

74837 - PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *ASPERGILLUS* SP. UTILIZANDO O RESÍDUO DE COCO VERDE COMO SUBSTRATO

Debora Karenine Lacerda Gervasio¹, Melina Kehtle Lins de Lima², Emanuele Cardoso Dias³, Adrielly Silva Albuquerque de Andrade⁴, Caroline Targino Alves da Silva⁵, Adna Cristina Barbosa de Sousa⁶, Carlos Alberto Bispo de Sousa⁷, Andréa Farias de Almeida⁸

¹Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: deborakarenine94@gmail.com

²Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: melinaliins@hotmail.com

³Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail:dias_sigma@hotmail.com

⁴Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail:adrielly_saa@hotmail.com

⁵Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: carolinetargino.as@gmail.com

⁶Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: adnasousa@cbiotec.ufpb.br

⁷Doutor e Professor de Universidade Federal da Paraíba – CT/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: carlobispo@yahoo.com.br

⁸Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

RESUMO: A utilização de resíduos agroindustriais pode ser uma 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 na indústria. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas, utilizando a fermentação em estado sólido, empregando como substrato o bagaço do coco verde, pela ação do fungo *Aspergillus* sp. Foi realizada a caracterização do substrato, assim como um planejamento experimental fatorial 2^2 , a fim de se analisar a influência 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). Diante do resultado do planejamento, a atividade CMCase foi influenciada positivamente pelo menor nível da concentração de sulfato de amônio e pelo maior nível da umidade. Para a atividade FPase, os níveis superiores tanto da concentração de sulfato de amônio quanto da umidade favoreceram a produção enzimática. Já para as proteases, os níveis inferiores tanto da concentração de sulfato de amônio quanto da umidade favoreceram a produção dessas enzimas. Portanto, a concentração de sulfato de amônio e a umidade propostas no planejamento otimizaram o processo de produção enzimática a partir do resíduo de coco verde.

Palavras-chave: *Aspergillus* sp.; Celulases; Proteases.

ENZYME PRODUCTION BY *ASPERGILLUS* SP. USING GREEN COCONUT WASTE AS A SUBSTRATE

ABSTRACT: The use of agroindustrial residues can be an alternative 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 this purpose, solid state fermentation processes are considered, as well as the applicability of the enzymes produced in these systems in the industry. The objective of the present work was to evaluate the production of cellulolytic and proteolytic enzymes, using solid state fermentation, using the green coconut bagasse as substrate by the fungus *Aspergillus* sp. The characterization of the substrate was carried out, as well as a factorial experimental design 2^2 , in order to analyze the influence of moisture and the addition of nitrogen source (ammonium sulphate). The levels of the independent variables applied were: 60%, 70% and 80% humidity and 0%, 0.5% and 1% (w/v) ammonium sulfate. Considering the result of the design, the CMCase activity was positively influenced by

the lower level of the ammonium sulphate concentration and the higher level of humidity. For FPase activity, the higher levels of both ammonium sulphate concentration and moisture favored the enzymatic production. As for the proteases, the lower levels of both ammonium sulphate concentration and moisture favor the production of these enzymes. Therefore, the concentration of ammonium sulphate and moisture applications on design optimized the enzymatic production process from the green coconut residue.

Keywords: *Aspergillus* sp.; Cellulases; Proteases.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas microbianas é uma importante área na biotecnologia, avanços no processo produtivo tornando-o a cada vez atrativo ao mercado são desejáveis. Os processos industriais para produção de enzimas microbianas a partir dos resíduos agroindustriais apresentam alto interesse, que vão além das vantagens relacionadas ao baixo custo, produção independente e pequena disponibilidade de água e espaço, funcionam com uma aplicabilidade diversa destes resíduos como substratos que minimizam os impactos ambientais promovido pelo descarte inadequado dos mesmos. Nos últimos anos, tem-se aumentado o emprego da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas principalmente relacionadas com a degradação de macromoléculas vegetais complexas (6)

Devido ao consumo em larga escala e a alta popularidade do coco, principalmente no Brasil, o descarte desse material e a geração de resíduos é caracterizado como um problema ambiental (15). Uma alternativa para minimizar esse problema pode ser a utilização desses resíduos como matéria orgânica para ser hidrolisada, em processos fermentativos, pela ação de fungos filamentosos, para produção de enzimas e outros produtos de valor agregado (5)

Alguns micro-organismos são capazes de produzir celulases, pois atuam na degradação de materiais lignocelulósicos presentes em substratos, principalmente os resíduos da agroindústria, como o coco (4). Ao mesmo tempo, esses micro-organismos são preferidos frente a outras fontes produtoras de proteases (vegetal e animal), por serem mais estáveis, devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço de tempo necessário para o seu desenvolvimento e a grande variedade de atividades catalíticas que dispõem no metabolismo (12)

O objetivo do presente trabalho foi analisar a produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus* sp., utilizando como substrato o resíduo de coco verde.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo e caracterização do resíduo da casca do coco verde

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

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

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 amônio). Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados em 2009 por Tavares (16) na produção de celulasas com bagaço de coco lavado com *Aspergillus* sp

O planejamento experimental seguiu os níveis estipulados na Tabela 1 e a matriz do planejamento está apresentada na Tabela 2 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 1. Níveis utilizados no planejamento experimental.

| Variável | -1 | 0 | +1 |
|----------|-----|-----|-----|
| N (%p/v) | 0 | 0,5 | 1 |
| U (%) | 60% | 70% | 80% |

Fonte: Autor

Tabela 2 – Planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central.

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

Fonte: Autor

Micro-organismo e inóculo

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).

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) em água esterilizada em placas contendo o fungo para o arraste dos conídios. Após agitação, os conídios foram transferidos para tubos esterilizados para a realização da contagem. A quantificação da suspensão de conídios foi realizada, com auxílio da câmara de Neubauer espelhada, conforme a Equação 1. O volume de inóculo a ser adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de inóculo de 10⁷ conídios por grama de substrato sólido, calculado de acordo com a Equação 2.

$$C_{Conídios}(\text{conídios/mL}) = \bar{E} \times 25 \times 10^4 \times F_D \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

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

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

F_D – Fator de diluição para contagem na câmara de Neubauer.

$$VI (mL) = \frac{CI\left(\frac{\text{conídios}}{g}\right).m(g)}{C_{\text{conídios}}\left(\frac{\text{conídios}}{mL}\right)} \text{ Eq. (2)}$$

Em que:

VI – volume de inóculo a ser adicionado no cultivo;

C_I – Concentração de conídios para ser inoculada no cultivo;

$C_{\text{conídios}}$ – Concentração de conídios calculada;

m – Massa de substrato utilizada.

Processo fermentativo

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g do substrato. 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 (3):

$$m_A = \frac{m_i(U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \text{ Eq.(3)}$$

Em que:

m_A - massa de água para o ajuste da umidade;

m_i - massa do resíduo

U_2 – Umidade desejada;

U_1 – Umidade inicial do resíduo.

Extração das enzimas

Obtenção do extrato enzimático: A cada 1g de amostra retirada do cultivo foi adicionado 30mL do tampão citrato a 0,05M, pH 4,8. O meio fermentado em suspensão foi colocado em mesa agitadora orbital (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 (14 μ m) para separar o resíduo da

fermentação do caldo contendo o extrato enzimático. A amostra foi armazenada a 4°C para análises posteriores.

Análises do extrato enzimático bruto

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

pH: foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (AKSO - AK 90) previamente calibrado com soluções padrões (pH 4,0 e 7,0).

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 ultrapura (Milli-Q) e 200µL do reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos e a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 595nm. Empregou-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão (3). Cada amostra foi analisada em triplicata.

Determinação da atividade de celulase total (FPase): para determinação da FPase foi utilizada metodologia proposta por (7). Uma unidade da atividade da celulase (U) é definida pela quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto (1).

Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase): para determinação da atividade da endoglucanase (CMCase), fez-se uso do protocolo de (7). Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto (1).

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 extrato enzimático (8).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização do resíduo do coco verde, utilizado como substrato no processo de produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. 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

A concentração de sólidos solúveis (1,6 °brix) do resíduo do coco verde apresentou resultados inferiores que a concentração encontrada na polpa (6,6 °brix) descrita por Kanzawa e Ditchfield (9), resultado esperado, pois, considerando que o coco utilizado no presente trabalho se trata de um resíduo e passou pelo processo de lavagem, portanto, a redução da concentração de açúcares do resíduo foi evidenciada. 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

Ainda, de acordo com a Tabela3, o substrato apresentou um teor de açúcares redutores totais igual a 17,622mg de ART/g de amostra. O resíduo do coco apresentou pH de 4,8, valor que se encontra na faixa de pH ótimo para o crescimento de fungos filamentosos. O pH do resíduo de coco verde foi inferior ao encontrado na polpa de coco, pH de 6,5, apresentado por Kanzawa e Ditchfield (9). 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 da matéria, permitindo um melhor desenvolvimento do micro-organismo.

Planejamento experimental

As amostras coletadas de cada frasco, contendo as diferentes condições, após às 96 horas de fermentação, foram analisadas para atividade enzimática (atividade da CMCase, atividade da FPase e atividade proteolítica).

Atividade da endoglucanase (CMCase)

A Tabela 4 apresenta os resultados experimentais da atividade da endoglucanase (CMCase) 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 4. Resultado experimental em termos de atividade endoglucanásica para o resíduo do coco verde lavado.

| Ensaio | A.E. CMCase (U/g) |
|--------|-------------------|
| 1 | 0,323 |
| 2 | 0,522 |
| 3 | 2,454 |
| 4 | 1,629 |
| 5 | 0,775 |
| 6 | 0,827 |
| 7 | 0,724 |

Fonte: Autor

O diagrama de Pareto Figura 1 mostra que para atividade de CMCCase todas as variáveis são estatisticamente significativas com 95% de confiança. Dessa maneira, a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), a umidade e a interação desses dois fatores influenciaram positivamente na produção da CMCCase. A Tabela 5 apresenta a análise da variância completa.

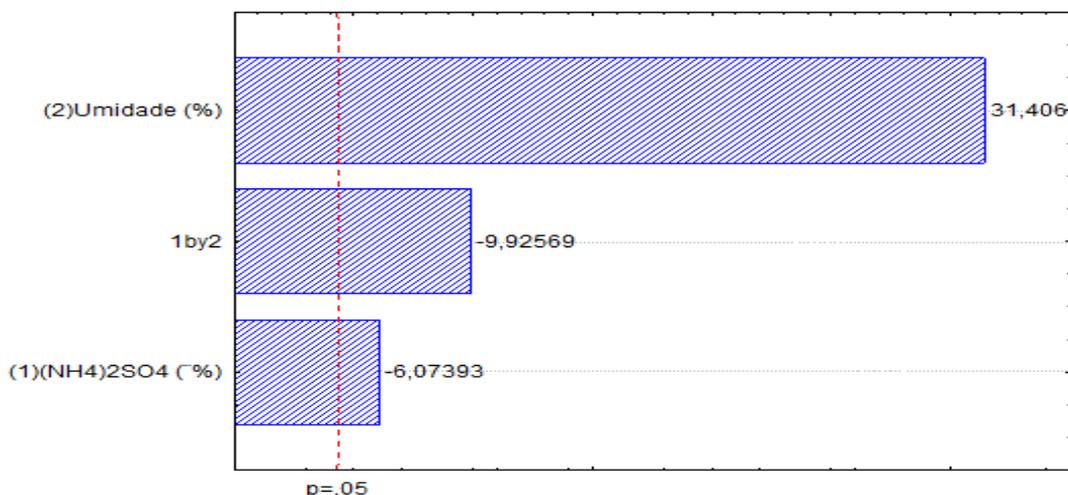


Figura 1. Diagrama de Pareto para atividade da endoglucanase com 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

Tabela 5. Análise de variância para o modelo descrevendo a atividade de CMCCase 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 | | | |

Fonte: Autor

A partir dos resultados obtidos, com auxílio do planejamento fatorial, foi possível ajustar os dados para um modelo que relacione a atividade enzimática como parâmetros estudados. O modelo obtido para a atividade da endoglucanase (CMCase) está apresentado pela Equação 7:

$$\text{CMCase} = 1,0363 - 0,1566N + 0,8096U - 0,2559NU \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que:

CMCase – atividade celulolítica

N – fonte de nitrogênio

U – umidade

Esse modelo explica 78,31% das variações, com $R^2 = 89,15$. 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 (2)

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 (2).

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% (14).

Como observado na Figura 1, a umidade e a fonte de nitrogênio são efeitos de grande importância para o processo. Porém, significa dizer que são nos maiores níveis de umidade, mas nos menores níveis de 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 2). A influência dos fatores também pode ser discutida pela Figura 3.

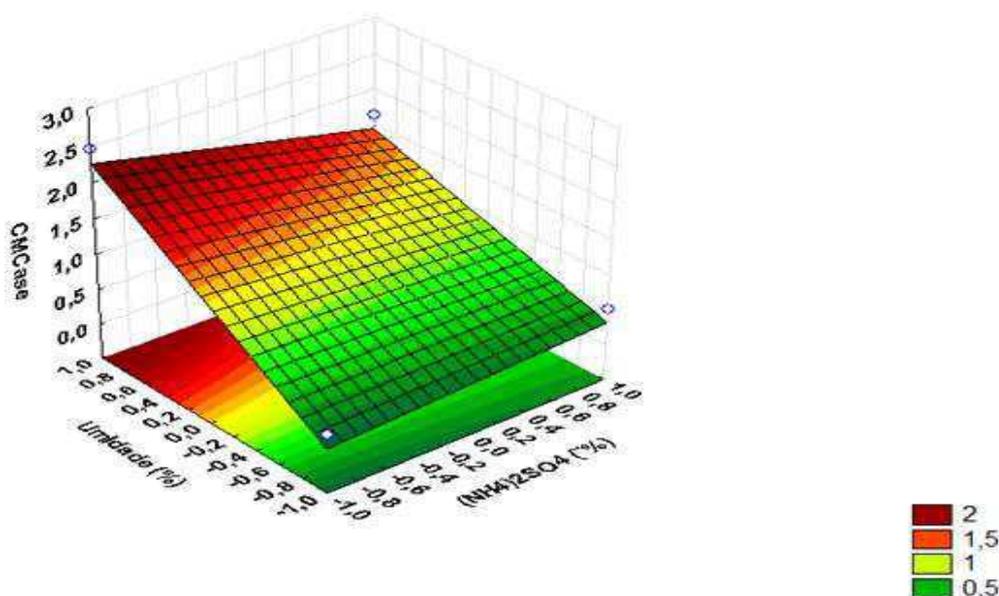


Figura 2. Superfície de resposta da influência da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

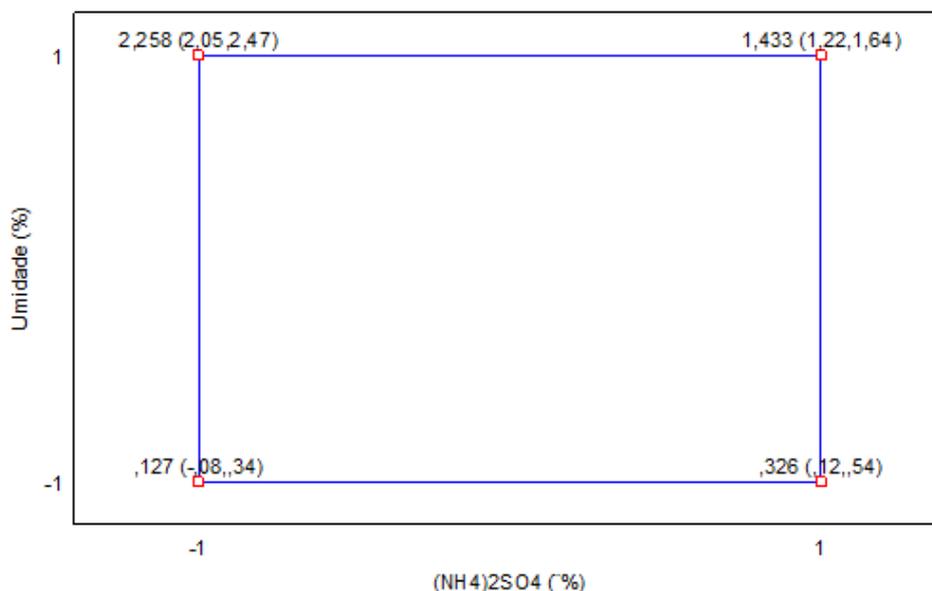


Figura 3. Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da endoglucanase para 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

Este resultado comparado com o de Oliveira Júnior (10), 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%.

Atividade da celulase total (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 5 apresenta os resultados experimentais da atividade da celulase total (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 5. Resultado experimental em termos de atividade FPase 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 |

Fonte: Autor

Com os resultados obtidos durante às 96h de fermentação, a partir do planejamento fatorial, o diagrama de Pareto (Figura 3) mostra que nenhuma das variáveis é estatisticamente significativa, nem com 90% de confiança. Assim, não temos como propor um modelo de regressão.

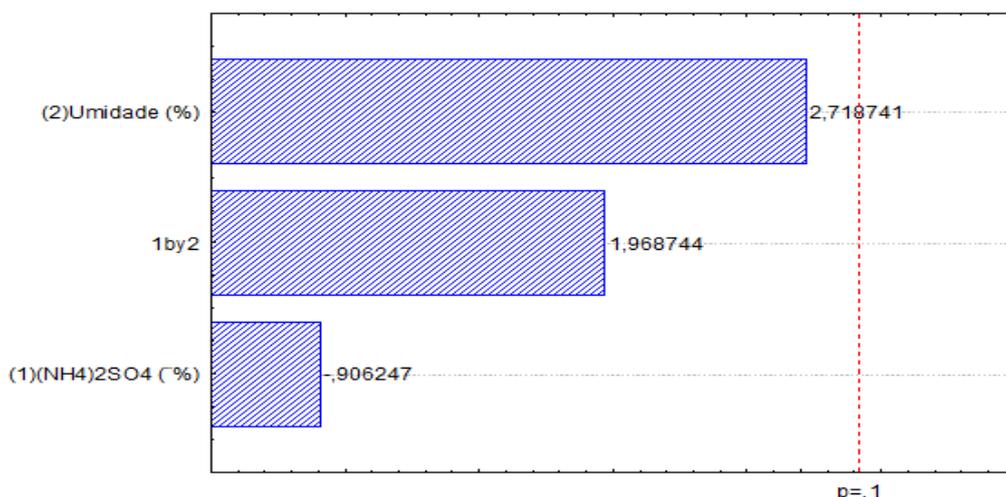


Figura 3. Diagrama de Pareto para atividade da FPase com 96 horas de fermentação.

Fonte: Autor.

No entanto, a curvatura foi checada, sendo dessa forma estatisticamente significativo, 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 4).

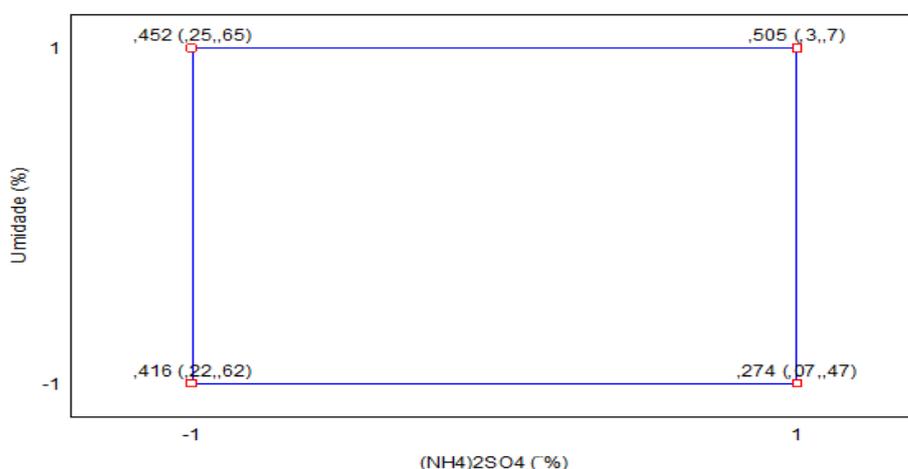


Figura 10. Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade da FPase para 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

Com os resultados obtidos por meio do diagrama apresentado na Figura 10, observa-se qualitativamente que a concentração inicial de umidade e a fonte de

nitrogênio não demonstram importância para o processo. No entanto, a influência prevista das variedades, na figura 10, demonstra que os maiores valores de atividade enzimática podem estar 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.

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.

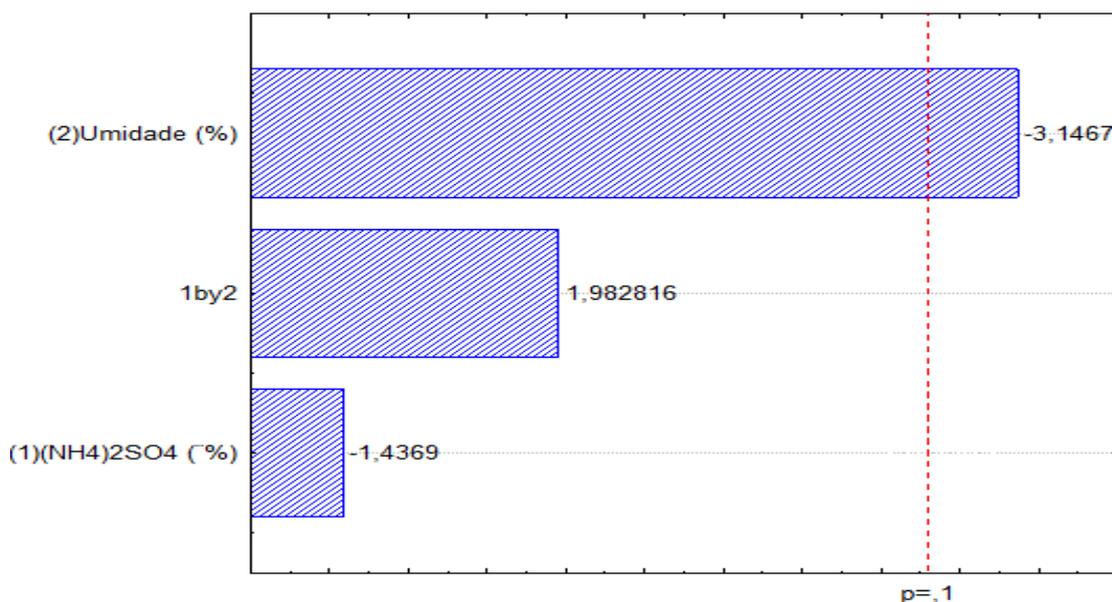


Figura 11. Diagrama de Pareto para atividade proteolítica com 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

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 influencia da umidade (U) e da fonte de nitrogênio a partir do diagrama representado abaixo (Figura 12).

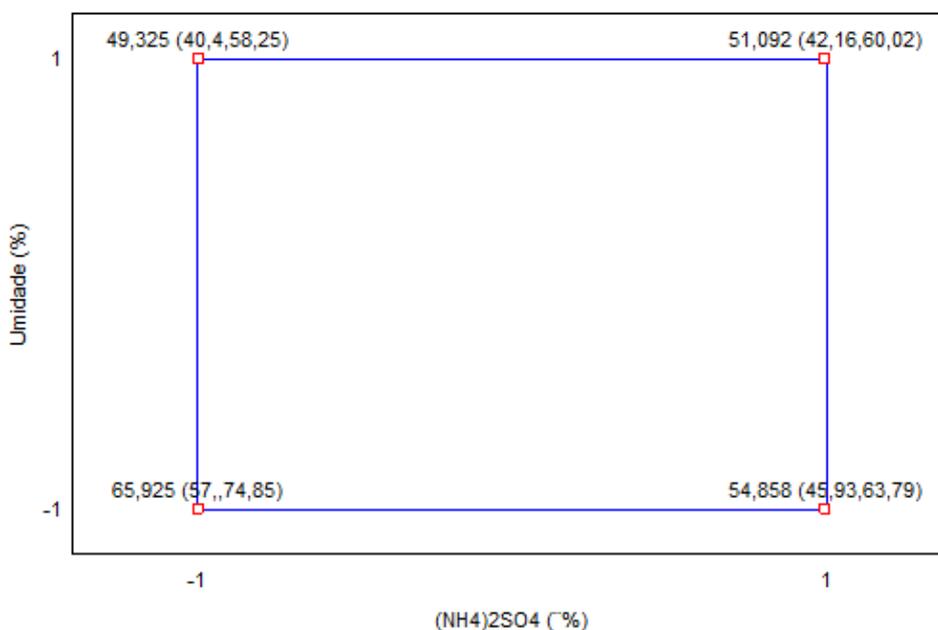


Figura 12. Influência prevista da umidade (U) e da fonte de nitrogênio (N) na atividade proteolítica para 96 horas de fermentação. Fonte: Autor.

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 associadas a valores 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. CONCLUSÃO

A atividade CMCase foi influenciada positivamente pelo menor nível da concentração de sulfato de amônio e pelo maior nível da umidade, atingindo uma atividade de 2,454 U/g de endoglucanases. Para a atividade FPase, os níveis superiores tanto da concentração de sulfato de amônio quanto da umidade favoreceram a produção enzimática, atingindo 0,574 U/g de celulases totais. Já para as proteases, os níveis inferiores tanto da concentração de sulfato de amônio quanto da umidade favoreceram

a produção dessas enzimas. Portanto, a concentração de sulfato de amônio e a umidade propostas no planejamento otimizaram o processo de produção enzimática a partir do resíduo de coco verde.

REFERÊNCIAS

1. Alva S, Anupama J, Salva J, Chiu YY, Vyshali P, Shruti M, Yogeetha BS, Bhavya D, Purvi J, Ruchi K, Kumudini BS, Varalakshmi KN. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6: 576-581.
2. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Planejamento e otimização de experimentos. 4ª Ed. Editora da Unicamp; 1996.
3. Bradford MA. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 248-254.
4. Castro AM. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.). [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2006.
5. Coelho MAZ et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Boletim Ceppa. 2001; 19: 33-42.
6. Couto SR, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochemical Engineering Journal. 2005; 22: 211-219.
7. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 1987; 59: 257-268.
8. Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
9. Kanzawa CY, Ditchfield C. Propriedades físico-químicas e microbiológicas da polpa de coco verde (*Cocos nucifera* L.). Anais. São Paulo: USP, 1 2AD.
10. Oliveira Júnior SD. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal; 2014.
11. Pereira-Filho ER, Poppi RJ, Arruda MAZ. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. Química Nova. 2002; 25: 246-253.
12. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998; 62: 597-635.

13. Rodrigues MI, Lemma AF. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1ª Ed. Editora Casa do Pão; 2005.
14. Rosa MF et al. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa, 2002. 22 p. Documentos 52. Disponível via <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2842.pdf>.
15. Tavares MBR. Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*. [Dissertação]. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande; 2009.