadas na produção de margarinas, maturação de queijos, panificação, síntese de aromas, etc. [7].

A produção de enzimas por micro-organismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animais e vegetais [8].

Entre as enzimas de alto interesse comercial estão as glicosidases, a exemplo: amilases, celulases, xilanases e quitinases. Todas elas são importantes na degradação de biomassa [9].

Este estudo prospectivo teve como objetivo realizar um levantamento do número de documentos de patentes depositadas mundialmente e relacionadas com a obtenção de enzimas por fermentação em estado sólido, bem como, identificar as principais classes de enzimas obtidas por esse tipo de fermentação, a fim de estimular a inovação tecnológica na área de biotecnologia.

2. METODOLOGIA

Nesse trabalho foi realizada uma pesquisa na base de dados *online* do escritório europeu Espacenet (EP), que abrange patentes depositadas e publicadas em mais de 90 países, incluindo os pedidos de patentes depositadas no Brasil e nos Estados Unidos. Para a pesquisa, foi elaborada uma estratégia de busca que combinou os campos da Classificação Internacional de Patentes com as palavras-chaves (Tabela 1).

Tabela 1. Termos e códigos usados na busca de patentes depositadas na base de dados Espacenet.

Palavras-Chaves e/ou Código de Classificação	Total de Patentes
---	--------------------------

Enzyme	> 10.000
Fermentation	> 10.000
Solid State fermentation	1584
Enzyme and fermentation	6.728
Enzyme and solid state fermentation	156
C12N9	> 10.000
C12M	> 10.000
Solid state fermentation + C12N9	73
Enzyme and solid state fermentation + C12N9	36

Pesquisas usando isoladamente os termos “*enzymes*” e “*fermentation*” e os códigos “C12N” e “C12M” (ver significado dos códigos na Tabela 2) resultaram em mais de 10.000 documentos. Para o termo “*solid state fermentation*” foi encontrado um número representativo de patentes, cujos produtos da fermentação não eram enzimas. A associação das palavras-chaves “*solid state fermentation*” com o código de classificação C12N9 permitiu a obtenção de 73 documentos.

Tabela 2. Significados dos códigos de patentes segundo IPC

Código	Especificação
C12N9	Enzimas; Proenzimas
C12M	Aparato para enzimologia ou microbiologia; Aparato para cultura de micro-organismos para produção de biomassa, para crescimento de células ou para obtenção de produtos por fermentação ou metabólitos; biorreatores ou fermentadores.

Após análise das 74 patentes que apresentaram os descritores mais próximos ao tema proposto e exclusão dos documentos da mesma família e/ ou fora do objetivo, foram

selecionadas 54 patentes para o tratamento de dados. Os dados foram exportados da plataforma Espacenet, utilizando o editor de arquivos CSVed versão 2.3.4 (2015) e os gráficos foram gerados através do programa Microsoft Excel versão 2007.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a evolução anual de depósito de patentes sobre a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. O primeiro depósito feito ocorreu no ano de 1986, sobre produção de peroxidase, dos depositantes ShinmenYoshiji; AsamiSumio; AmanoNorihide; AmachiTeruo; YoshizumiHajime, da empresa Suntory Ltd, do Japão. Após esse ano, somente em 2002 voltou a haver depósito, com um documento por ano até 2006. Somente a partir de 2007, iniciou-se o crescimento no número de depósitos de patentes, destacando-se o ano de 2013, com 9 patentes. Esse crescimento pode ser decorrente de um possível incentivo às pesquisas, aliado ao crescimento no mercado mundial de enzimas e à diversidade de possíveis aplicações destas em vários segmentos da indústria, inclusive de alimentos e bebidas.

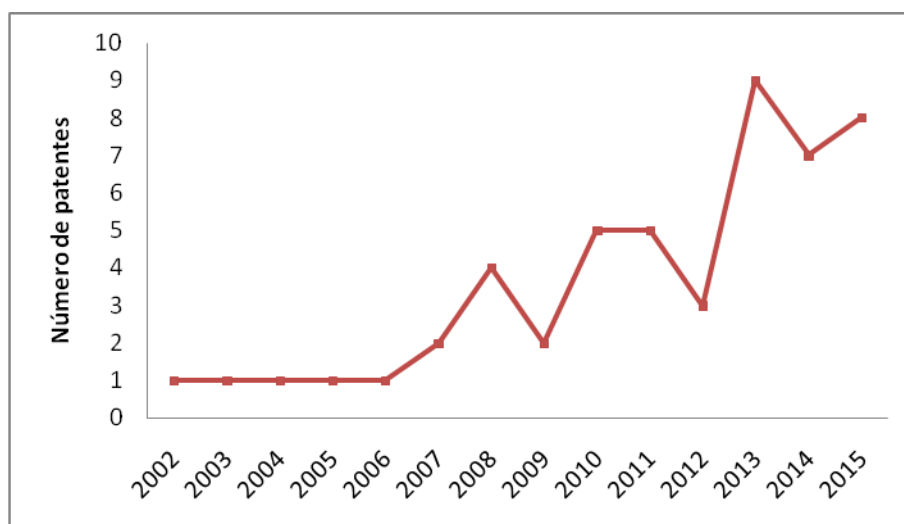


Figura 1. Evolução anual de depósito de patentes de produção de enzimas por FES

No que se refere aos códigos de classificação internacional, a Figura 2 mostra os códigos encontrados. Não foi encontrado um código específico para fermentação em estado sólido. A maioria das patentes possui mais de um código. O código mais encontrado foi o C12N9 (enzimas), seguido do C12R1 (processos usando micro-organismos) e C12N1 (micro-

organismos). Esses dados são imprescindíveis para viabilizar o acesso às informações tecnológicas e legais que contemplam cada patente analisada.

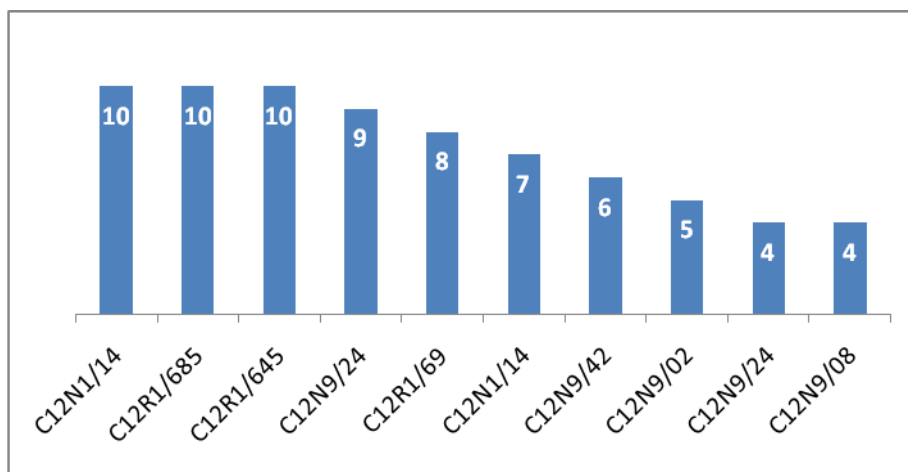


Figura 2. Número de patentes por código de classificação internacional

De acordo com análise dos documentos de patentes referentes aos países nos quais se originou a tecnologia patenteada, é evidente que esta tecnologia se encontra centralizada na China (80%) (Figura 3). Contudo, outros países como Estados Unidos, França e Coréia também aparecem como detentores. O Brasil não aparece nesse cenário, o que pode ser justificado pelo baixo investimento do país em Pesquisa e Desenvolvimento na área e/ou pelo pouco hábito de proteção das novas tecnologias por intermédio da propriedade industrial.

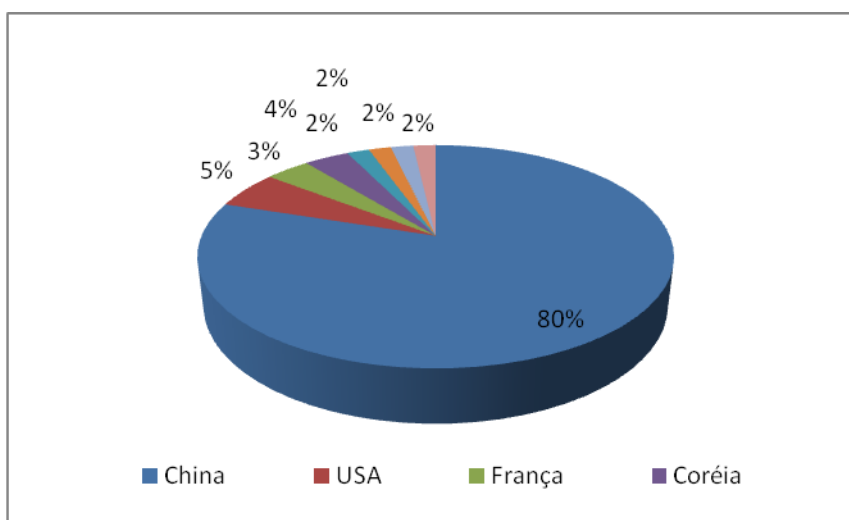


Figura 3. Número de patentes por país depositante

A Figura 4 mostra que, dentre os tipos de entidades depositantes, 54% dos documentos de patentes selecionados foram depositados por universidades e institutos, 44% por empresas e 2% por inventores independentes. Isso mostra que há um equilíbrio nas produções de patentes entre as academias e as empresas, sendo que as academias apresentam um percentual um pouco maior.

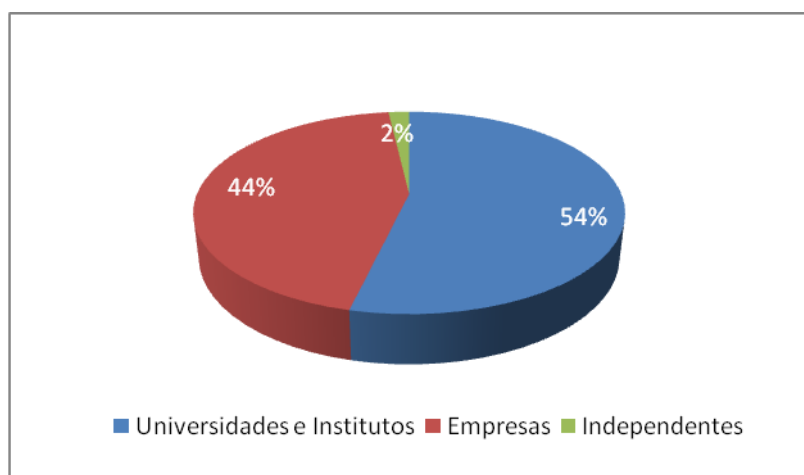


Figura 4. Distribuição das patentes depositadas por tipo de depositante

Dentro deste contexto, 4 universidades (Jiangnan, Jimei, Northeast Agricultural e Tianjin Science & Tech) e 4 empresas (Beijing Leadman Biochemistry C, Hunan Hong Ying Xiang Biochemistry Industry Co Ltd, Jingyan Chengâ, e Zhejiang Acad Agricultural SCIâ) estão empatadas com os maiores números de depósitos das patentes selecionadas, 2 por depositante (Figura 5). Num universo de 47 depositantes e 54 patentes, esses números mostram que as pesquisas estão pulverizadas entre diversas organizações que estão gerando novos conhecimentos e aprimorando as técnicas de produção de enzimas por fermentação em estado sólido.

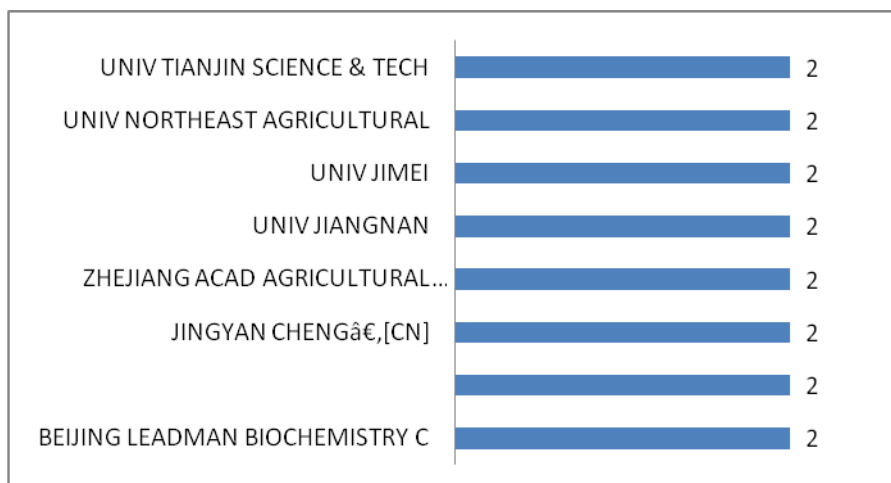


Figura 5. Número de patentes por depositante

Quando analisadas as produções por inventor, o chinês Zhang Ming possui o maior número de patentes, 3 no total (Figura 6).

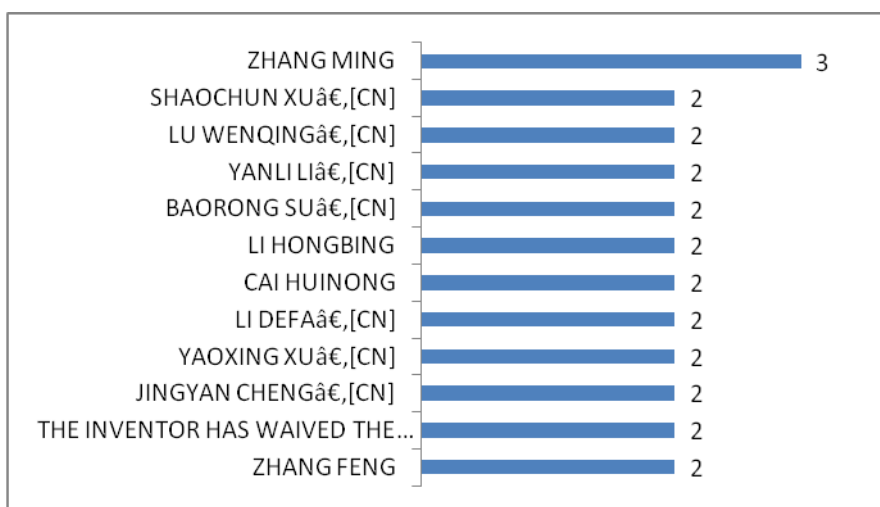


Figura 6. Número de patentes por inventor

Analisando as enzimas obtidas nas patentes registradas, verifica-se que a maioria pertence ao grupo das carboidrases com 48%, seguida das proteases 23%, que também são as duas classes de enzimas mais comercializadas no mercado. Dentre as carboidrases as que mais se destacam são as celulases, xilanases, amilases e pectinases. Essas enzimas são muito usadas nas indústrias de alimentos e no caso das celulases nas indústrias de papel e celulose.

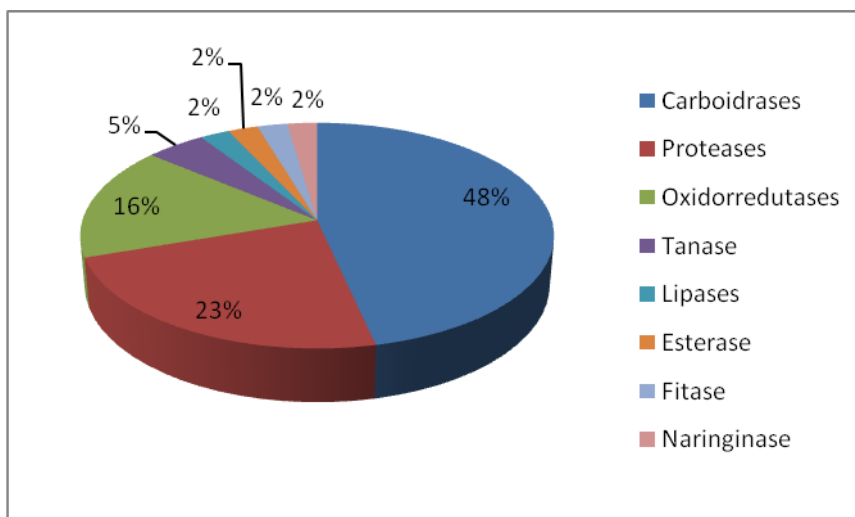


Figura 7. Tipos de enzimas obtidas nas patentes depositadas

4. CONCLUSÃO

De acordo com o levantamento, houve um crescimento no número de depósitos de patentes de obtenção de enzimas por FES nos últimos 9 anos. A China é detentora da maioria das patentes depositadas. Tanto universidades/institutos quanto empresas, estão investindo em pesquisas na área. O Pesquisador chinês Zhang Ming possui o maior número de patentes. As carbohidrases são as enzimas mais obtidas, seguida das proteases e oxirredutases. Dentre as carbohidrases as enzimas mais obtidas foram celulases, xilanases e amilases.

As enzimas apresentam uma ampla possibilidade de aplicações em diversos setores e processos, oferecendo grandes oportunidades de pesquisas e patentes com identificação de diferentes micro-organismos, substratos e parâmetros de processo.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.
- ² ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 351-355, 2011.
- ³ FARINAS, Cristiane S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

- ⁴ MANPREET, S.: SAWRAJ, S.; SACHIN, D.: PANKAJ, S.; BANERJEE, U. C. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2005.
- ⁵ SOCCOL, Carlos R.; VANDENBERGHE, Luciana PS. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.
- ⁶ GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) And Segment Forecasts To 2024.** Disponível em <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>>. Acessado em 19/04/2016.
- ⁷ KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ⁸ GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.
- ⁹ BISPO, A. S. da R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas - BA. 2010.

Capítulo III

**Artigo II: Produção de lipase e pectinase por fermentação em estado sólido
utilizando licuri como substrato**

PRODUÇÃO DE LIPASE E PECTINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI COMO SUBSTRATO

Heb Cristyni Santa Rosa Rodrigues¹, Andrea Limoeiro Carvalho², Marcelo Andrés Umsza Guez¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina – Salvador - BA.

² Universidade Estadual de Feira de Santana - Feira de Santana – BA.

Resumo

As enzimas têm apresentado papel cada vez mais significativo em diversos setores industriais. Adicionadas a processos produtivos podem acelerar reações e gerar uma série de novos produtos. Uma forma de obtenção dessas enzimas é através da fermentação em estado sólido (FES), utilizando micro-organismos e resíduos agroindustriais como substratos. Este estudo visou verificar a influência da umidade e proporção de substrato, na FES, para a produção de lipase e pectinase utilizando duas cepas de actinobactérias: CDPI-30 (*Arthrobacter polychromogenes*) e CDPA-32 e resíduos de licuri e trigo. A FES foi realizada a 28°C por 12 dias. Diferentes proporções de farelo de trigo (FT)/ torta de licuri desengordurada (TLD): 0/70%, 10/60%, 35/35%, 60/10% e 70/0% e casca de licuri (CL), fixada em 30% foram utilizadas. A umidade do meio variou de 29 a 67%. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central foi adotado para análise dos resultados. A proporção FT/TLD não afetou a produção das enzimas pela CDPI-30. Com a CDPA-32 a proporção foi significativa para a produção de lipase, mas não para a produção de pectinase. Os meios preparados com umidade de 67% e iguais proporções de FT e TLD (35/35%) apresentaram as maiores atividades enzimáticas para as duas enzimas, sendo 840,46 U/g para lipase e 15,53 U/g para pectinase. Os resíduos do licuri apresentaram-se como uma opção de substrato para a produção de lipase e pectinase por FES, sendo ainda pouco explorado.

Palavras-chave: FES, torta de licuri, enzima, lipase, pectinase, actinobactéria.

1. INTRODUÇÃO

As crescentes aplicações de enzimas em diversos setores industriais têm despertado interesse de pesquisadores em diversas partes do mundo para estudos científicos e aumento de escala gerando muitos investimentos em pesquisas. As enzimas são ótimos catalisadores e apresentam vantagens em relação a catalisadores não enzimáticos por não requererem altas temperaturas e valores extremos de pH. Devido à sua grande especificidade, catalisam transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Os processos industriais que as empregam são, em geral, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo (COLEN, 2006).

Dentre as enzimas de grande interesse, além de carboidrases e proteases estão as lipases e as pectinases (RODRIGUES *et al*, 2016). As lipases atuam hidrolisando óleos e

gorduras e liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Apresentam larga possibilidade de aplicações tendo sido empregadas nas indústrias de alimentos (para maturação acelerada de queijos, produção de margarinas, panificação, etc); na indústria química (para produção de detergentes, lubrificantes); indústria farmacêutica; de cosméticos; de couros; de papel e celulose; de rações; de tecidos; tratamento de efluentes. As pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo $\alpha 1,4$ entre unidades de ácidos galacturônicos ou de seu derivado metoxilado. Seus substratos são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Têm sido usadas nas indústrias de sucos de frutas para facilitar a extração das polpas, aumentar rendimento, auxiliar na clarificação de sucos; na indústria de vinhos, para auxiliar na extração de fenólicos, cor e sabor, aumento de rendimento e na clarificação de vinhos (KOBLOITZ, 2008).

A FES é definida como a fermentação de um substrato sólido e úmido na ausência ou quase ausência de água livre e tem sido muito estudada para a produção destes biocatalizadores (PANDEY, 2003). Além de apresentar, frequentemente, boa produtividade, uma das principais vantagens da FES é de ser uma tecnologia de baixo custo, principalmente devido aos equipamentos e substratos utilizados, que são, normalmente, resíduos agroindustriais (ROBINSON, SINGH, NIGAM, 2001; AGUILAR *et al*, 2008). Os fatores que mais interferem no desempenho da FES são: o tipo de substrato empregado, devido à grande heterogeneidade dos meios; o micro-organismo utilizado e a umidade do meio (ABRUNHOSA, VENÂNCIO, TEIXEIRA, 2011).

Dentre os substratos mais utilizados em FES estão os resíduos do processamento de: trigo, soja, cana-de-açúcar, laranja e arroz, mas também são encontrados trabalhos em que foram utilizados resíduos de processamento de frutas e vegetais, mandioca, coco, oliva, palma forrageira e milho (KAUR, GUPTA, 2017; RAMOS-IBARRA *et al*, 2017; GONÇALVES, 2016; REINEHR, 2016; ARAÚJO, 2016; DOS SANTOS, 2016; OLIVEIRA *et al*, 2016; PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, 2013; USTOK; TARI; GOGUSB, 2007; VANDENBERGHE, 2000). Outro possível substrato para FES, ainda pouco estudado, é a torta do licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari), resíduo gerado a partir da extração do óleo de suas amêndoas. Esse resíduo é composto de 41% de substâncias não azotadas, 19% de proteínas, 16% de celulose e 11% a 12% de óleo (GOMES, 1977 citado por SANTOS, SANTOS, 2002).

Dentre os micro-organismos utilizados em FES, os mais freqüentes são os fungos, como exemplo: *Aspergillus niger*; *Aspergillus sp*; *Aspergillus sojae*; *Rhizopus sp*; *Rhizopus*

oryzae; *Rhizopus microsporus* (DOS SANTOS 2016; REINEHR, 2016; GONÇALVES, 2016) seguidos das bactérias *Bacillus subtilis*; *Bacillus megaterium*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* (KAUR, GUPTA, 2017; SEKHON *et al*, 2004; PALMA *et al*, 2000; SOCCOL *et al*, 2017). Alguns estudos recentes vêm apontando as actinobactérias (bactérias Gram-positivas com crescimento filamentoso) como biocatalizadores emergentes de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental e de alta resistência a condições extremas (BISPO, 2015; BISPO, 2010, OROZCO *et al*, 2008).

Este estudo visou verificar a influência da umidade e proporção de substrato na FES para a produção de lipase e pectinase utilizando duas cepas de actinobactérias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos, manutenção da cultura e preparo dos inóculos

Duas cepas de actinobactérias, cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPEM UEFS), codificadas como CDPI-30 (identificada como *Arthrobacter polychromogenes*) e CDPA-32 foram conservadas a -20°C em criotubos contendo solução de glicerol a 20% até sua utilização.

As actinobactérias foram ativadas em placas de petri contendo meio YM [Extrato de levedura 0,3% (m/v); Extrato de malte 0,3% (m/v); Peptona 0,5% (m/v); Glicose 1% (m/v); Ágar bacteriológico 2% (m/v)] e incubadas a 28°C em BOD por 12 dias. Foram retiradas das placas (com auxílio de bases de ponteiros estéreis) 6 “*plugs*”/fragmentos de meio com cerca de 5mm de diâmetro com micro-organismos e inoculados em arroz parboilizado (previamente hidratado e esterilizado a 120°C/ 55 min) e incubados a 28°C em BOD por 12 dias. Ao final desse período, foram adicionados a cada frasco 75 mL de solução de NaCl estéril a 0,85%, submetidos a agitação leve e temperatura ambiente por 30 min (para extração dos micro-organismos) seguida de filtração em gaze estéril, de acordo com metodologia de Bispo (2015).

2.2 Desengorduramento da torta de licuri

Devido ao alto teor de lipídios na TL, foi feito um desengorduramento desta de forma a permitir a umidificação dos meios. Em Erlenmeyers de 1L, porções de 40 gramas de torta de licuri foram misturadas a volumes de 240 mL de hexano e submetidas a 180 rpm, a 25°C, por

48 h e em seguida filtradas. Esse processo se repetiu por mais duas vezes. Após a terceira filtração a torta foi submetida a secagem a 55°C por 10h para a remoção do hexano residual.

2.3 Análise do teor de lipídeos

Para fins de acompanhamento da etapa de desengorduramento e complemento na discussão dos resultados, análises do teor de lipídios foram feitas, em triplicatas, para a TL, TLD e para o FT, pelo método de extração Bligh e Dyer (1959), que utiliza agitação com mistura de clorofórmio, metanol e água.

2.4 Preparação dos meios e fermentação

Os meios fermentativos foram preparados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 20g de substrato cujas composições de farelo de trigo (FT) (Marca: Viva a Natureza) e torta de licuri desengordurada (TLD) (obtida após desengorduramento da TL que foi adquirida da Cooperativa de Produção da Região do Piemonte da Diamantina - COOPES) estão descritas na Tabela 1. Para dar porosidade ao meio de fermentação foi utilizada a casca de licuri (adquirida da COOPES) e sua porcentagem em peso foi fixada em 30% p/p, segundo a Tabela 1. Os teores de umidade foram ajustados para os valores descritos na Tabela 1 com água e 2% (v/m) de solução nutriente, como descrita por Mandels (1976). A umidade de 67% foi adotada como máxima porque, em teste preliminar, de saturação, percebeu-se que, acima deste valor observava-se água livre no meio o que descaracterizaria uma fermentação em estado sólido. As análises de umidade foram feitas, em triplicata, em balança de umidade com infravermelho (Engineering, Quimiserv), utilizando temperatura de 90°C e 3g de amostra.

Essas variações dos meios foram preparadas de acordo com o DCCR. Ensaios desse delineamento foram do tipo 2², incluindo quatro (04) ensaios nas condições axiais e três (03) repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios.

Tabela 1 - Valores utilizados no DCCR 2² para produção de enzimas

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Proporção (FT/TLD) (% p/p)	0/70	10/60	35/35	60/10	70/0
Umidade (%)	29	34,5	48	61,5	67

Após a adição da solução nutriente aos substratos nos erlenmeyers, estes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Uma alíquota de 2 mL (10% (v/m)) da suspensão bacteriana (ressuspendida do arroz parboilizado, conforme item 1) foi adicionada a cada Erlenmeyer contendo os substratos esterilizados e incubados a 28°C por 12 dias, adaptado de Santos (2015).

2.5 Extração das enzima

Após a fermentação (12 dias), os meios fermentados foram homogeneizados e alíquotas de 10g foram retiradas, às quais foram adicionados 100 mL de água destilada e agitadas em *shaker* a 100 rpm e temperatura de 26°C por 1h. Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo usando gaze estéril, posteriormente o filtrado foi centrifugado a 5500 rpm por 15 min a 5°C. O sobrenadante (extrato enzimático) foi armazenado em frasco âmbar e congelado a -20°C, segundo Umsza Guez *et al* (2011), adaptado.

2.6 Quantificação da atividade enzimática

Para determinação da atividade de lipase foi utilizada metodologia usada por Bonine (2001), onde 1 mL de solução A [palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol (3 mg/mL)] foi misturada lentamente a 9 mL de solução B [tampão fosfato de sódio 0,05M, Trixon X-100 (2%) e goma arábica (0,5%), pH 7.0 a 37°C]. Em seguida alíquotas de 0,9 mL dessa mistura foram transferidas para tubos de ensaio e deixadas estabilizar sob agitação leve a 37°C. Alíquotas de 0,1 mL de extrato enzimático foram adicionadas a esses tubos. Essas misturas foram deixadas por 1 minuto a 37°C sob leve agitação e imediatamente foram feitas as leituras, em espectrofotômetro a 410 nm, para quantificação do *p*-nitrofenol liberado. Os cálculos para as atividades de lipase foram feitos através da curva de calibração do *p*-nitrofenol.

A atividade de pectinase foi determinada segundo Umsza Guez, *et al* (2009), adicionando-se 0,2 mL de extrato enzimático a 0,8 mL de solução de pectina (1% de pectina em tampão acetato 0,2 M, pH 5,0) submetidos a 60°C por 10 minutos. O ácido D-galacturônico liberado foi medido através do método DNS (3,5 – ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959) e a atividade calculada através da curva de calibração deste.

As atividades enzimáticas foram expressas em U (unidade internacional de atividade, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de substância redutora por minuto) por g de massa seca de substrato. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.7 Delineamento Experimental

A análise estatística dos dados foi feita usando o Software Statistica. O DCCR foi avaliado com 10% de significância. Foi feita uma ANOVA, além das análises dos efeitos e das curvas de nível.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das atividades de lipase e pectinase estão descritos na Tabela 2. As duas cepas de actinobactérias (CDPI-30 e CDPA-32) cresceram em todos os meios preparados e apresentaram atividades para ambas as enzimas. Os ensaios E6 (umidade 67% e proporção FT/TLD 35/35%) apresentaram os maiores valores de atividades para ambas as enzimas e ambas as cepas de actinobactérias.

Tabela 2 Atividades de lipase e pectinase obtidas pela CDPI-30 e pela CDPA-32

Ensaio	Atividade Enzimática					
	Níveis		Lipase		Pectinase	
	Umidade (%)	Proporção (FT/TLD) (%)	CDPI-30(U/g)	CDPA-32(U/g)	CDPI-30(U/g)	CDPA-32(U/g)
E1	-1 (34,5)	-1 (10/ 60)	143,07	203,38	7,25	6,79
E2	+1 (61,5)	-1 (10/ 60)	246,79	273,85	12,38	11,03
E3	-1 (34,5)	+1 (60/10)	139,09	197,42	6,99	6,59
E4	+1 (61,5)	+1 (60/10)	349,40	418,19	11,83	11,91
E5	-1,41 (29)	0 (35/35)	287,30	146,05	6,22	6,09
E6	+1,41 (67)	0 (35/35)	840,46	457,63	14,62	15,53
E7	0 (48)	-1,41 (0/70)	309,62	251,18	8,70	8,61
E8	0 (48)	+1,41 (70/0)	279,56	328,82	9,41	8,99
E9	0 (48)	0 (35/35)	225,30	302,94	8,95	7,90

E10	0 (48)	0 (35/35)	247,00	311,29	8,67	7,98
E11	0 (48)	0 (35/35)	287,91	343,01	8,49	7,61

A atividade de lipase obtida com a cepa CDPI-30 variou entre 139,09 U/g (E3) e 840,46 U/g (ensaio E6) apresentando uma diferença de 83,45% nas diferentes condições de fermentação. Já para a CDPA-32 a atividade variou de 197,42 U/g (E3) até 457,63 U/g (E6), representando 56,86% de diferença (Tabela 2). A atividade lipolítica dos ensaios E3 (umidade 34,5% e proporção FT/TLD 60/10%) apresentaram as menores atividades para as duas cepas. Através da análise de ANOVA (Tabela 3) verificou-se que a atividade enzimática variou significativamente ($p < 0,1$) com a umidade para ambas as cepas.

Tabela 3 - ANOVA para atividades de lipase obtidas por FES com actinobactérias e resíduos de licuri e farelo de trigo

Fator	ANOVA para atividade delipase									
	CDPI-30					CDPA-32				
	SS	Df	MS	F	P	SS	df	MS	F	P
Umidade (%) (L)	150046,5	1	150046,5	6,23	0,055	66913,01	1	66913,01	69,16	0,000
Umidade (%) (Q)	59150,7	1	59150,7	2,46	0,178	1160,65	1	1160,65	1,20	0,323
FT/ TLD (%) (L)	396,8	1	396,8	0,02	0,903	7701,68	1	7701,68	7,96	0,037
FT/ TLD (%) (Q)	5986,8	1	5986,8	0,25	0,639	2319,61	1	2319,61	2,40	0,182
1L x 2L	2840,5	1	2840,5	0,12	0,745	5647,75	1	5647,75	5,84	0,060
Error	120367,1	5	24073,4			4837,27	5	967,45		
Total SS	356814,9	10				87857,97	10			

R^2 (CDPI-30) = 66,26%; R^2 (CDPA-32) = 94,49%

Já a proporção FT/ TLD não afetou significativamente, ao nível de 10% de significância, a produção de lipase pela CDPI-30, como observado para a CDPA-32, para a qual uma maior proporção de FT elevou a produção da enzima. Observa-se ainda uma relação positiva da interação entre as duas variáveis estudadas na produção de lipase pela CDPA-32, o que indica que a associação de ambas as variáveis favorece sua produção. Abaixo seguem os modelos (Equações 1 e 2) com as variáveis dos ensaios para lipase, onde se observam as influências positivas da umidade sobre as atividades dos meios com ambas as cepas de actinobactérias e também da proporção FT/ TLD na CDPA-32:

Equação 1 (CDPI-30):

$$U/g = 254,24 + 274,31 \times U(\%) + 205,52 \times U^2(\%) + 14,11 \times FT/TLD(\%) - 65,38 \times FT/TLD^2(\%) + 53,30 \times (U \times FT/TLD)(\%)$$

Equação 2 (CDPA-32):

$$U/g = 319,17 + 183,18 \times U(\%) - 28,79 \times U^2(\%) + 62,15 \times FT/TLD(\%) - 40,70 \times FT/TLD^2(\%) + 75,15 \times (U \times FT/TLD)(\%)$$

Na literatura, por exemplo, observam-se valores de lipase obtidos em FES que variam de 15 U/g usando bagaço de cana-de-açúcar e óleo de soja, *Thermomucor indicae seudaticae* (FERRAREZI *et al*, 2014), até um valor de 932 U/g com torta desengordurada de semente de pinhão manso, *Pseudomonas aeruginosa* (JOSHI, MATHUR, KHARE, 2011), abrangendo todos os resultados obtidos nos ensaios deste trabalho.

Para a pectinase, utilizando a cepa CDPI-30, a atividade pectinolítica variou de 6,22 U/g no ensaio E5 (umidade 29% e proporção FT/ TLD 35/ 35%) até 14,62 U/g (E6), representando uma variação de 57,45% e com a CDPA-32 variaram de 6,09 U/g (E5) até 15,53 U/g (E6), uma variação de 60,78%, como mostra a Tabela 2. Esses resultados foram analisados, e, através da ANOVA (Tabela 4), verificou-se que a atividade enzimática variou significativamente ($p < 0,1$) apenas com a umidade, para ambas as cepas. Dessa forma, a atividade da pectinase independe da proporção FT/ TLD.

Os valores das atividades de pectinase obtidos nos ensaios estão dentro dos valores mínimo e máximo consultados na literatura: 5,6 U/g usando *P. viridicatum* em bagaços de laranja e farelo de trigo (SILVA *et al*, 2005) até 265 U/g usando *Aspergillus niger* em cascas de citros (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al*, 2011).

Tabela 4 - ANOVA para atividades de pectinase obtidas por FES com actinobactérias e resíduos de licuri e farelo de trigo

Fator	ANOVA para atividade de pectinase									
	CDPI-30					CDPA-32				
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	P
Umidade (%) (L)	59,727	1	59,73	293,0	0,000	65,551	1	65,55	110,30	0,000
Umidade (%) (Q)	3,852	1	3,85	18,9	0,007	9,661	1	9,66	16,26	0,010
FT/ TLD (%) (L)	0,005	1	0,00	0,0	0,883	0,187	1	0,19	0,32	0,599
FT/ TLD (%) (Q)	0,116	1	0,12	0,6	0,484	0,510	1	0,51	0,86	0,397
1L x 2L	0,020	1	0,02	0,1	0,765	0,290	1	0,29	0,49	0,516
Error	1,019	5	0,20			2,971	5	0,59		
Total SS	64,682	0				78,701	10			

R^2 (CDPI-30) = 98,42%; R^2 (CDPA-32) = 96,22%

Abaixo seguem os modelos (Equações 3 e 4) com as variáveis dos ensaios para pectinase, onde se observam as influências positivas da umidade sobre as atividades dos meios com ambas as cepas de actinobactérias.

Equação 3 (CDPI-30):

$$U/g = 8,70 + 5,4 \times U(\%) + 1,66 \times U^2(\%) + 0,05 \times FT/TLD(\%) + 0,29 \times FT/TLD^2(\%) - 0,14 \times (U \times FT/TLD)(\%)$$

Equação 4 (CDPA-32):

$$U/g = 7,83 + 5,73 \times U(\%) + 2,62 \times U^2(\%) + 0,31 \times FT/TLD(\%) + 0,60 \times FT/TLD^2(\%) + 0,54 \times (U \times FT/TLD)(\%)$$

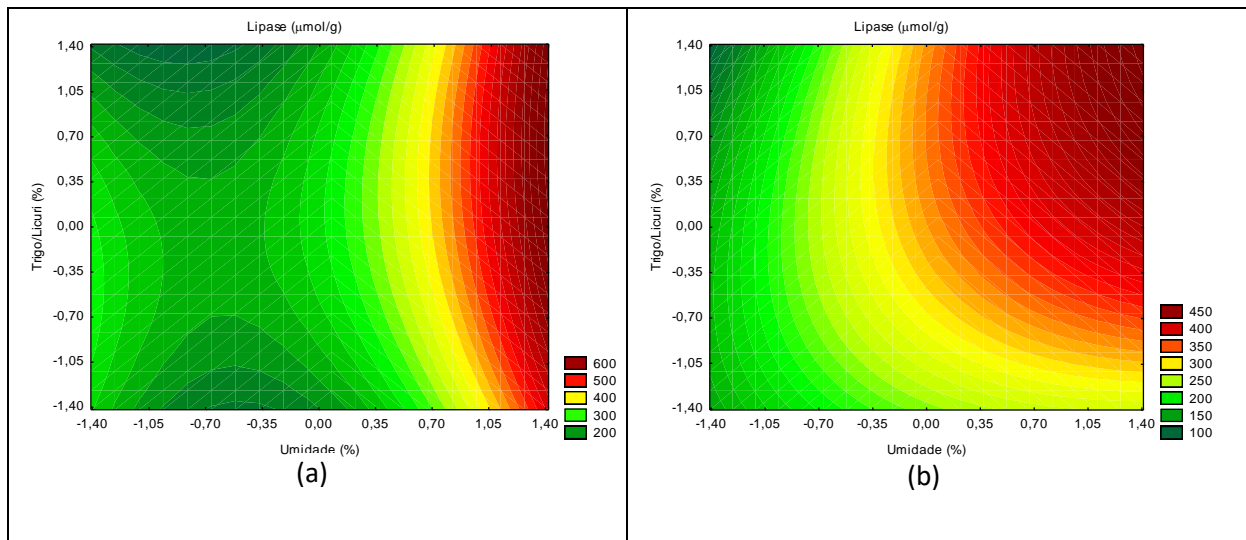
De forma geral, analisando os resultados das tabelas ANOVA e considerando também os gráficos (a), (b), (c) e (d) da Figura 1, pode-se perceber que tanto para lipase, quanto para pectinase obtidas pelas duas cepas de actinobactérias, as regiões de umidades dos meios mais elevadas analisadas (61,5% a 67%) influenciaram positivamente elevando a produção de enzimas. Este valor máximo de umidade (67%) obtido atende o valor de umidade utilizado em FES para crescimento ótimo de fungos filamentosos (65-70%) para produção de lipase e pectinases, como citado anteriormente. Com actinobactérias, Orozco *et al*, (2008) utilizaram, para FES, resíduos de café (borra) com umidades entre 60 e 70%.

Na FES, a umidade tem relação direta com transferência de massa, calor e gases, principalmente em sistemas de escalas maiores, como em colunas de fermentação. Teores baixos de umidade podem dificultar a disponibilidade dos nutrientes e aumentar o acúmulo de calor e teores altos podem diminuir a porosidade do meio e dificultar a transferência de oxigênio (ABRUNHOSA, VENÂNCIO, TEIXEIRA, 2011). De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que as composições dos meios, principalmente os E6, em escala de bancada, foram suficientes para disponibilizar os nutrientes para as actinobactérias e produzir lipase e pectinase.

Ainda analisando as ANOVA observa-se que as variações nas proporções de FT e TLD não foram significativas para as produções enzimáticas. Já para a produção de lipase com a CDPA-32 a proporção FT/ TLD foi significativa, sendo mais favorável para o aumento da atividade enzimática a região de maior proporção de FT (a partir de cerca 60% de FT), desde que associado a umidades mais elevadas, Tabela 3 e gráfico (b). Essa diferença de desempenho entre as duas cepas na produção de lipases pode ser atribuída às diferenças e

necessidades específicas de cada cepa. Segundo a literatura, diferentes fontes de nitrogênio (entre elas o farelo de trigo) e diferentes micro-organismos podem melhorar a produção de lipases. Oliveira *et al*, (2016) observaram em FES realizado com resíduo de azeitona e farelo de trigo, um efeito positivo na produção de lipase com *Aspergillus ibericus*, mas não com *A. niger* e *A. tubingensis*. Sun e Xu, (2008) relataram que fosfato de monoamônio apresentou um efeito positivo na produção de lipase por *Rhizopus chinensis*, o que não foi observado com outras fontes de nitrogênio.

A TL inicialmente com 49,27% de lipídios, após o processo de desengorduramento apresentou um teor de 2,54% (TLD). Não foi testada TLD com teor maior lipídios. O FT utilizado continha 6,29% de lipídios. A TLD e o FT, além de possuírem lipídios, que são substratos para a lipase, apresentam também, naturalmente, em suas composições proteínas, que favorecem a atividade de lipases nos teores de 19% para TL segundo Gomes, (1977) citado por Santos & Santos (2002) e de 13,8% para FT (SILVEIRA, BADIALE-FURLONG, 2007). Os resultados obtidos sugerem que, de forma geral, a TLD pode ser uma alternativa de meio de fermentação para a produção de pectinase e lipase, assim como, o FT, que tem sido um dos meios mais utilizados em FES.



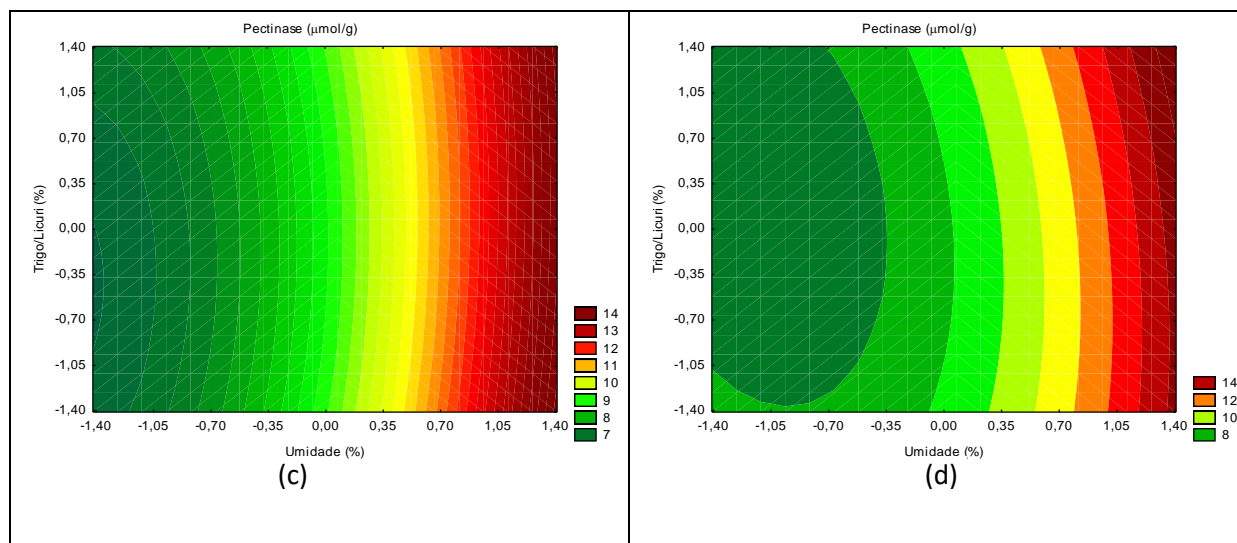


Figura 1 - Produção de lipases por actinobactérias CDPI-30 (a) e CDPA-32 (b) e de pectinases por CDPI-30 (c) e CDPA-32 (d) em função da umidade e da proporção FT/TLD durante a fermentação em estado sólido

Na busca de novos meios para a produção industrial de enzimas por FES observa-se que os resíduos de licuri se mostram promissores para produção de enzimas como lipase e pectinase.

4. CONCLUSÃO

Os resíduos do licuri (torta e casca) gerados na produção de óleo apresentaram-se viáveis para sua utilização em FES com actinobactérias, após uma etapa de desgorduramento destes e, por serem de baixo custo, contribuem para que sejam matérias-primas promissoras para produção de enzimas como lipase e pectinase. Os meios preparados com a maior umidade (67%) e iguais proporções de FT e TLD apresentaram os maiores índices de atividades enzimáticas para as duas enzimas. De forma geral, as umidades mais altas influenciaram positivamente e a TLD apresentou resultados semelhantes ao do FT que, por sua vez, este último foi melhor somente para a produção de lipase pela CDPA-32.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4. 2011.

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; PRADO-BARRAGÁN, PA; RODRÍGUEZ-HERRERA, R., MARTÍNEZ-HERNANDEZ, JL; CONTRERAS-ESQUIVEL, JC.

Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 354-366. 2008.

ARAÚJO, K. B. **Avaliação do potencial biotecnológico da farinha de casca de mandioca na obtenção de acetato de etila com micro-organismo *Ceratocystis fimbriata***. Tese (Pós Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

BISPO, A. S. da R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas - BA. 2010.

BISPO, A. S. R.. **Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas Produzidas por Actinobactérias**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

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.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. LM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 45-50, 2000.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

DOS SANTOS, T. C.; ABREU F. G.; DE BRITO, A. R.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *aspergillus niger* e *rhizopus* sp. durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222-233, 2016.

GONÇALVES, L. G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista. 2016.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. . Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource Technology**, v.102, p.4815-4819, 2011.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, p. 1-10, 2017.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent Advances in Cellulases Technology. **Journal of Fermentation Technology**, v.54. 1976.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

OLIVEIRA, F.; MOREIRA, C.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3583-3589, 2016.

OROZCO, A. L.; PÉREZ, M. I.; GUEVARA, O.; RODRÍGUEZ, J.; HERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; ARIAS, M. E. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces* Py-GC/MS analysis. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 81, n. 2, p. 247-252, 2008.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, C. A. **Estudo da produção de iturina por *Bacillus subtilis* em fermentação semi-sólida utilizando como substrato farelos de soja, arroz, trigo e casca de arroz**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.2013.

RAMOS-IBARRA, J. R.; MIRAMONTES, C.; ARIAS, A.; ARRIOLA, E.; GUATEMALA, G.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I. Production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation with new fungal strains using orange by-products. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2017.

REINEHR, C. O.; BORTOLUZZI, L.; DE MORAIS, V. Q.; SMANIOTTO, T. M.; ZEN, C. K.; DE OLIVEIRA, D.; COLLA, L. M. Produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando subprodutos agroindustriais, óleo de soja e glicerol. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 97-115, 2016.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RODRIGUES, H. C. S. R.; SOUZA, C. O.; UMSZA GUEZ, M. A.; CARVALHO, A. L. Produção de enzimas de interesse alimentício através de fermentação em estado sólido – Prospecção tecnológica. **IV Workshop de pesquisa, tecnologia e inovação (PTI) e II Simpósio internacional de inovação e tecnologia (SIINTEC)**. SENAI-CIMATEC, Salvador –Bahia. 2016.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; DE CARVALHO, J. C.; STURM, W.; SOCCOL, C. R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase

and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10657-10662, 2011.

SANTOS, H.M.V.; SANTOS, V. de J. **Estudo etnobotânico do licuri *Syagrus coronata* (Martius) Beccari em Senhor do Bonfim, Bahia**. 2002.

SANTOS, D. B. dos; BISPO, A. S. da R.; NASCIMENTO, R. P. dos; CAZETTA, M. L. Bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal como substratos indutores para a produção de endoglucanase por actinobactéria isolada de solo de cultura de sisal. **MAGISTRA**, v. 27, n. 2, p. 245-254, 2015.

SEKHON, A.; DAHIYA, N.; TEWARI, R. P.; HOONDAL, G. S. Production of lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 using wheat bran in solid substrate fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v.44, p. 219–220. 2004.

SILVEIRA, C. M.; BADIALE-FURLONG, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 805-811, 2007.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017. Disponível em <http://ac.els-cdn.com/S2452072116300144/1-s2.0-S2452072116300144-main.pdf?_tid=32a539b2-70a1-11e7-abd5-00000aacb360&acdnat=1500922510_a05bf6aeaa42f9caa27ae3462b00065b>. Acessado em 24/07/2017.

SUN SY e XU Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p.219–224, 2008.

UMSZA GUEZ, M. A.; DÍAZ, A. B.; ORY, I. D.; BLANDINO, A.; GOMES, E.; CARO, I. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1585-1597, 2011.

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 leite 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.

USTOK, F. I.; TARIĆ.; GOGUSB, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 322, 2007.

VANDENBERGHE, L. **Développement d'un Procédé pour la Production d'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro- Industrie du Manioc**. These de Docteur de UTC. Université de Technologie de Compiègne, 205 p. 2000.

Capítulo IV

Considerações Finais

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através deste trabalho evidenciaram o potencial biotecnológico de utilização dos resíduos de licuri, para a produção de enzimas como lipases e pectinases, através de fermentação em estado sólido.

As duas cepas de actinobactérias testadas apresentaram resultados positivos para as enzimas avaliadas. No entanto, para ambas as enzimas, os resultados obtidos com as duas cepas variaram ora melhor com uma cepa, ora melhor com outra, a depender da formulação do meio. Considerando-se os valores das atividades mais altas obtidas, a cepa CDPI-30 apresentou o melhor resultado para lipase e a CDPA-32 gerou o melhor resultado para pectinase.

Embora a torta de licuri adquirida tenha precisado passar por um pré-tratamento (desengorduramento), essa etapa poderia deixar de ser necessária se o processo de extração de óleo de licuri fosse otimizada, o que além de maximizar o rendimento na obtenção de óleo, geraria um resíduo com teor de lipídios menor. Os resíduos do licuri, assim como os resíduos de outros processos de extração de óleo são de baixo custo, o que contribui para que sejam matérias-primas promissoras para a utilização em FES.

Os meios preparados com a umidade mais alta e iguais proporções de farelo de trigo e torta de licuri apresentaram os maiores índices de atividades enzimáticas para as duas enzimas. A torta de licuri desengordurada apresentou resultados semelhantes ao do farelo de trigo para pectinase. Para lipase a formulação com farelo de trigo foi melhor utilizando a cepa CDPA-32.

Ao mesmo tempo em que foi verificado aumento nas importações por enzimas nos últimos 10 anos, o que também representa um oportunidade para o desenvolvimento e aperfeiçoamento do mercado interno, também foi verificado um crescimento no número de depósitos de patentes de obtenção de enzimas por FES nesse período. A China é detentora da maioria das patentes depositadas. As carbohidrases são as enzimas mais comercializadas e mais patenteadas.

FES tem se mostrado uma boa opção para obtenção de enzimas que possuem ampla possibilidade de aplicações em diversos setores e processos, oferecendo grandes oportunidades de pesquisas e patentes com identificação de diferentes micro-organismos, substratos e parâmetros de processo.

Capítulo V

Apêndice

APÊNDICE A – AMOSTRAS DE LICURI E PRODUTOS FEITOS COM LICURI, ACTINOBACTÉRIAS E MEIOS SÓLIDOS

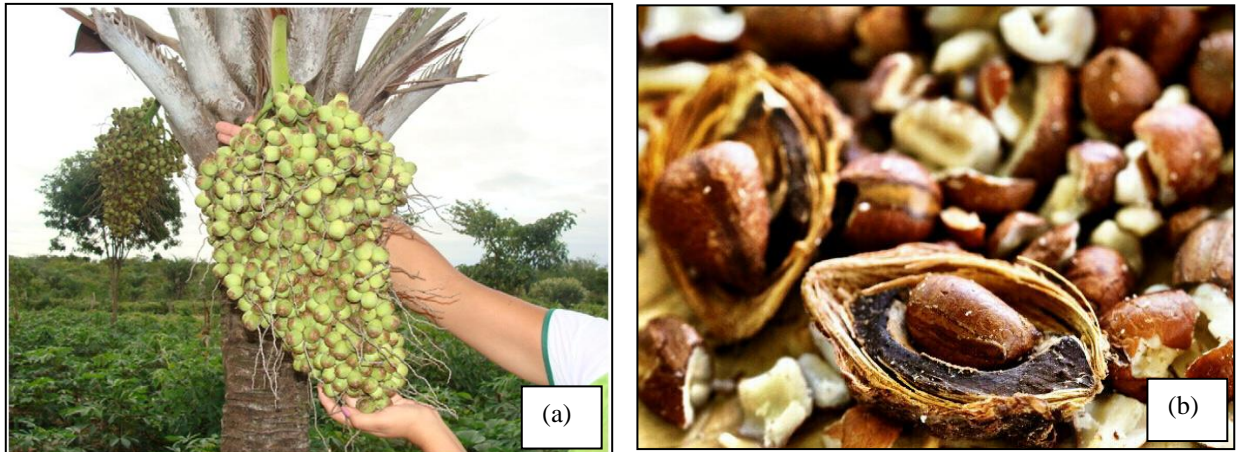


Figura 1 – Cacho de frutos do licuri (*Syagrus coronata*) (BELVISO *et al*, 2013) (a) e amêndoa de licuri (b) (FRADE, 2017 - Foto: Carolina Amorim *in: site*)



Figura 2 – Produtos feitos a partir de licuri: Kiosque (Fonte: BRASIL, 2006) (a), cosméticos e artesanato (Fonte: LICURI BRASIL, 2017, *in: site*) (b e c)

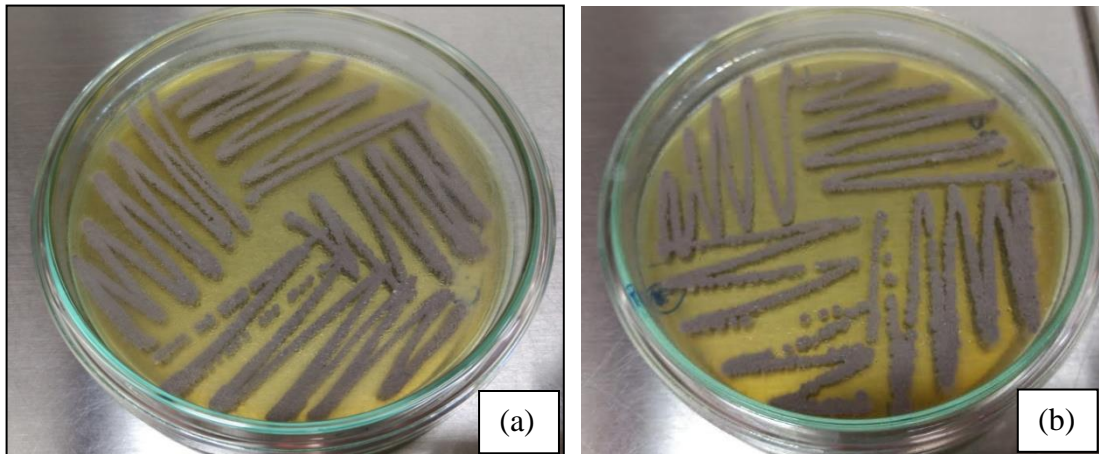


Figura 3 – Actinobactérias: CDPA-32 (a) e CDPI-30 (b)

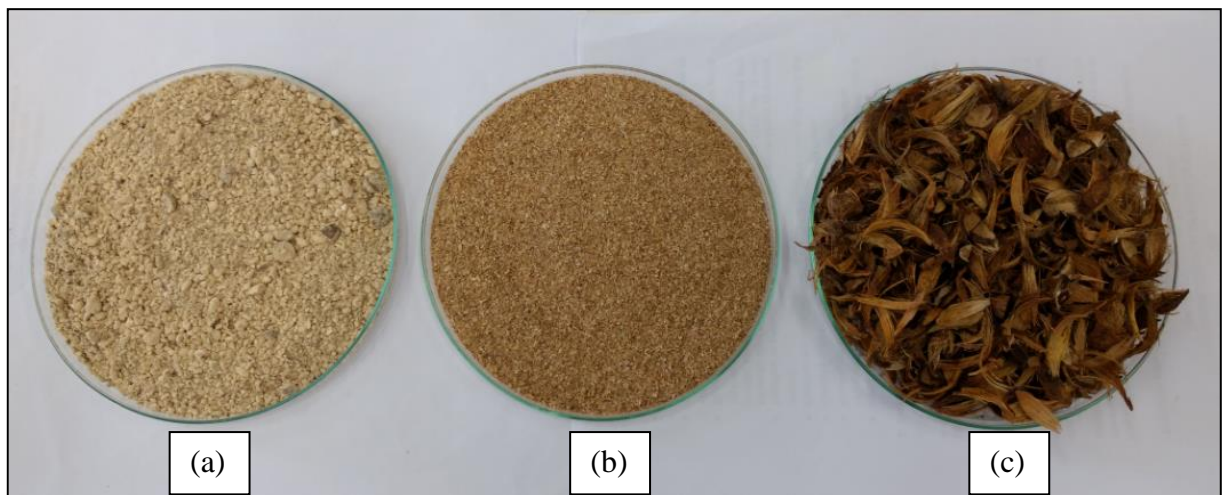


Figura 4 – Substratos sólidos: torta de licuri desengordurada (a), farelo de trigo (b) e cascas de licuri (b)