



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

DÉBORA KARENINE LACERDA GERVÁSIO

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO COCO VERDE PARA A PRODUÇÃO
DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

João Pessoa/PB

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO COCO VERDE PARA A PRODUÇÃO
DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia desta instituição.

Aluna: DÉBORA KARENINE LACERDA GERVÁSIO
Orientadora: PROF^a. DR^a. ANDRÉA FARIAS DE ALMEIDA

João Pessoa

2017

Catálogo na publicação

Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB

Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

G386u Gervásio, Débora Karenine Lacerda.
Utilização do resíduo do coco verde para a produção de enzimas por
fermentação em estado sólido / Débora Karenine Lacerda Gervásio. – João
Pessoa, 2017.
57 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal
da Paraíba.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Andréa de Almeida Farias.

1. Enzimas. 2. Resíduo agroindustrial do coco. 3. Fermentação em
estado sólido. 4. *Aspergillus* sp. 5. Celulases. 6. Proteases. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 577.15(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CBIOTEC
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

DÉBORA KARENINE LACERDA GERVÁSIO

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO COCO VERDE PARA A PRODUÇÃO
DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Data da Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida (Orientadora) – PRESIDENTA

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa (Co-orientador)

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa – 1º EXAMINADOR

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire – 2º EXAMINADOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me mostrar que nos bons momentos, ou mesmo nos mais difíceis, a sua presença sempre me fortalecerá e me acompanhará. Por seu amor, e suas infinitas e lindas promessas em minha vida.

Também agradeço aos meus pais, Adelson e Weruccy, que além do seu amor incondicional e apoio, sempre deram tudo de si, com muito trabalho e dedicação, para o investimento da minha base e educação.

Aos meus irmãos, que tanto amo, Tiago e Ítalo, primeiros e eternos melhores amigos.

À minha amada avó, Madalena, que deu-me aconchego, amor, e ensinamentos nos diversos momentos de minha vida. Meu avô, Walter, grande incentivador e inspirador dos meus estudos, sempre com muito amor. À minha avó Branca, que mesmo não estando mais em nosso meio, e ao meu avô Francisco, por me ensinarem as coisas mais simples e importantes da vida. Aos meus tios, quase pais, José Lacerda Fragoso Tia Adeilma, Tio Hamilton e Tio Alexandre e Tio Waltinho, por seu papel fundamental nas minhas conquistas.

Aos meus primos e amigos: Raissa e Bárbara, primas e melhores amigas de infância. E aos meus amigos de vida e de fé: Nina, Rodrigo, Fernanda, Carol, Isabelle, João Neto e Ailton; tenham sempre consciência de que Deus nos fez mais que amigos.

Aos meus professores do Centro de Biotecnologia, em especial à Professora Andréa, Adna e Sildivane, que foram de fundamental importância para minha formação profissional, e pelo carinho e compreensão durante a minha graduação.

Pela realização e finalização desse trabalho e etapa, agradeço imensamente:

À minha orientadora, Professora Andréa, não só pela confiança e oportunidade, mas por toda dedicação, carinho e paciência que me ofertou gratuitamente. Pelo apoio e pelos ensinamentos não só relacionados à ciência, mas à vida.

Ao meu Professor e Co-orientador Carlos Bispo, por abrir as portas do LPFD e me conceder todo o conhecimento extra e necessário para a conclusão dessa etapa.

Aos meus amigos de graduação da turma 2013.1, por me tornarem parte de sua turma, não só como mais uma integrante, mas de maneira especial. Meus eternos agradecimentos principalmente a Melina, Ray, Tarcísio, Carol e Rafael, por dedicarem um pouco mais de seu tempo na realização de todos os experimentos desse trabalho e pela linda amizade construída.

Agradeço à Geisi, por seu carinho, paciência e sua imensa contribuição na construção deste trabalho, assim como aos meus amigos do LEBp, Arauana, Jefferson e Manu, na realização dessa etapa, e por todos dias cansativos, mas felizes ao lado de vocês.

Aos responsáveis pelo Laboratório Multiusuário, em especial a técnica Tcris pela imensa contribuição em todos os experimentos realizados.

À minha banca avaliadora, Adna e Kristerson, pela contribuição e disponibilidade na avaliação e enriquecimento deste trabalho.

*À Deus, presente em todas as horas em minha
vida, e minha família, pela base, apoio e por
serem sempre responsáveis por minhas
conquistas.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte longitudinal do coco verde	18
Figura 2 – Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	21
Figura 3 – Esquema de degradação da celulose	23
Figura 4 – Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por protease	24
Figura 5 – Pó da casca do coco.....	26
Figura 6 – Diagrama de Pareto para atividade da endoglucanase com 96 horas de fermentação	37
Figura 7 – Superfície de resposta da influência da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação	39
Figura 8 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação.....	39
Figura 9 – Diagrama de Pareto para atividade da exoglucanase com 96 horas de fermentação	41
Figura 10 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da exoglucanase para 96 horas de fermentação.....	41
Figura 11 – Diagrama de Pareto para atividade proteolítica com 96 horas de fermentação	42
Figura 12 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade proteolítica para 96 horas de fermentação	43
Figura 13 - Fermentação em estado sólido de 240h com resíduo do coco como substrato pelo <i>Aspergillus</i> sp.	44
Figura 14 – Valores de pH no decorrer de 240 horas do cultivo.....	45
Figura 15 – Atividade da exoglucanase (FPase) durante 240 horas de fermentação	46
Figura 16 – Atividade da endoglucanase (CMCase) durante 240 horas de fermentação	47
Figura 17 – Atividade proteolítica durante 240 horas de fermentação.....	48
Figura 18 – Quantidade das proteínas totais (mg/mL) no decorrer do processo fermentativo até 240 horas	49
Figura 19 – Inter-relação da produção enzimática em U/g no decorrer do processo fermentativo até 240 horas	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização química do pó da casca de coco verde	19
Tabela 2 – Composição química do pó de coco e da fibra do coco	19
Tabela 3 – Níveis utilizados no planejamento experimental	29
Tabela 4 – Planejamento experimental 2 ² com triplicata no ponto central	29
Tabela 5 – Caracterização do resíduo de coco verde.....	35
Tabela 6 – Resultado experimental em termos de atividade endoglucanásica para o resíduo do coco verde lavado.	36
Tabela 7- Análise de variância para o modelo descrevendo a atividade de CMCase como função da umidade (U) e adição de fonte de nitrogênio (N)	37
Tabela 8 – Resultado experimental em termos de atividade exoglucanásica para o resíduo do coco verde lavado	40
Tabela 9 – Maior atividade enzimática no período de 240 horas de fermentação	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°brix – Grau brix

ART – Açúcares redutores totais

a_w – Atividade de água

$C_{conídios}$ – Concentração de conídios na suspensão;

CMC – Carboximetilcelulose

CMCase – Atividade da endoglucanase

D.O. – Densidade óptica

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DF^b – Graus de liberdade

DNS – Ácido dinitro-salicílico

\bar{E} – Média da contagem de conídios;

F – Razão entre o $F_{Calculado}$ e o $F_{Tabelado}$

F_D – Fator de diluição para contagem;

FES – Fermentação em estado sólido

FPase – Atividade de celulase

FS – Fermentação submersa

FSS – Fermentação em estado semissólido

MS^c – Média quadrática

pH – Potencial hidrogeniônico

R² – Coeficiente de determinação

SS^a – Soma dos quadrados

U – Unidade de atividade enzimática

U/g – Unidade de atividade enzimática por grama

U/mL – Unidade de atividade enzimática por mililitro

V_{AA} – Volume de água a ser adicionado ao meio

$V_{Suspensão}$ – Volume de suspensão

RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais pode ser uma estratégia alternativa para produção de enzimas microbianas a baixo custo, além de proporcionar um destino mais nobre desses resíduos, evitando assim o acúmulo no ambiente. Para tanto, é levado em consideração os processos fermentativos em estado sólido, e também a aplicabilidade das enzimas produzidas nesses sistemas nas indústrias química, têxtil, de alimentos, dentre outras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e proteolíticas, utilizando a fermentação em estado sólido (FES), empregando como substrato o bagaço do coco verde, pela ação do fungo *Aspergillus* sp. isolado de peças anatómicas conservadas em formol 10% do complexo de laboratórios de anatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foi realizada a caracterização do substrato para se obter informações necessárias antes da sua utilização no processo, assim como um planejamento experimental fatorial 2^2 , com triplicata no ponto central, a fim de se analisar a influência da variação da umidade e da adição de fonte de nitrogênio (sulfato de amônia). Os níveis das variáveis independentes aplicadas foram: umidade 60%, 70% e 80% e sulfato de amônia 0%, 0,5% e 1% (p/v). O programa computacional STATISTICA (versão 7.0, da StatSoft Inc.) foi empregado para os cálculos dos efeitos principais das variáveis e suas interações. Diante do resultado do planejamento, as fermentações foram conduzidas, a 30°C durante 240 horas, utilizando o bagaço da casca do coco a 80% de umidade sem a adição de sulfato de amônia. As melhores atividades celulolíticas foram observadas às 192h (15,773 U/g) e 216 h (3,888 U/g), para as exoglucanases e endoglucanases, respectivamente. Verificou-se também a atividade proteolítica, nas mesmas condições de produção das celulases, nas quais obtiveram os melhores resultados às 168 horas (10,167 U/g). Diante dos resultados, constata-se que o *Aspergillus* sp. possui potencial de produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas a partir do resíduo do coco verde utilizando fermentação em estado sólido.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial do coco. Fermentação em estado sólido. *Aspergillus* sp. Celulases. Proteases.

ABSTRACT

The use of agroindustrial waste can be an alternative strategy for the production of microbial enzymes at low cost, besides providing a more noble destination of these residues, thus avoiding the accumulation in the environment. For that, solid-state fermentation processes are considered, as well as the applicability of the enzymes produced in these systems in the chemical, textile, food, and other industries. The aim of the present work was to evaluate the production of cellulolytic enzymes (CMCase and FPase) and proteolytics, using solid-state fermentation (FSS), employing as a substrate the green coconut bagasse by the fungus *Aspergillus* sp. isolated from anatomical parts preserved in formaldehyde 10% of the anatomy laboratory complex of the Department of Morphology of the Health Sciences Center (CCS) of the Federal University of Paraíba (UFPB). The characterization of the substrate was performed to obtain necessary information before its use in the process, as well as an experimental design 2^2 , with triplicate at the central point, in order to analyze the influence of the variation of moisture and the addition of nitrogen source (Ammonium sulfate). The levels of the independent variables applied were: 60%, 70% and 80% humidity and 0%, 0.5% and 1% (w / v) ammonium sulfate. The STATISTICA software (version 7.0, StatSoft Inc.) was used to calculate the main effects of variables and their interactions. Faced with the result of the design, fermentations were conducted at 30 ° C for 240 hours using the coconut residues at 80% moisture without the addition of ammonium sulfate. The best cellulolytic activities were observed at 192h (15,773 U / g) and 216 h (3,888 U / g), for exoglucanases and endoglucanases, respectively. Proteolytic activity was also verified under the same cellulase production conditions, in which the best results were obtained at 168 hours (10.167 U / g). In view of the results, *Aspergillus* sp. Has the potential to produce cellulolytic and proteolytic enzymes from the green coconut residue using solid-state fermentation.

Keywords: Coconut agroindustrial residue. State-solid Fermentation. *Aspergillus* sp. Cellulases. Proteases.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	13
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 – Fermentação em estado sólido (FES).....	15
2.1.1 – Fatores que influenciam o processo	15
2.1.2 – Vantagens e limitações da FES	16
2.2 – Substrato.....	17
2.2.1 – Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	17
2.3 – Micro-organismos utilizados na fermentação em estado sólido	19
2.3.1 – <i>Aspergillus</i> sp.	20
2.4 – Enzimas microbianas.....	21
2.4.1 – Celulases.....	22
2.4.2 – Proteases.....	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 – Preparo do resíduo da casca do coco verde	26
3.2 – Caracterização do resíduo da casca do coco verde	26
3.2.1 – Teor de sólidos solúveis (°brix)	26
3.2.2 – Densidade aparente	27
3.2.3 – pH.....	27
3.2.4 – Umidade	27
3.2.5 – Teor de açúcares redutores totais (ART).....	28
3.3 – Processo fermentativo.....	28
3.3.1 – Planejamento experimental	28
3.3.2 – Micro-organismo e inóculo	29
3.3.2.1 – Micro-organismo	29
3.3.2.2 – Inóculo.....	30
3.3.3 – Experimentos de fermentação	30
3.4 – Extração das enzimas	31
3.4.1 – Obtenção do extrato enzimático.....	31
3.4.2 – Resíduo da fermentação	31
3.4.3 – Análises do extrato enzimático bruto	31
3.4.3.1 – pH	32
3.4.3.2 – Proteínas totais.....	32
3.4.3.3 – Determinação da atividade da exoglucanase (FPase).....	32
3.4.3.4 – Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase)	33
3.4.3.5 – Atividade proteolítica	33
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 – Caracterização do resíduo da casca do coco verde	35
4.2 – Processo fermentativo.....	35
4.2.1 – Planejamento experimental	36
4.2.1.1 - Atividade da endoglucanase (CMCase).....	36

4.2.1.2 – Atividade da exoglucanase (FPase).....	40
4.2.1.3 – Atividade proteolítica	42
4.2.2 – Processo fermentativo após o planejamento experimental	43
4.2.2.1 – pH	45
4.2.2.2 – Atividade da exoglucanase (FPase).....	45
4.2.2.3 – Atividade da endoglucanase (CMCase)	46
4.2.2.4 – Atividade proteolítica	47
4.2.2.5 – Proteínas totais solúveis.....	49
.....	49
4.2.2.6 – Atividade enzimática representativa.....	50
5 – CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 – INTRODUÇÃO

Quando se trata da produção de frutas tropicais, o Brasil assume uma posição de destaque, por ser dotado de um cenário perfeito para esse tipo de cultivo (ROGÉRIO, 2005). Sendo assim, a cultura de coco (cocoicultura) é fundamental na economia do Nordeste brasileiro, responsável por 66,5% da produção, à frente das regiões Norte, com 14,1% e Sudeste com 17% (PENHA et al., 2005). Por apresentar múltiplas propriedades nutricionais, e por fazer parte do gosto popular, a água de coco contribui com o aumento da cultura desse fruto no Brasil, tornando-o uma das frutas mais consumidas nos litorais brasileiros (FONTENELE, 2005; BONTEMPO, 2008).

Esse consumo em larga escala, aumenta conseqüentemente a geração de resíduo proveniente da casca do coco, ocasionando em um problema ambiental relacionado ao descarte desse material (ROSA et al., 2001). Apesar de ser orgânico, o resíduo do coco é de difícil degradação, demorando mais de oito anos para sua completa decomposição (CARRIJO et al., 2002). Outro problema vinculado ao descarte do resíduo agroindustrial desse fruto é a emissão de metano, gás muito associado ao efeito estufa (PASSOS, 2005). Contudo, o material rejeitado da indústria convencional do coco maduro pode ter aplicações como combustível para caldeiras, manufatura de tapetes e estofamentos. Outras pesquisas recentes mostram ainda a utilização do resíduo da casca na agricultura intensiva, principalmente no cultivo de plantas ornamentais e hortaliças (OHLER, 1986; MURRAY, 2001).

Uma alternativa para minimizar problemas relacionados ao descarte desses resíduos pode ser a sua utilização como matéria orgânica em processos fermentativos como na produção de enzimas e outros produtos de valor agregado (COELHO et al., 2001). No ramo da biotecnologia, a produção de enzimas vem atraindo considerável evidência. Nos últimos anos tem-se aumentado o emprego da fermentação em estado sólido para a produção de enzimas principalmente relacionadas com a degradação de macromoléculas vegetais complexas (COUTO; SANROMÁN, 2005).

Os processos fermentativos que envolvem o crescimento e o metabolismo de microrganismos, como os fungos filamentosos, por exemplo, em um substrato sólido ou suporte, com completa ou parcial ausência de água, trata-se da fermentação em estado sólido (FES). Esse tipo de bioprocessamento é importante na destinação de resíduos agroindustriais tidos como possíveis causadores de problemas ambientais (ROCHA, 2010). Essa fermentação em matriz sólida é muito vantajosa, sobretudo quando se trata do emprego de fungos filamentosos,

visto que nela as condições de cultivo são muito semelhantes ao *habitat* natural desses fungos, ou seja, o crescimento e conseqüentemente o metabolismo e a produção de enzimas são maiores (PANDEY, 2003).

Em suma, alguns microrganismos são capazes de produzir celulases, pois atuam na degradação de materiais lignocelulósicos presentes em substratos como o coco após a sua caracterização (CASTRO, 2006). Ao mesmo tempo, esses microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases (vegetal e animal), por serem mais estáveis, devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço de tempo necessário para o seu cultivo e a grande variedade de atividades catalíticas que dispõem (RAO et al., 1998).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e proteolíticas, utilizando a fermentação em estado sólido (FES), empregando como substrato o bagaço do coco verde, pela ação do fungo *Aspergillus* sp. isolado de peças anatômicas conservadas em formol 10% do complexo de laboratórios de anatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Fermentação em estado sólido (FES)

Os processos fermentativos estão sendo evidenciados quando se trata do aproveitamento dos resíduos agroindustriais, e a fermentação em estado sólido (FES) torna-se relevante quando se trata dessas técnicas. A fermentação em estado sólido é um sistema em que os micro-organismos crescem sobre ou dentro de substratos sólidos, caracteristicamente com a ausência ou quase ausência de água livre, que se encontra ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998), de forma que haja uma umidade ideal para assegurar o crescimento e metabolismo das células (DEL BIANCHI et al., 2001). Dessa forma, por meio da FES, é possível a obtenção de produtos de interesse, com destaque na produção de enzimas como as amilases, proteases, xilanases, celulasas e pectinases (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Dependendo da natureza da fase sólida, essa matriz pode ser naturalmente a fonte de nutrientes, ou um suporte fixo que será impregnado de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (SINGHANIA et al., 2009; BARRIOS-GONZÁLES, 2012). Nesse contexto, a matéria orgânica proveniente do substrato é uma interessante fonte de energia para o desenvolvimento do micro-organismo, e a fonte de carbono é empregada na síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (MITCHELL; LONSANE, 1992).

Etapas como a escolha do substrato para o processo, seleção do micro-organismo específico, manejo dos parâmetros da fermentação e, em alguns casos, separação e purificação dos produtos, são necessárias para a realização da FES. Essas condições podem afetar o desenvolvimento do microrganismo, sendo pertinente para o controle do processo (GUTIERREZ-CORREA; TENDERDY, 1997).

2.1.1 – Fatores que influenciam o processo

A fermentação em estado sólido, bem como outros processos, depende também de condições ambientais que podem afetar de forma significativa o desenvolvimento do micro-organismo e da formação dos produtos desejados. A umidade e atividade de água, pH,

temperatura e a concentração inicial de inóculo são fatores que influenciam o processo, e o correto gerenciamento desses fatores, por meio de um estudo e observação preliminar, possivelmente resultará no sucesso do processo.

O elevado grau de interação da água com outras substâncias da matriz sólida confere a ela um papel relevante entre todas as condições que influenciam a FES (GERVAIS; MOLIN, 2003). Dois parâmetros principais estão diretamente ligados com a água: a umidade e a atividade de água (PINTO, et al., 2005). O teor de umidade do substrato contribui diretamente na disponibilidade de água livre no meio e também na dilatação do substrato promovendo a penetração do micélio, o que afeta o crescimento microbiano e conseqüentemente a formação do produto (MURTHY et al., 1993). Sendo assim, é interessante que o nível de umidade seja ideal para o crescimento microbiano. Já atividade de água (a_w) confere o fornecimento da água não ligada ao substrato que está disponível para o micro-organismo, considerando-se que naturalmente cada organismo necessita de um nível de a_w mínimo para conseguir realizar suas atividades metabólicas (RAMANA et al., 1993; LEITÃO, 1997).

Segundo Schmidell *et al.* (2001), em consequência da heterogeneidade dos substratos de fase sólida utilizados na FES, o pH é difícil de ser controlado. Dessa maneira, o emprego de substratos com boa capacidade tamponante ou a inserção de soluções tampão no momento da umidificação podem facilitar o controle desse parâmetro. O desenvolvimento microbiano no sistema gera calor, que necessita ser dissipado do sistema. Portanto, controlar a temperatura de forma adequada melhora o processo. Por outro lado, a quantidade ideal de concentração de inóculo quando comparada ao substrato, garante a fermentação complementando as necessidades sem esgotar os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano (OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

2.1.2 – Vantagens e limitações da FES

Segundo Palma (2003), existem algumas vantagens e limitações da fermentação em estado sólido quando comparada a outro processo fermentativo, como a fermentação submersa (FS). No entanto, é uma comparação difícil, tendo em vista que cada micro-organismo pode se adequar a qualquer um dos dois processos, considerando que essa adaptação depende uma série de fatores.

Como vantagens em relação à FS, a FES apresenta menor risco de contaminação por causa da baixa umidade que apresenta; o meio fermentativo é extremamente simples de ser preparado, porque basicamente é formado apenas pelo substrato sólido e água para torná-lo úmido; é viável com a utilização de resíduos baratos e abundantes, principalmente no Brasil; o crescimento celular acontece em condições semelhantes ao *habitat* natural e em um espaço reduzido; e o maior produção e concentração do produto de interesse.

Por outro lado, algumas limitações são apresentadas, como a heterogeneidade do meio da FES, que dificulta o controle do crescimento celular, entre outros parâmetros como pH, agitação, concentração de nutrientes e produtos. A difícil canalização do calor que foi gerado em consequência do metabolismo microbiano, podendo afetar a umidade do meio, e também a restrição da variedade de produtos que podem ser gerados devido aos micro-organismos que restritamente são selecionados pelo seu desenvolvimento apenas em baixos níveis de umidade (PALMA, 2003).

2.2 – Substrato

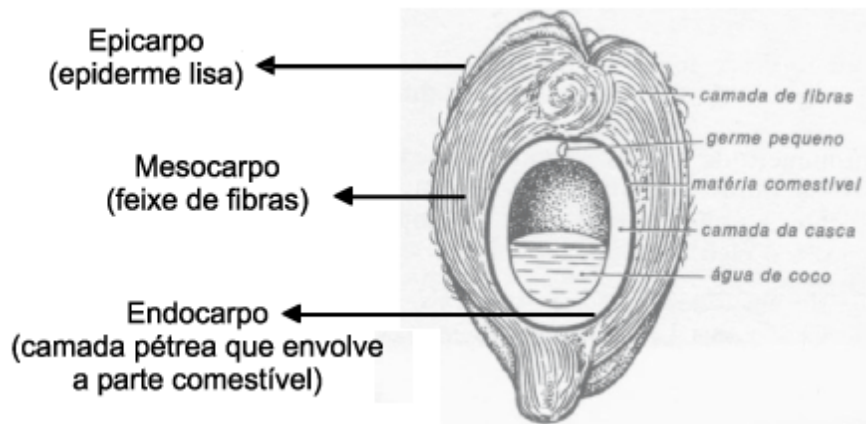
A seleção do substrato que será empregado na FES é uma das etapas mais importantes desse bioprocessamento, sendo dependente de fatores como a sua disponibilidade e principalmente o custo. Nesse contexto, a pesquisa direcionada para a seleção dos resíduos agroindustriais vem se destacando. Os substratos utilizados na FES são compostos naturais ou sintéticos. Eles geralmente são insolúveis em água, e por outro lado, capazes de absorvê-la, contribuindo com o aproveitamento microbiano, com o crescimento e a atividade metabólica (SANTOS, 2017).

2.2.1 – Coco (*Cocos nucifera*)

Apesar de estar bem naturalizado na costa nordestina do Brasil, o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é de origem asiática. Bem adaptado, desde meados 1553 até os dias atuais, o coco tem papel de destaque quando se trata de matéria prima para a agroindústria e para o ramo alimentício (SOBRAL, 1976; FERREIRA, 1994). Variedades como *Typica* (var. Gigante) e *Nana* (var. Anã) são importantes no âmbito socioeconômico, agroindustrial e no agronegócio (SANTOS *et al.*, 1996; FRUTAS DO BRASIL, 2002).

As partes estruturais do coco consistem basicamente em uma camada mais externa e fina, denominada epicarpo (casca); uma parte mais interna, extensa e fibrosa, chamada de mesocarpo; a estrutura lenhosa, mais interna que o mesocarpo, o endocarpo, e o albúmen que está em contato direto com o líquido opalescente, ou água de coco, de alto valor comercial (Figura 1). No total, o peso médio do fruto se encontra entre 3 a 4Kg e a quantidade de água presente depende da sua maturidade, ou seja, quanto mais maduro, menos água o coco possui (PORTAL SÃO FRANCISCO, 2005; OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

Figura 1 – Corte longitudinal do coco verde



Fonte: FERREIRA *et al.* (1998)

As fibras do mesocarpo são constituídas basicamente por celulose, lignina, hemicelulose, pectina e minerais. Sendo a celulose responsável pela resistência das fibras, estabilidade e estrutura do fruto; a hemicelulose atua como ligante entre a celulose e a lignina; a pectina tem função aglutinante, constituindo a parede celular, bem como a lignina que é responsável pela formação dessa parede (PASSOS, 2005). As Tabelas 1 e 2 apresentam a caracterização química do pó da casca de coco verde e a composição química do pó de coco e da fibra do coco.

Partindo do princípio de que a água do coco verde é basicamente a estrutura mais explorada quando se trata do setor industrial, cerca de 80 – 85% do peso bruto do coco verde é descartado, causando problemas ambientais devido a formação de lixo. Por outro lado, o coco seco poder ser utilizado na indústria em caldeiras, ou até mesmo no ramo artesanal (ROSA *et al.*, 2001). Nesse aspecto, os processos biotecnológicos podem ser aplicados na destinação desse resíduo, promovendo a obtenção de diversos produtos de interesse, melhorando tanto os ramos industriais, bem como o meio ambiente.

Tabela 1 – Caracterização química do pó da casca de coco verde

Elemento químico	g/Kg	mg/Kg
N	6,52	-
P	1,42	-
K	11,5	-
Ca	6,8	-
Mg	1,79	-
Na	12,5	-
Fe	1,97	-
Cu	-	6,6
Zn	-	31,8
Mn	-	23,8
M.O	-	72,58

M.O – Matéria orgânica

Fonte: SILVA (1999)

Tabela 2 – Composição química do pó de coco e da fibra do coco

Tipo de fibra	Composição química (%)						
	Lignina	Glucose	L-Arabinose	Galactose	L-Ramose	Xilose	Manose
Pó de coco	35,72	25,91	0,29	0,32	0,21	23,93	0
Fibra de coco	33,50	34,87	0,05	0,36	0,16	16,98	0,12

Fonte: HAN (2009).

2.3 – Micro-organismos utilizados na fermentação em estado sólido

A eficiência do micro-organismo na conversão do substrato em produto, com rápida liberação para o meio, entre outros aspectos, são fatores a serem analisados antes da sua seleção, principalmente quando se trata de FES (SCHMIDELL, 2001). Os fungos filamentosos, nesse caso, são os mais adaptados, principalmente por apresentarem uma alta capacidade de crescimento em meios com baixas concentrações de água livre, além de que são de fácil de manipulação e adaptação, versáteis em suas aplicações contribuindo também na produção enzimática (COSTA, 1996; CASTILHO *et al.*, 2000).

O crescimento do fungo se dá pelo alongamento de suas hifas, estrutura morfológica fundamental desses organismos. O conjunto de hifas constitui o que é denominado de micélio. Como o crescimento das hifas é restrito às extremidades, e as partes externas são maiores e

mais velhas, pode-se confirmar que proporcionalmente a biomassa nova diminui com o avanço da cultura (PANDEY, 2002). Esse crescimento sobre a superfície sólida é em consequência da disponibilidade de nutrientes provenientes do substrato. Assim, as hifas percorrem o substrato ocupando cada vez mais espaço no sistema, consumindo todo nutriente disponível (LOSANE *et al.*, 1985).

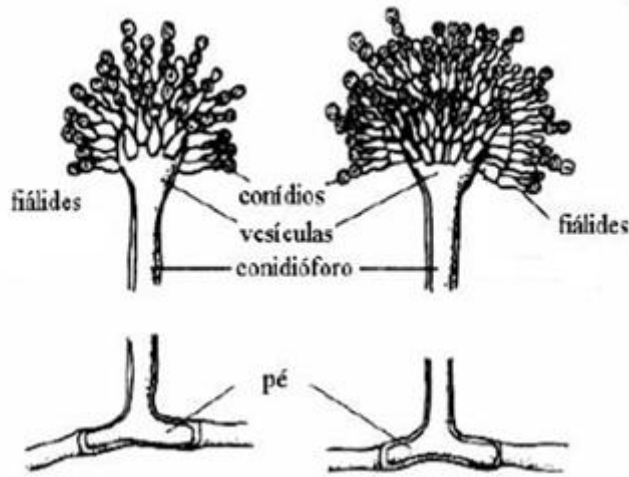
A temperatura para o crescimento dos fungos está entre 30°C e 35°C, mas o ótimo para a maioria está entre 20°C e 30°C. O pH em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies (PUTZKE, 2004). De acordo com Bisaria e Ghose (1984), o *Aspergillus* sp. é ótimo produtor de celulases, tais enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias alimentícias, papel e celulose, e têxtil (BIGELIS, 1993).

2.3.1 – *Aspergillus* sp.

Fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são muito comuns, por serem amplamente distribuídos. Podem ser isolados do solo, de ambientes aquáticos e do ar, e dessa forma, são muito estudados, formando o grupo microbiano mais importante na utilização dos processos de FES para produção enzimática. Mesmo relevantes na indústria de alimentos, algumas espécies desse fungo contribuem com a deterioração dos alimentos e vegetais em regiões com o clima mais quente, além de que existem espécies patogênicas para o homem. Contudo, é importante salientar que esse gênero é extremamente importante na obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos orgânicos (ROSA, CAMPOS, BARONI, 2002).

Morfologicamente, como representado na Figura 2, as espécies apresentam estruturas como a “cabeça aspergillar”, formada por uma vesícula total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídios. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste e a célula pé, é chamada de conidióforo (WAINWRIGHT, 1995).

Figura 2 – Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*



Fonte: Rosa *et al.*, (2002)

Processos fermentativos industriais para a produção de enzimas e metabólitos de interesse comercial como ácido cítrico, α -amilases, glicoamilases, glicanases, lípases, hemicelulases e xilanases, envolvendo culturas de *Aspergillus*, demonstram que esse gênero ainda consegue secretar altas quantidades de proteínas no meio de cultura. Nesse contexto, a biotecnologia tem usado esses micro-organismos para a expressão de proteínas de interesse comercial (LOPES, 2010).

O uso de *Aspergillus niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação. Sua habilidade de se desenvolver em uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir alta concentração de bioprodutos (SPIER, 2005). Ademais, são bastante utilizados na indústria de alimentos para a produção de pectinases, pois apresentam características toxicológicas aprovadas para serem utilizadas no ramo alimentício (MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

2.4 – Enzimas microbianas

Enzimas são proteínas que atuam essencialmente no metabolismo como catalisadoras de reações bioquímicas. Elas detêm um papel importante principalmente na degradação da matéria orgânica originando novos produtos, deterioração de alimentos e infecção do hospedeiro (LEHNINGER *et al.*, 1995).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. Essas seis classes particulares de enzimas industriais são: oxidorreduzases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

Como foi descrito desde a antiguidade pelo filósofo Plínio, o qual evidenciou a utilização do extrato do estômago do bezerro para a coagulação do sangue, as enzimas até hoje têm um grande leque de aplicações. Diante disso, com o conhecimento em relação a sua função, elas são de extrema importância desde a indústria alimentícia, com a produção de queijos e vinhos, até a indústria têxtil, de celulose e papel (VAILANT; CUNHA, 1999). Com esse cenário, que vem estimulando cada vez mais os estudos relacionados às enzimas é a possibilidade da utilização daquelas de origem microbiana, pois possuem diversas vantagens quando comparadas a enzimas equivalentes as de origem animal e vegetal, como a facilidade da produção em larga escala e o menor custo de produção (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os processos industriais na produção de enzimas microbianas a partir dos resíduos agroindustriais apresentam alto interesse, que vão além das vantagens relacionadas ao baixo custo, produção independente e mais acessível, pequena disponibilidade de água e espaço, entre várias outras. Funcionam com uma diversidade de substratos que minimizam os impactos ambientais promovidos por esses resíduos por causa da industrialização.

2.4.1 – Celulases

Enzimas que são capazes de catalisar a hidrólise da celulose, convertendo esse material celulósico insolúvel em glicose, são denominadas celulases. Essas enzimas são produzidas muitos micro-organismos, entre eles os fungos. A divisão desse grupo corresponde ao mecanismo de ação que elas realizam.

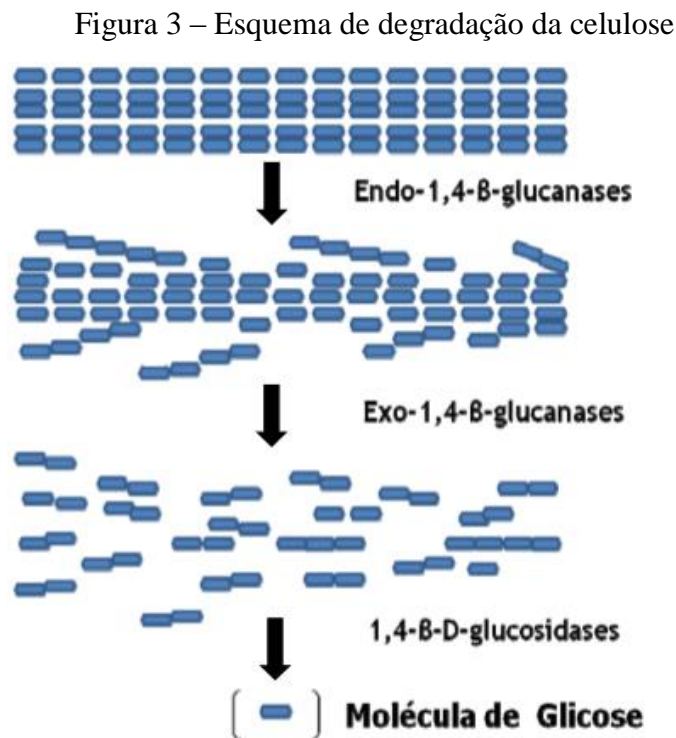
Endoglucanases ou glucano-hidrolases são enzimas que rompem internamente e de forma aleatória a cadeia de celulose, e assim geram novas extremidades, com dimensões variadas, liberando glicose, celobiose e celodextrinas. São ativas contra as formas solúveis de celulose como carboximetilcelulase (CMC) (PEIXOTO, 2006; SHARMA *et al.*, 2016).

As exoglucanases são enzimas que agem nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia celulolítica. Em alguns casos foi visto que essas enzimas rompem o substrato, aumentando as regiões intersticiais causando uma desestratificação das fibras, ou seja, essas

regiões acabam tornando-se vulneráveis à ação da celulose, o que conseqüentemente aumenta a taxa de hidrólise (LYND *et al.*, 2002).

Enzimas como as β -glucosidases ou celobiasas, conseguem hidrolisar a celobiose que foi gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose. De certa forma, essas enzimas não são consideradas celulases autênticas pelo fato de não atuarem diretamente na cadeia celulósica, mas sim no substrato solúvel. Não obstante, para que haja eficiência da hidrólise da celulose elas são muito importantes, pois atuam removendo a celobiose que foi formada na mistura (MEDVE, 1997; MIETTINEN-OINONEN, 2007).

A Figura 3 representa um esquema de degradação da celulose pela ação das principais enzimas celulolíticas.



Fonte: OLIVEIRA (2010)

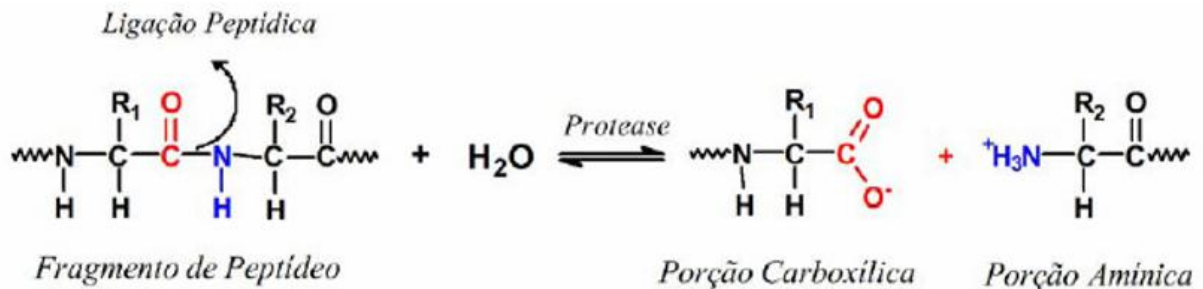
O fungo *A. niger* consegue produzir celulases, bem como uma grande variedade de micro-organismos na natureza. No entanto, só alguns conseguem degradar a celulose natural. A celulase de origem fúngica é produzida quando o micro-organismo é inoculado em meios de cultura que contenham celulose, sefarose (polissacarídeo bastante utilizado na produção de resinas para a purificação de proteínas), lactose ou celobiose como fonte de carbono. A maior produtividade é obtida quando se utiliza celulose na forma pura (cristalina) ou complexada (PEIXOTO, 2006).

Celulases têm uma grande importância em aplicações industriais, como no processamento de alimentos e sucos; na indústria de papel de celulose, na biorremediação de poluentes industriais, indústria de lavanderia e detergentes para limpeza de tecidos, e na indústria farmacêutica quando agem na extração de compostos produzidos pelas plantas (SHARMA *et al.*, 2016).

2.4.2 – Proteases

As proteases são enzimas catalisadoras das reações de hidrólise das ligações peptídicas que formam as proteínas, como representado na Figura 4. Alguns estudos mostram as proteases como condutoras de modificações específicas e seletivas nas proteínas (RAO *et al.*, 1998). Quanto maiores as forças que mantêm essa estrutura tridimensional, mais difícil será a ação das proteases. Assim, a clivagem de peptídeos proteolíticos torna-se importante e vem despertando o interesse de pesquisadores em relação aos processos de digestão de proteínas nos animais e nos homens (CAMPBELL, 2000).

Figura 4 – Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por protease



Fonte: ROCHA (2010)

A importância das proteases vai dos processos extracelulares aos intracelulares. Fora das células, essas enzimas agem na quebra de proteínas em moléculas menores que posteriormente serão absorvidas. Dentro das células, as proteases atuam no metabolismo, na sua regulação (RAO *et al.*, 1998), relacionada também a morte celular programada (POZA *et al.*, 2001). Essa classe de enzimas está presente em todos os organismos vivos, o que significa que organismos vegetais, animais e microbianos podem produzi-las. Contudo, as proteases produzidas por micro-organismos são mais interessantes quando relacionadas a proteases de origem vegetal ou animal, por exemplo. As microbianas apresentam características favoráveis

como o rápido crescimento (RAO *et al.*, 1998). Também à grande variedade de atividades catalíticas que realizam, e em geral são mais estáveis que as proteases vegetais e animais (WISEMAN, 1991 *apud* GIONGO, 2006).

São classificadas em seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade ao substrato, são elas: serina protease I (ex. tripsina e elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), aspartil protease (ex. pepsina, quimosina), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex. termolisina). Podem ser produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Constituem uma classe muito importante na indústria e correspondem a 60% da produção enzimática global (GIONGO, 2006).

Diversas finalidades estão sendo relacionadas às proteases nos últimos anos, na indústria de alimentos e na fabricação de detergentes (JOO *et al.*, 2003), bem como na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (RAO *et al.*, 1998). São amplamente empregadas em processos biotecnológicos de digestão de penas não aproveitadas em aviários, para redução de resíduos de pena provenientes de aviários, sendo convertidas em alimentos industriais, fertilizantes, colas, filmes ou na produção de aminoácidos raros como a serina, cisteína e a prolina (GIONGO, 2006); em fármacos; no processamento de alimentos; produção de extratos de leveduras, em bebidas, como na produção de cervejas resistentes ao congelamento; panificação; no amaciamento de carne; na produção de queijo, promovendo a coagulação do leite, fabricação de detergentes, entre outras aplicações (WISEMAN, 1991 *apud* GIONGO, 2006).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Preparo do resíduo da casca do coco verde

O coco verde *in natura* foi selecionado, aberto, obtendo-se apenas o mesocarpo do coco, estrutura da fruta que fica entre o epicarpo e o endocarpo, e dilacerados com a utilização de um facão. Lavado e a secagem feita em estufa, durante 48h, a 70°C. A moagem foi feita em moinho de facas (TECNAL) até se obter o pó que é demonstrado na Figura 5. O substrato preparado foi armazenado em sacos plásticos com fechamento hermético.

Figura 5 – Pó da casca do coco



Fonte: Autor (2017).

3.2 – Caracterização do resíduo da casca do coco verde

A caracterização físico-química dos resíduos foi realizada quanto ao teor de sólidos solúveis (°brix), densidade aparente, pH, umidade, cinzas e açúcares redutores totais.

3.2.1 – Teor de sólidos solúveis (°brix)

Para determinação do teor de açúcares presente no mesocarpo do coco foram adicionados 9mL de água destilada a 1g do substrato em frasco erlenmeyer de 125mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora por uma hora sob agitação de 200rpm. Seguida de filtração com bomba a vácuo, em funil de *Buchner*, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o resíduo do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro, o resultado

multiplicado por dez, devido à diluição. Esse procedimento foi adaptado da metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.2.2 – Densidade aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100g do substrato, em balança. O substrato foi colocado em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado e espaços vazios (CORREIA, 2004). A densidade aparente é expressa conforme a Equação (1):

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (ml)} \quad Eq.\ (1)$$

3.2.3 – pH

Preparou-se uma suspensão com 10mL de água e 1g do substrato. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, depois o pH foi mensurado com potenciômetro digital previamente calibrado com soluções padrões (IOL, 2005).

3.2.4 – Umidade

A umidade é representada pelo teor de água presente na amostra. Para análise da umidade, pesou-se aproximadamente 2,0g da amostra em placa de petri previamente seca e tarada e determinada conforme Equação (2). Em seguida, o conjunto amostra-recipiente foi colocado em estufa a 85°C durante 24 horas.

$$Umidade = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad Eq.\ (2)$$

3.2.5 – Teor de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo ácido carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Foram pesados 1g do bagaço em frasco erlenmeyer de 125mL, adicionado 9mL de água destilada e 5mL de HCl 1N. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 200rpm durante uma hora. Posteriormente, foi adicionado 2mL de NaOH 1N. A mistura foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5mL da solução e adicionou 2,5mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100°C por cinco minutos e resfriados em banho de gelo por mais cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

3.3 – Processo fermentativo

3.3.1 – Planejamento experimental

Para o estudo da produção de celulasas, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória.

No planejamento experimental, as variáveis independentes foram umidade inicial (U_i) do material a ser fermentado e a concentração de fonte de nitrogênio (sulfato de amônia), por

ser este um nutriente importante no desenvolvimento microbiano. Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados por Tavares (2009) na produção de celulases com bagaço de coco lavado, com *Aspergillus* sp.

O planejamento experimental seguiu os níveis estipulados na Tabela 3 e a matriz do planejamento está apresentada na Tabela 4 que apresenta as variáveis utilizadas no planejamento, bem como suas codificações e os níveis. A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica 7.0.

Tabela 3 – Níveis utilizados no planejamento experimental

Variável	-1	0	+1
N	0	0,5	1
U	60%	70%	80%

Tabela 4 – Planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central

Ensaio	N (nitrogênio)	U (umidade)	Resultado
1	-1	-1	N (0) – 60%
2	+1	-1	N (1) – 60%
3	-1	+1	N (0) – 80%
4	+1	+1	N (1) – 80%
5	0	0	N (0,5) – 70%
6	0	0	N (0,5) – 70%
7	0	0	N (0,5) – 70%

3.3.2 – Micro-organismo e inóculo

3.3.2.1 – Micro-organismo

O fungo *Aspergillus* sp. utilizado nesse experimento foi isolado de peças anatômicas conservadas em formol 10% do complexo de Laboratórios de Anatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.3.2.2 – Inóculo

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) nos tubos e placas com conídios. Após agitação, os conídios foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem e posteriormente ser incubado. A quantificação da suspensão de conídios obtida foi feita através de contagem dos conídios em Câmara de Neubauer espelhada e o volume de suspensão de conídios a ser adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 10^7 conídios por grama de substrato sólido fixada nos 7 experimentos listados na matriz do planejamento.

A concentração de conídios do inóculo foi calculada seguinte a Equação (3) e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado através da Equação (4):

$$C_{Conídios}(\text{conídios/mL}) = \bar{E} \times 25 \times 10^4 \times F_D \quad \text{Eq. 3}$$

$$V_{Suspensão}(\text{mL}) = \frac{\text{Concentração de inóculo} \left(\frac{\text{conídios}}{\text{g}} \right) \times m(\text{g})}{\text{Concentração de esporos} \left(\frac{\text{conídios}}{\text{mL}} \right)} \quad \text{Eq. 4}$$

Em que:

$C_{Conídios}$ – Concentração de esporos na suspensão;

\bar{E} – Média de conídios contados na Câmara de Neubauer;

F_D – Fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer;

A concentração de inóculo desejada para a fermentação é 10^7 ;

m – Massa de substrato utilizada.

3.3.3 – Experimentos de fermentação

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g do substrato previamente umidificado.

A umidade inicial do meio foi ajustada para 60, 70 e 80% (base úmida) pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado através de um balanço de massa, seguindo a Equação (5):

$$V_{AA} = m_{AA} = \frac{mi(U2-U1)}{(1-U2)} \quad \text{Eq.5}$$

3.4 – Extração das enzimas

3.4.1 – Obtenção do extrato enzimático

A cada 1g de amostra retirada do cultivo foi adicionado 30mL do tampão citrato 0,05M, pH 4,8. O meio fermentado em suspensão foi colocado em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 200rpm por 30 min. Em seguida, procedeu-se a filtração com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o resíduo da fermentação do sobrenadante contendo o extrato enzimático. A amostra foi armazenada a 4°C para análises posteriores.

3.4.2 – Resíduo da fermentação

O resíduo da fermentação retido em papel filtro de massa conhecida foi pesado. Levado a estufa (OLIDEF - CZ) por 24 horas a 85°C para eliminar a umidade. Ao fim das 24 horas, o conjunto papel filtro – resíduo seguiu para o dessecador, até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, o conjunto foi pesado novamente. A biomassa foi determinada pela diferença de peso entre o conjunto papel filtro – resíduo e a massa do papel filtro.

3.4.3 – Análises do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto foi analisado quanto ao pH, proteínas totais, atividade celulolítica e proteolítica.

3.4.3.1 – pH

O pH do extrato enzimático bruto foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (AKSO - AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

3.4.3.2 – Proteínas totais

O branco foi preparado em um microtubo com 800µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford.

Para a análise do cultivo, adicionou-se em um microtubo 10µL da amostra, 790µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos e a absorbância foi quantificada no comprimento de onda igual a 595nm.

Empregou-se a albumina sérica bovina como padrão (BRADFORD, 1976). Cada amostra do filtrado foi analisada em triplicata.

3.4.3.3 – Determinação da atividade da exoglucanase (FPase)

Para determinação da atividade da exoglucanase (FPase), foi utilizada a metodologia recomendada por Ghose (1987 *apud* OLIVEIRA JÚNIOR, 2014), empregando-se como substrato o papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras de 1 x 6cm. Cada tubo de ensaio recebeu uma tira de papel. Em seguida, adicionou-se 0,25mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,25mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 60 minutos em banho termostatizado (SOLAB – SL 150). Por fim, transferiu-se 0,5mL da mistura reacional para tubos de ensaio e 0,5mL do reagente DNS. Os tubos seguiram para o banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas.

Ao branco da reação foi adicionado 0,25mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,25mL do extrato enzimático. Posteriormente, adicionou-se 0,5mL do reagente DNS, o substrato o papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras de 1 x 6cm em cada tubo que seguiram para o banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas.

A leitura foi realizada no comprimento de onda igual a 540nm e o branco do espectro foi preparado com 0,5mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,5mL do reagente DNS, que seguiu para o banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas. Uma unidade da atividade da celulase é definida pela quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto (equivalente a 0,18mg de glicose por minuto) (ALVA et al., 2007).

3.4.3.4 – Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase)

Para determinação da atividade da endoglucanase (CMCase), fez-se uso do protocolo de Ghose (1987 *apud* OLIVEIRA JÚNIOR, 2014). Em que foi utilizada como substrato uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2% em tampão citrato 0,05M, pH 4,8. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25mL do substrato e 0,25mL do extrato enzimático. A reação de hidrólise foi incubada a 50°C durante 30 minutos. A glicose liberada foi estimada pela reação com 0,5mL de ácido dinitrosalicílico, os tubos foram levados ao banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas.

Aos brancos da reação foram adicionados 0,25mL do extrato enzimático, 0,5mL do reagente DNS, 0,25mL do substrato, a solução de carboximetilcelulose sódica a 2% em cada tubo que seguiram para o banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas.

O branco do espectro foi preparado com 0,5mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,5mL do reagente DNS, que seguiu para o banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 4mL de água destilada e homogeneizadas. Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto (ALVA *et al.*, 2007).

3.4.3.5 – Atividade proteolítica

A atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, misturou-se 100µL do extrato do sobrenadante a 100µL do tampão tris 0,1M, pH 9. Em

seguida, foi adicionado 100µL do substrato (azocaseína 10mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a 10.000g por 5 minutos em centrífuga (MINISPIN - EPPENDORF), foi adicionado 200µL de NaOH 1,8N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando-se água destilada no lugar do sobrenadante (GIONGO, 2006).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização do resíduo da casca do coco verde

Os resultados da caracterização do resíduo do coco, utilizado como substrato no processo de produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização do resíduo de coco verde

Parâmetros Analisados	Unidade	Resultados
Sólidos solúveis	°brix	1,6
Densidade aparente	g/mL	0,306
pH	-	4,8
Umidade	%	9
Açúcares redutores totais	g/L	17,622

Fonte: AUTOR (2017)

De acordo com a concentração de sólidos solúveis (1,6 °brix) do resíduo do coco verde ficou um pouco distante da concentração encontrada na polpa (6,60 °brix) descrita por Kanzawa e Ditchfield (2010), tendo em vista que o coco utilizado no presente trabalho passou pelo processo de lavagem e redução da concentração de açúcares do resíduo. A baixa umidade encontrada deve-se ao processo de secagem durante 48 horas a 70°C, que as lascas dilaceradas da casca do coco foram submetidas.

Caracteristicamente, esse substrato apresentou um teor de açúcares redutores igual a 17,622mg de ART/g de amostra, e um pH (4,8) menor, contudo bastante aproximado do pH da polpa (6,5) apresentado por Kanzawa e Ditchfield (2010). A densidade aparente (0,306 g/mL) mostra uma tendência cabível a não se compactarem, melhorando a aeração do meio de cultivo, devido a porosidade e os espaços vazios da matéria, permitindo um melhor desenvolvimento do micro-organismo.

4.2 – Processo fermentativo

4.2.1 – Planejamento experimental

As amostras coletadas de cada frasco, contendo condições diferentes, após as 96 horas de fermentação, posterior ao instante de inoculação (item 3.3.2.2), foram analisadas para atividade enzimática (atividade da CMC_{ase}, atividade da FP_{ase} e atividade proteolítica). Cada tubo contendo o extrato enzimático de cada condição apresentou visivelmente cor e turbidez distintas.

4.2.1.1 - Atividade da endoglucanase (CMC_{ase})

A Tabela 6 apresenta os resultados experimentais da atividade da endoglucanase (CMC_{ase}) variando-se os seguintes fatores: percentual inicial de umidade (U) e adição de uma fonte de nitrogênio (N). As atividades apresentadas foram obtidas às 96 horas de fermentação.

Tabela 6 – Resultado experimental em termos de atividade endoglucanásica para o resíduo do coco verde lavado.

Ensaio	A.E. CMC _{ase} (U/g)
1	0,323
2	0,522
3	2,454
4	1,629
5	0,775
6	0,827
7	0,724

O diagrama de Pareto Figura 6 mostra que para atividade de CMC_{ase} todas as variáveis são estatisticamente significativas com 95% de confiança. Dessa maneira, a fonte de nitrogênio, a umidade e a interação desses dois fatores influenciaram positivamente na produção da CMC_{ase}. A Tabela 7 apresenta a análise da variância completa.

Figura 6 – Diagrama de Pareto para atividade da endoglucanase com 96 horas de fermentação

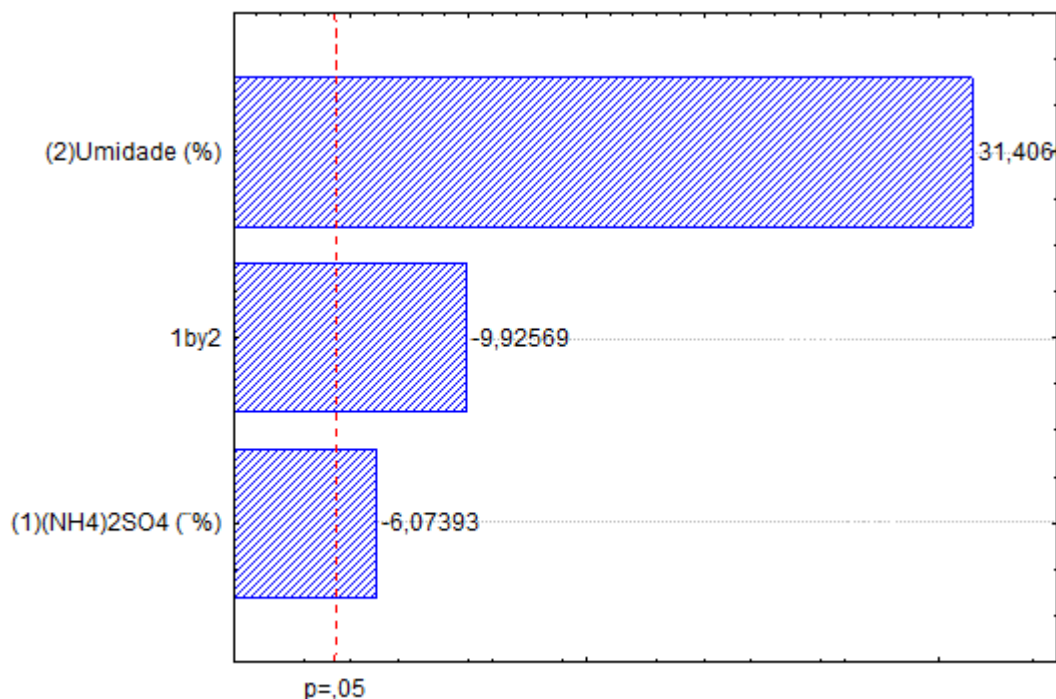


Tabela 7- Análise de variância para o modelo descrevendo a atividade de CMC_{Case} como função da umidade (U) e adição de fonte de nitrogênio (N)

Fonte de variação	SS ^a	DF ^b	MS ^c	F
Regressão	2,9818	3	0,9939	Teste F = 1,535
Resíduo	0,3627	3	0,1201	F _{calc} =8,277
Falta de ajuste	0,3573	1		F _{tab} (5%) = 5,391
Erro puro	0,0053	2		
Total	3,3445	6		
R ² (%)	89.15			

A partir dos resultados obtidos, com auxílio do planejamento fatorial, foi possível ajustar os dados para um modelo que relacione a atividade enzimática com os parâmetros estudados. O modelo obtido para a atividade da endoglucanase (CMC_{Case}) é apresentado pela Equação 6:

$$\text{CMCase} = 1,0363 - 0,1566.N + 0,8096.U - 0,2559N.U \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que:

CMCase – atividade celulolítica

N – concentração da fonte de nitrogênio

U – umidade

Esse modelo explica 78,31% das variações, com $R^2 = 89,15$. Como o teste F deu acima de 1, o modelo é estatisticamente significativo, representando os efeitos dos parâmetros estudados na atividade de CMCase. Porém, não pode ser utilizado para fins preditivos. Para isso, o teste F deveria ser superior a quatro (BARROS NETO *et al.*, 1996).

O coeficiente de determinação ou explicação R^2 quantifica a qualidade do ajuste, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Varia de 0 a 100% (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O teste F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado. Sempre que esta relação for maior que 1 a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos. O valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETO *et al.*, 1996).

Como observado na Figura 6, a umidade e a fonte de nitrogênio são efeitos de grande importância para o processo, o que significa dizer que são nos maiores níveis de umidade e fonte de nitrogênio que se encontra o maior valor de CMCase. A superfície de resposta é a descrição gráfica do modelo, o que facilita a interpretação dos resultados (Figura 7). A influência dos fatores também pode ser discutida pela Figura 8.

Figura 7 – Superfície de resposta da influência da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação

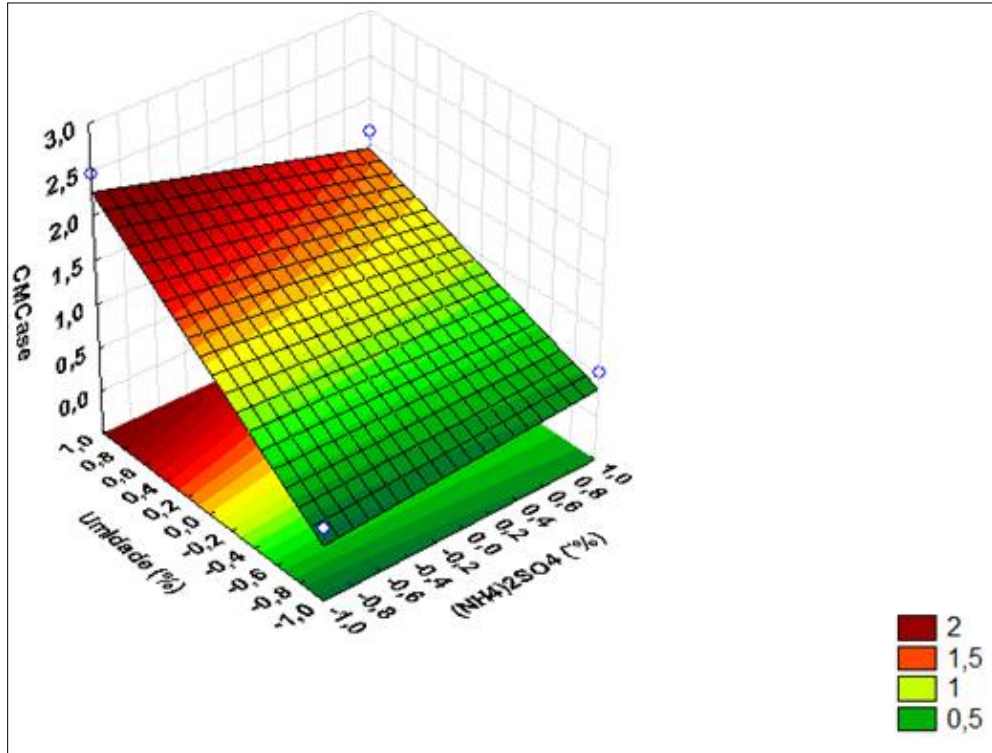
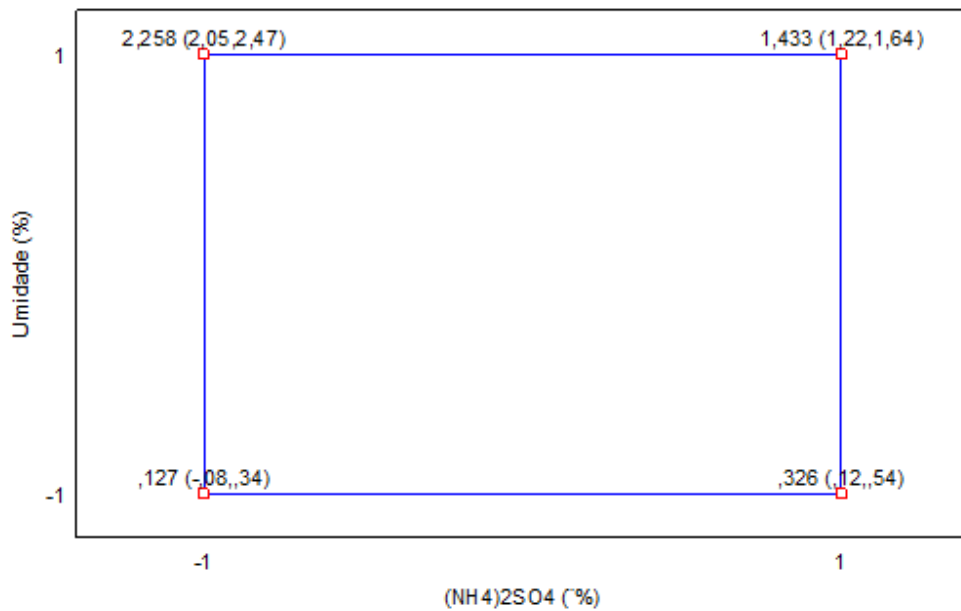


Figura 8 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação



Este resultado comparado com o de Oliveira Júnior (2014) que estudou a influência da umidade inicial da produção de CMCase usando resíduo do coco. Encontrou uma umidade inicial de 66%, sendo o melhor resultado da produção da enzima CMCase, e atividades enzimáticas de 0,282 e 0,279 UI/mL. Com os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a concentração inicial de umidade e a fonte de nitrogênio são variáveis, e grande importância para o processo, ou seja, os maiores valores de atividade enzimática (2,454 U/g) estão associados a valores de umidade superiores a 60%, como no ensaio 3 e umidade inicial igual a 80%.

4.2.1.2 – Atividade da exoglucanase (FPase)

A influência das variáveis do processo e a forma de interação entre estas variáveis foram analisadas também para a atividade da FPase por planejamento experimental, com o objetivo de se otimizar essa atividade.

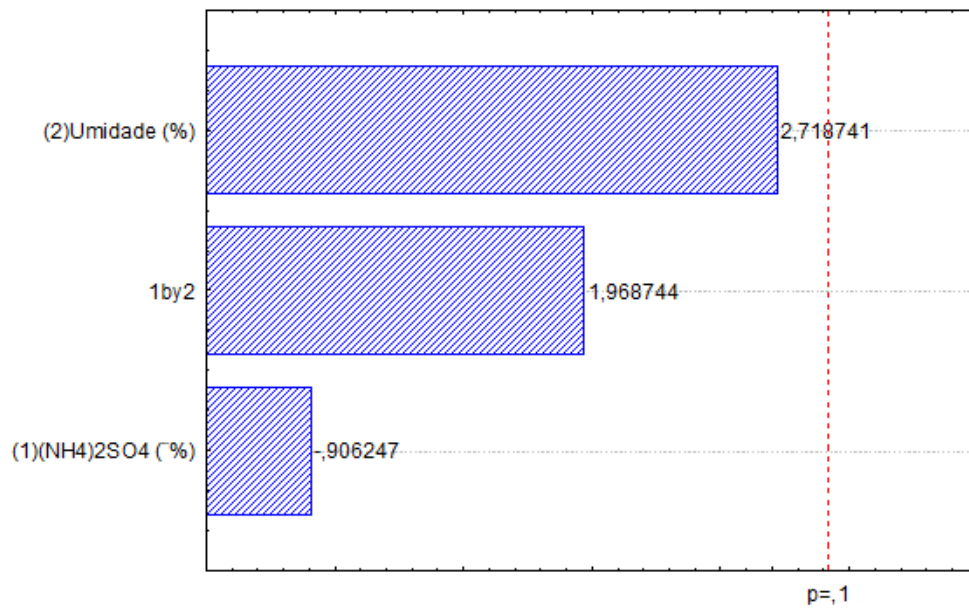
A Tabela 8 apresenta os resultados experimentais da atividade da exoglucanase (FPase) analisando-se os fatores: percentual inicial de umidade (U) e adição de uma fonte de nitrogênio (N). Os resultados estão apresentados para o tempo de 96h de fermentação.

Tabela 8 – Resultado experimental em termos de atividade exoglucanásica para o resíduo do coco verde lavado

Ensaio	A.E. FPase (U/g)
1	0,485
2	0,344
3	0,522
4	0,574
5	0,270
6	0,319
7	0,368

Com os resultados obtidos durante às 96h de fermentação, a partir do planejamento fatorial, o diagrama de Pareto (Figura 9) mostra que nenhuma das variáveis é estatisticamente significativa, nem com 90% de confiança. Assim, não temos como propor um modelo de regressão.

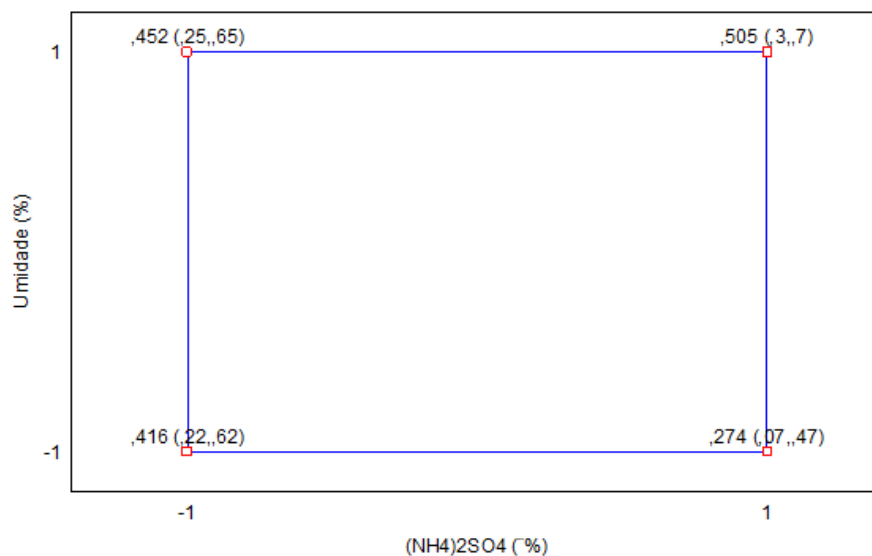
Figura 9 – Diagrama de Pareto para atividade da exoglucanase com 96 horas de fermentação



No entanto, a curvatura foi checada, sendo dessa forma estatisticamente significativa, o que apresenta a necessidade de um planejamento DCCR (estrela) para a obtenção de um modelo de regressão de segunda ordem, que poderia explicar as variações produzidas pelos parâmetros estudados.

Nesse contexto, a influência da umidade (U) e da fonte de nitrogênio são explicadas pelo diagrama apresentado abaixo (Figura 10):

Figura 10 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da exoglucanase para 96 horas de fermentação



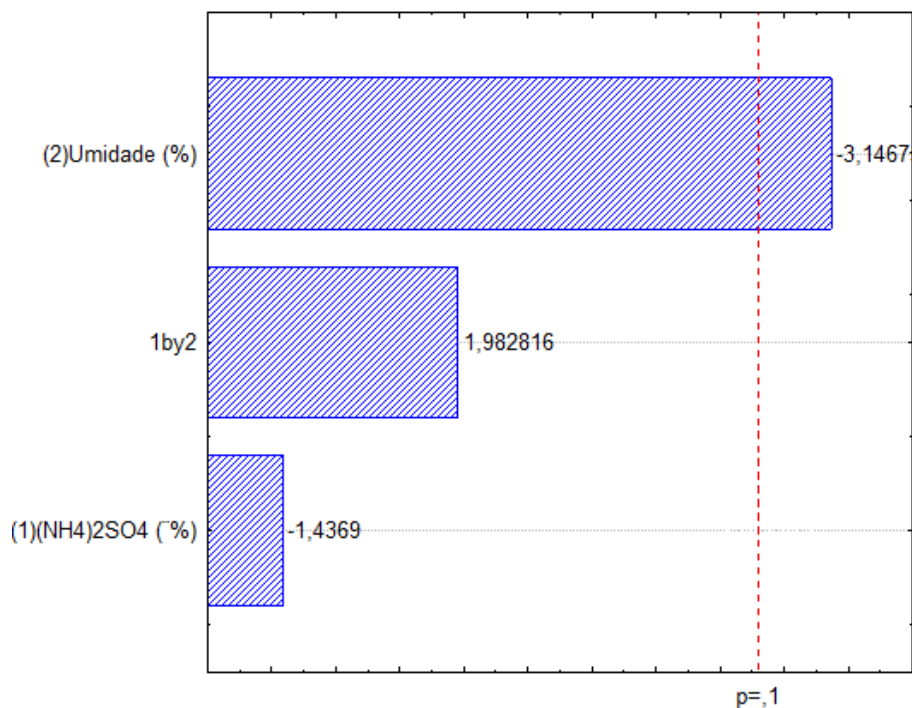
Com os resultados obtidos por meio do diagrama apresentado na Figura 9, observa-se qualitativamente que a concentração inicial de umidade e a fonte de nitrogênio demonstram importância para o processo, com maiores valores de atividade enzimática, quando estão associados a valores de umidade e fonte de nitrogênio mais altos, como no ensaio 4 (0,574 U/g), apresentando umidade inicial igual a 80% e adição de 1% do Sulfato de Amônia – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

4.2.1.3 – Atividade proteolítica

Com o objetivo de otimizar a atividade proteolítica, a influência das variáveis do processo e a forma de interação entre estas variáveis foram analisadas por planejamento experimental.

O diagrama de Pareto (Figura 11) mostra que para atividade proteolítica é variável, estatisticamente significativa com 90% de confiança é a umidade. Significa que são nos menores valores de umidade que se encontram os maiores valores de atividade proteolítica. A adição de nitrogênio tem efeito inibidor, mas não é estatisticamente significativa, assim como a interação com a umidade.

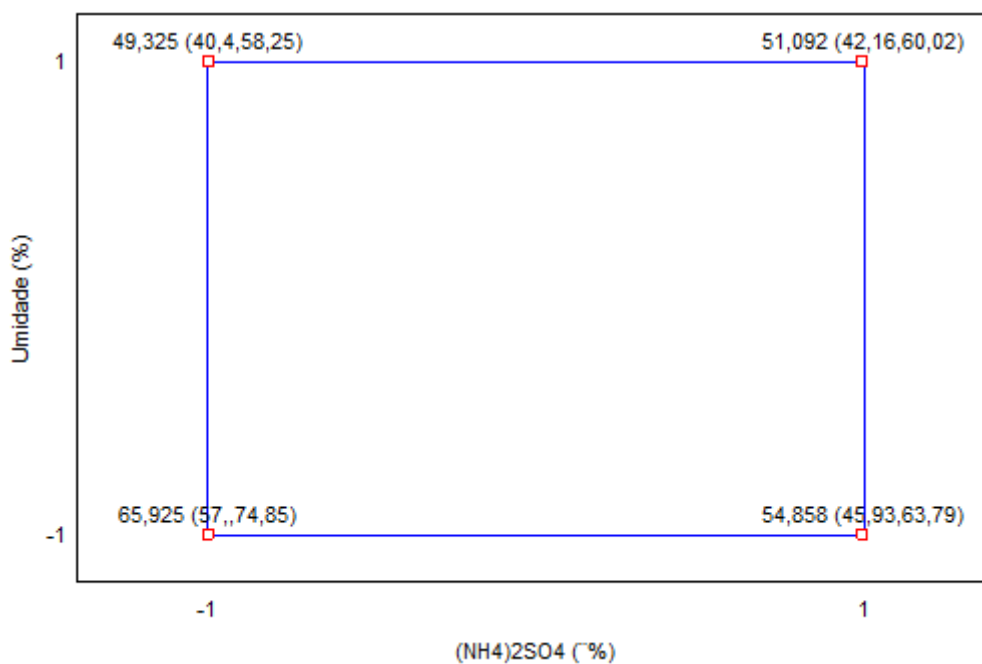
Figura 11 – Diagrama de Pareto para atividade proteolítica com 96 horas de fermentação



O modelo de regressão mostrou baixa correlação e ajuste. Contudo, quando checada a curvatura apresentou-se estatisticamente significativa, o que demonstra a necessidade de um planejamento DCCR (estrela) para a obtenção de um modelo de regressão de segunda ordem, que poderia explicar as variações produzidas pelos parâmetros estudados.

É possível compreender a influência da umidade (U) e da fonte de nitrogênio a partir do diagrama representado abaixo (Figura 12):

Figura 12 – Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade proteolítica para 96 horas de fermentação



A partir dos resultados obtidos pela análise do diagrama apresentado na Figura 12, é previsto qualitativamente que a concentração inicial de umidade e a fonte de nitrogênio resultam em maiores valores de atividade enzimática quando estão associados a valores de umidade mais baixos, e fazendo uma correlação com o diagrama de Pareto apresentado na Figura 11, a adição de nitrogênio não é estatisticamente significativa, bem como a sua interação com a umidade.

4.2.2 – Processo fermentativo após o planejamento experimental

Depois da realização do planejamento experimental a fim de se encontrar a melhor condição, entre as variáveis analisadas de umidade e fonte de nitrogênio. Para o processo de fermentação em estado sólido, foi definido que a fermentação de 240 horas ocorreria de acordo com a condição mais favorável principalmente para a produção de celulases e proteases. Como

a produção das celulases se apresentou mais relevante a partir do planejamento, com destaque nas endoglucanases, o ensaio 3 (0 de fonte de nitrogênio e 80% de umidade) mostrou-se mais interessante para a produção dessas enzimas. Para a produção de proteases, a melhor condição seria a prevista no ensaio 1 (0 de fonte de nitrogênio e 60% de umidade). No entanto, foi considerado o fato de o fungo ter sido isolado de peças anatômicas, esperando-se uma boa atividade proteolítica mesmo em meio com umidade mais alta.

O processo fermentativo para produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas foi realizado conforme as metodologias descritas no Item 3, de forma que amostras foram coletadas periodicamente, a partir do instante seguinte à inoculação do micro-organismo para a realização das análises de pH e atividade enzimática.

Durante o período de 240 horas observou-se um crescimento satisfatório do fungo *Aspergillus* sp. já a partir das primeiras 72 horas de fermentação. Além da coloração, que se apresentou em um tom marrom escuro após a esterilização, que ficou mais clara com o passar do tempo, a umidade aparentemente diminuiu em consequência da dificuldade da dissipação do calor gerado no processo fermentativo (Figura 13). O extrato enzimático também demonstrou mudanças, sobretudo de cor e turbidez ao longo do tempo do processo.

Figura 13 - Fermentação em estado sólido de 240h com resíduo do coco como substrato pelo *Aspergillus* sp.

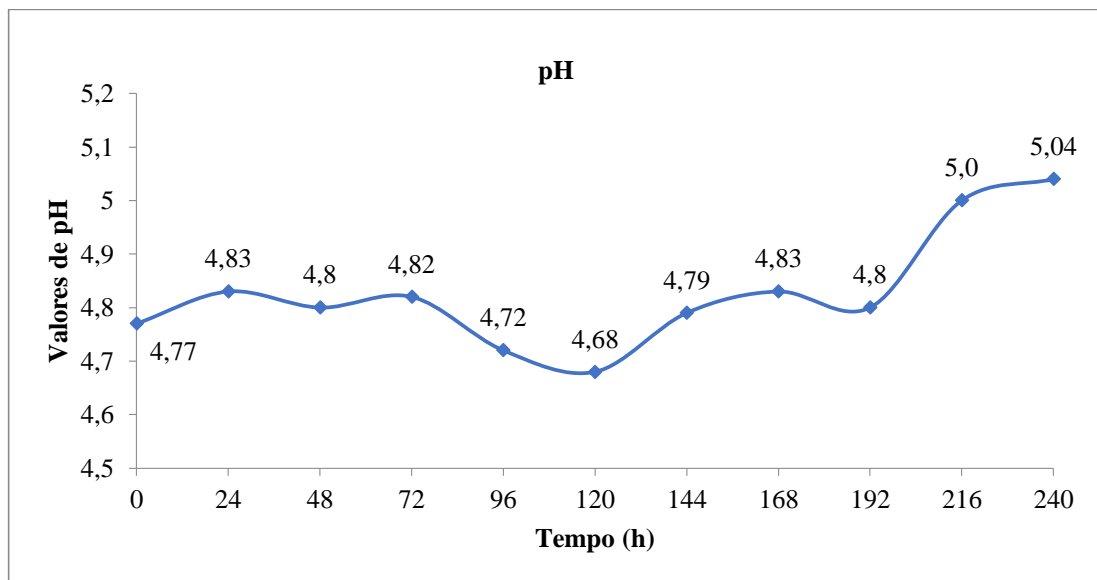


Fonte: Autor (2017).

4.2.2.1 – pH

O pH apresentou resultados aproximados durante o processo fermentativo. Essa proximidade entre o pH dos extratos enzimáticos de cada hora de fermentação foi devido as características do tampão utilizado no arraste das enzimas da matriz sólida (Figura 14).

Figura 14 – Valores de pH no decorrer de 240 horas do cultivo

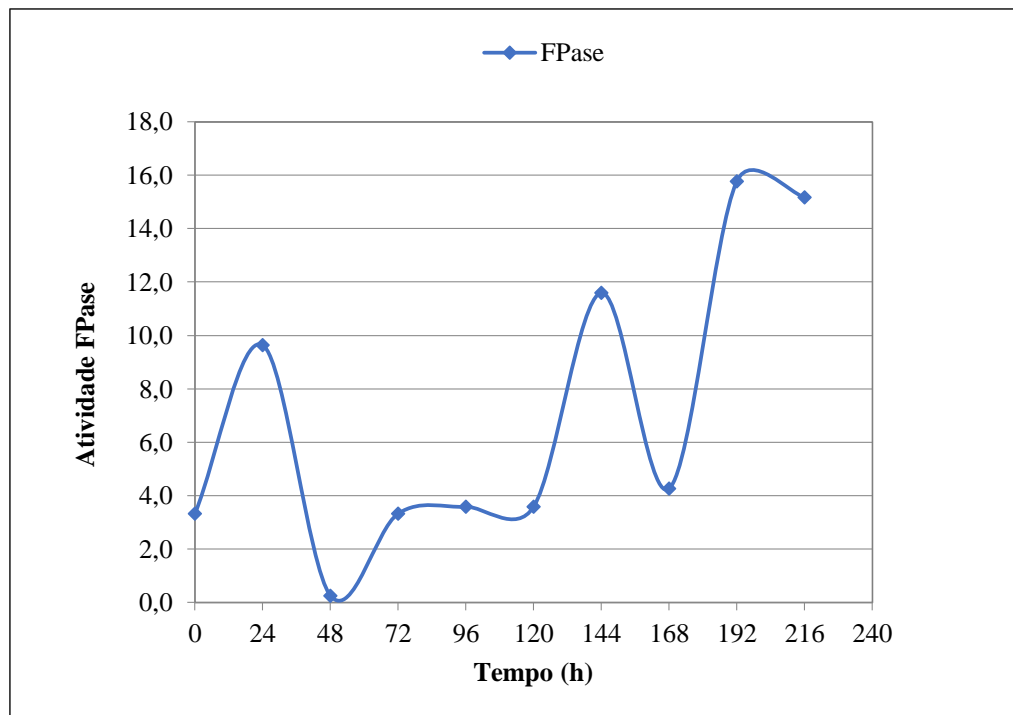


Fonte: Autor (2017)

4.2.2.2 – Atividade da exoglucanase (FPase)

Durante as 240 horas de fermentação, a exoglucanase (FPase) mostrou atividade em alguns picos, como em 24h, 72h, 144h e 192h, uma alta produção e, conseqüentemente, uma alta atividade enzimática de 9,634 U/g, 3,325 U/g 11,595 U/g 15,773 U/g respectivamente. Durante 72h até 120h se manteve praticamente constante. Essa atividade mostrou-se satisfatória e bem característica do metabolismo do micro-organismo, que realizou um processo compensatório quando logo após os picos de atividade enzimática, passa pela fase de consumo (queda) das moléculas que foram hidrolisadas (Figura 15).

Figura 15 – Atividade da exoglucanase (FPase) durante 240 horas de fermentação



Fonte: Autor (2017).

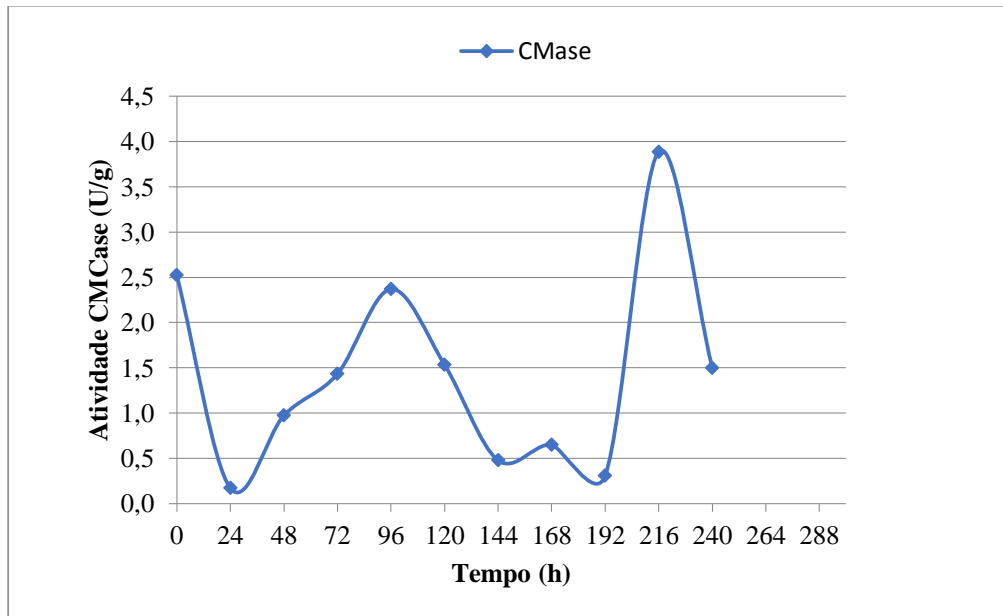
Zuñiga et al., (2009) na produção de FPase empregando bagaço de cana de açúcar e *A. niger* com nutrientes (ureia, peptona, extrato de levedura e outros), a temperatura de 32°C, obteve a atividade de 0,59U/g, após 72h de processo. O valor obtido neste estudo, em alguns casos, foi superior aos encontrados na literatura, sobretudo no instante de 72h com uma atividade exoglucanásica igual a 3,325 U/g. Além disso, neste trabalho não foi adicionado nutrientes e os experimentos foram realizados a temperatura de 30°C.

4.2.2.3 – Atividade da endoglucanase (CMCase)

Quando foi avaliada a atividade da CMCase durante o processo fermentativo de 240 horas, nota-se que já a partir de 24h o micro-organismo começa a produzir gradativamente a endoglucanase (CMCase), ou seja, é observado o aumento da atividade a partir desse instante, até alcançar o primeiro pico de atividade às 96h (2,370 U/g). Posteriormente, percebe-se um comportamento agora de consumo do que foi hidrolisado, considerando que após às 96h o *Aspergillus* sp. passa a produzir uma menor quantidade de enzima, e conseqüentemente a atividade vai diminuindo até atingir 0,477 U/g em 144h, demonstrando desse ponto em diante poucas variações da atividade enzimática e consumo dos açúcares redutores liberados da hidrólise enzimática. O pico máximo de atividade da endoglucanase é visto às 216h de

fermentação, quando atinge 3,888 U/g de atividade, e a partir daí, apresenta um decréscimo dessa atividade proporcionado pelo consumo dos açúcares redutores originados da hidrólise enzimática promovida pelo micro-organismo.

Figura 16 – Atividade da endoglucanase (CMCase) durante 240 horas de fermentação



Fonte: Autor (2017)

Dessa forma, é possível perceber que o *Aspergillus* sp. se comportou de maneira satisfatória e coerente, e a atividade da endoglucanase alcançou picos relevantes durante o processo. Amorim (2010) mostra em seus resultados que com uma adição de fonte de nitrogênio de 0,50%, obteve-se uma maior atividade enzimática trabalhando com uma menor atividade de água (45% de umidade inicial), atingindo 1,792 U/g (0,0896 U/mL). Já Chandra et al. (2008) encontrou valores máximos de 3,24 U/g de CMCase utilizando farelo de trigo como substrato. O presente trabalho, utilizando unicamente a umidade (80%) como fator influente no processo fermentativo, ou seja, sem a adição de uma fonte de nitrogênio, apresentou valores máximos de 3,888 U/g de CMCase.

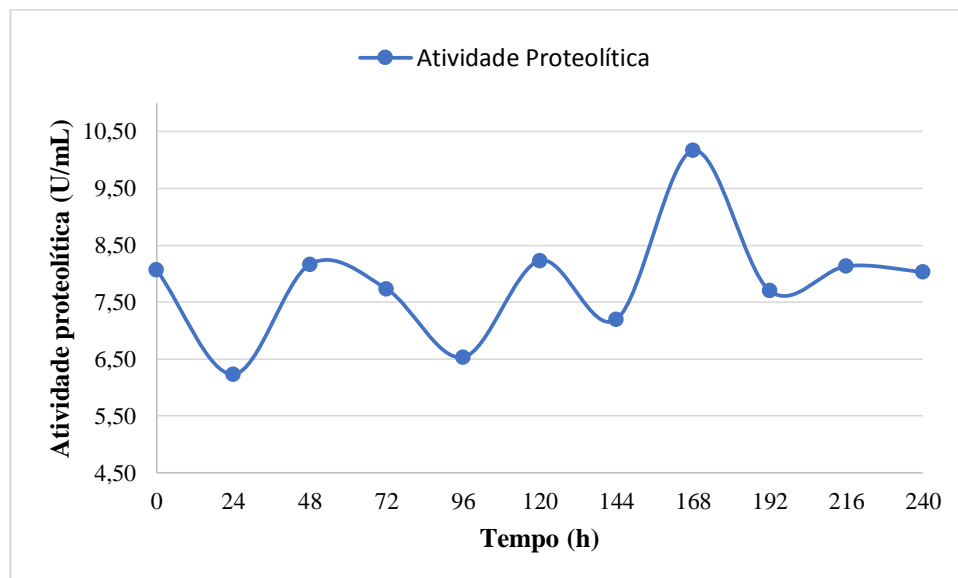
4.2.2.4 – Atividade proteolítica

A atividade proteolítica no processo fermentativo de 240 horas teve destaque, considerando que não foi realizado em condições que favoreciam a sua produção. De acordo com planejamento experimental, as condições ideais para a produção de proteases aconteceriam nos menores valores de umidade (60%) e de fonte de nitrogênio (0).

Todavia, como previsto antes da escolha da melhor condição (Ensaio 3) para a produção das enzimas celulolíticas e proteolíticas, considerou-se a origem de isolamento do fungo utilizado. Isolado de peças de anatômicas, o fungo empregado no trabalho apresentava ótima adaptação na produção de enzimas proteolíticas, a fim de degradar cadeias protéicas maiores para seu consumo e metabolismo.

Nesse cenário, a produção de proteases e conseqüentemente a sua atividade, mostrou-se bastante significativa. Boas atividades já podem ser identificadas nas primeiras 48h de fermentação, quando atinge o primeiro pico de 8,167 U/g de proteases. E segue o comportamento coerente e compensatório, até atingir a atividade máxima às 168h de fermentação, com uma atividade de 10,167 U/g de proteases (Figura 17).

Figura 17 – Atividade proteolítica durante 240 horas de fermentação.



Fonte: Autor (2017)

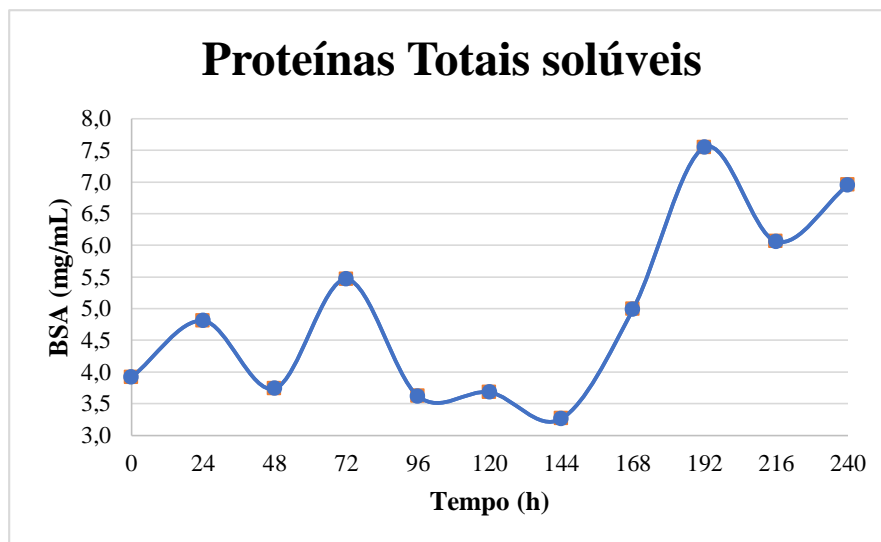
No entanto, para a melhor atividade proteolítica comparada com da literatura é necessário estabelecer melhores condições para a produção dessas enzimas, muito embora a produção tenha se apresentado bastante relevante em relação as condições oferecidas ao micro-organismo no processo. Couri *et al.*, (2000) com *A. niger* e utilizando como substrato farelo de trigo e pectina cítrica obtiveram a atividade de 5,27 U/mL (unidade de enzima por preparo enzimático) às 42 horas à 32°C, comprovando que mesmo em condições desfavorecidas, o fungo empregado no presente trabalho apresenta-se adaptado à produção de proteases.

4.2.2.5 – Proteínas totais solúveis

A alteração da quantidade de proteínas totais, que representam o *pool* de proteínas que foram produzidas durante o processo fermentativo, demonstra que a partir das 144h é visível um aumento na produção enzimática, das CMCases às 216h, FPases às 192h e proteases às 168h. Com isso, as proteínas totais solúveis se apresentaram com um perfil satisfatório e coerente no presente estudo (Figura 18).

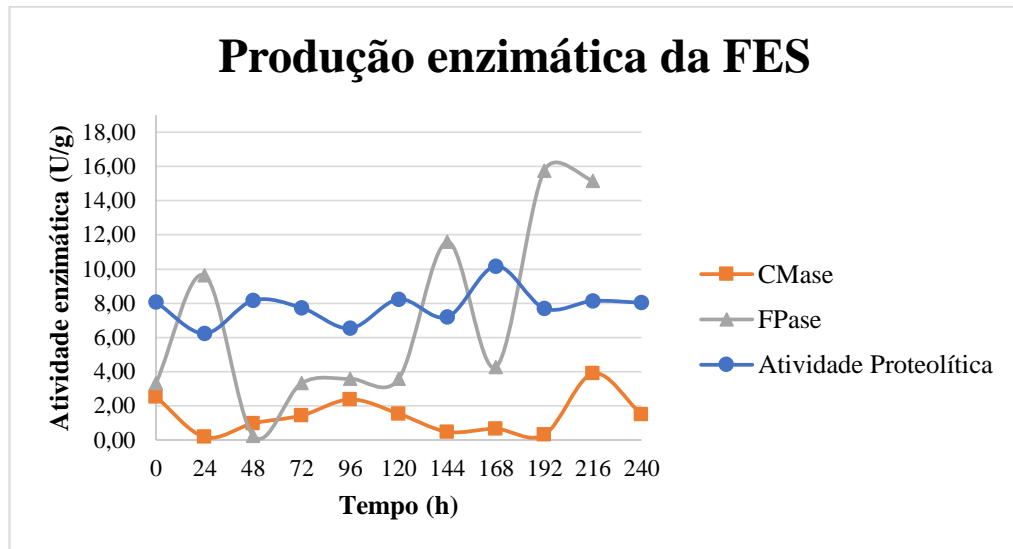
Foi feita uma comparação com a inter-relação entre toda a proteína produzida, celulases e proteases. Esses resultados podem ser observados e analisados na Figura 19.

Figura 18 – Quantidade das proteínas totais (mg/mL) no decorrer do processo fermentativo até 240 horas



Fonte: Autor (2017)

Figura 19 – Inter-relação da produção enzimática em U/g no decorrer do processo fermentativo até 240 horas



Fonte: Autor (2017)

4.2.2.6 – Atividade enzimática representativa

Diante do exposto no trabalho, nota-se que a maior atividade enzimática e consequente produção enzimática durante o processo foi das exoglucanases (FPase). Em um tempo de 192 horas a atividade de FPase chegou a 15,176 U/g, como pode ser visto na Tabela 9:

Tabela 9 – Maior atividade enzimática no período de 240 horas de fermentação

Enzimas produzidas na FES	Atividade máx. (U/g)	Tempo (h)
CMCase	3,888	216
Fpase	15,176	192
Protease	10,167	168

As proteases ficaram com a segunda maior atividade, mesmo em condições desfavoráveis para a produção ótima. No entanto, como o fungo já era adaptado a alta produção dessas enzimas, essa atividade tornou-se relevante, 10,167 U/g as 168 horas da fermentação, à frente das CMCases que tiveram a menor produção no tempo de 216 horas (3,888 U/g).

5 – CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, comprova-se potencialidade na habilidade do fungo *Aspergillus* sp. no aproveitamento do resíduo agroindustrial do coco verde como fonte de carbono para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido.

O planejamento experimental fatorial 2^2 contribuiu de maneira decisiva para a escolha das melhores condições do processo fermentativo, de forma que fosse possível o melhor aproveitamento do substrato escolhido (coco), além de poder ser aplicado na otimização de processos fermentativos relacionados a produção enzimática, como foi o caso do presente estudo.

Com a escolha da condição que melhor favoreceria o processo de produção enzimática por FES, durante as 240 horas de fermentação, as exoglucanases (FPase) apresentaram melhor atividade enzimática e melhor produção no tempo de 192 horas.

Já as endoglucanases (CMCases) apresentaram baixa atividade e produção enzimática no tempo de 216 horas, em relação às outras enzimas que foram produzidas durante o processo.

A potencialidade na habilidade do fungo foi comprovada principalmente analisando-se a produção de proteases, que superaram o nível de atividade e produção, levando em consideração as condições fermentativas as quais o fungo foi submetido. Contudo, é importante destacar que maiores estudos acerca da produção enzimática do isolado *Aspergillus* sp. de peças anatômicas conservadas em formol do Laboratório de Anatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, podem ser realizados a fim de se priorizar apenas a produção proteolítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SALVA, J.; CHIU, Y.Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B.S.; BHAVYA, D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B.S.; VARALAKSHMI, K.N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotechnol. v.6, n.5. p. 576-581. 2007.

AMORIM, C.B. Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de (*Anarcadium Orcidentalle* Lineu) utilizando o microorganismo *Trichoderma* sp. 2010. 100f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB.

BARRIOS-GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. Process Biochemistry. v. 47, p. 175-185, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Editora da Unicamp, 1996, 297p.

BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. Enzyme in Food Processing. San Diego: Academic Press, cap. 6, p. 121-158, 1993.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbiology Technology, v. 3, p. 90-104, 1984.

BONTEMPO, M. O poder medicinal do coco e do óleo de coco extravirgem. São Paulo: Alaúde Editorial, 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 254, 2001.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 254, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. New York, v. 72, n.1/2, p.248-254, 1976.

- CAMPBELL, M. K. Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 752, 2000.
- CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. Horticultura Brasileira, Vitória da Conquista, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, v. 71, p. 45-50, 2000.
- CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celullignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 240p.; 2006.
- COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Boletim Ceppa, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.
- CORREIA, R.T.P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.
- COSTA, J. A. V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p.203, 1996.
- COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, G.A.S., FREITAS, S.P., COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochemistry, v. 36, p. 255-261, 2000.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochemical Engineering Journal, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.
- CUNHA, R. T. Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis. Rio de Janeiro, 1999. p. 122. Monografia, Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ, 1999.
- DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol.2, 2001.
- DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E.. Solid substrate cultivation. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

FERREIRA FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system (review). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, p. 1093-1109, 1994.

FERREIRA FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system (review). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, p. 1093-1109, 1994.

FONTENELE, R. E. S. Cultura do Coco no Brasil: caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. In: Congresso da Sober, 2005. Ribeirão Preto. *Anais do Congresso da Sober*, 2005. p. 1- 20.

FRUTAS DO BRASIL. Coco. Pós colheita. Editor técnico Wilson Menezes Aragão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 76 p, 2002.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.

GIONGO, J.L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 2006. 95f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

HAN, J. Properties of non wood fibers. Disponível em: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/han98a.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3d. São Paulo, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4d. São Paulo, 2005.

JOO, H.S.; CHANG, C.S.; KUMAR, C.G. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, UK, v.95, p.267-272, 2003.

KANZAWA, Cinthia Yuka; DITCHFIELD, Cynthia. Propriedades físico-químicas e microbiológicas da polpa de coco verde (*Cocos nucifera* Linn.). **Anais..** São Paulo: USP, 1 2AD.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEITÃO, M. F. F. Atividade de água e alterações microbiológicas dos alimentos. In: Atividade de água em alimentos. JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p. 13.1-13.8, 1997

LOSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 7, p. 258-265, 1985.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.

MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. de F.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; MORAIS, J. P. S.; ARAÚJO JÚNIOR, C. P. de, Painéis elaborados com resíduos de casca de coco. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-depublicacoes/-/publicacao/917915/paineis-elaborados-com-residuos-da-casca-de-coco-verde>> Acesso em: 18 de março de 2017.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund University. [S.l.]. 1997.

MIETTINEN-OINONEN, A. Cellulases in the textile industry. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. *Industrial Enzymes*. [S.l.]: Springer, v. XII, 2007. Cap. 4, p. 642.

MITCHELL, D.A ., LONSANE, B.K.. Definition, characterization and economic evaluation. In: *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London, 1992.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MURRAY, N. P. Caracterización y evaluación agronómica del residuo de fibra de coco: un nuevo material para el cultivo en sustrato. Valencia, 2001. 228 p. Tesis (Doctorales) en Ciencias Químicas, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

MURTHY, R.M.V.; KARANTH, N.G; RAO, R.K.S. Biochemical engineering aspects of solidstate fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. v.38, p.99-149, 1993.

OHLER, J. G. El cocotero: árbol de la vida. Roma: FAO, 1986. 348 p. (Estudios FAO de Producción y Protección Vegetal, n. 57).

OLIVEIRA JÚNIOR, S.D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da amazônia central, Amazonas, Brasil . *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases. 2010. 86f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE.

PALMA, M. B., Produção de Xilanasas em *Thermoascus aurantiacus* Cultivo em Meio Sólido. 2003. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical. Engineering Journal*, v.13, n. 2/3, p.81-84, 2003.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical. Engineering Journal*, v.3636, p.1-4, 2002.

PASSOS, P. R. A. Destinação Sustentável de Cascas de Coco (*Cocos nucifera*) Verde: Obtenção de Telhas e Chapas de Partículas. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências e Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

PEIXOTO, A.B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível

PEIXOTO, A.B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=269>. Consultad em 10 mai. 2017.

PENHA, E. M.; CABRAL, L. M.; MATTA, V. M. Água de coco. In: FILHO, W. (Org.). VG Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado, São Paulo: Edgard Blucher, 2005. p.1-11.

PINTO, G.A.S., BRITO, E.S., 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. Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916921, Nov. 2001.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os reinos dos fungos. 2 ed., v.1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, p.605, 2004.

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

RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. Advances in Applied Microbiology, v.38, p.99147, 1993.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.

ROCHA, C.P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de PósGraduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Editora Casa do Pão, 2005, 326.

ROGÉRIO, M.C.P. Valor nutritivo de subprodutos de frutas para ovinos. 2005. 318 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

ROSA, Morsyleide de Freitas et al. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa, 2002. 22 p. Documentos 52. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2842.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2017.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351362

SANTOS, 2017 Sharline

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese (Doutorado) – Programa de Pósgraduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S.S.; SONI, R.; SONI, S.K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Appl Biochem Biotechnol, 2016.

SILVA, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Rio de Janeiro: Embrapa Solos, Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1999. 370 p.

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

TAVARES, M. B. R. Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Zaragoza: Acribia, 228p, 1995.

ZUÑIGA, U.F.R., FARINAS, C.S., GONÇALVES, F.M.N., NETO, V.B., COURI, S., CRESTANA, S. Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulases em Fermentação Semi-Sólida do Bagaço de Cana-de-açúcar por *Aspergillus niger*. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN, 2009.