



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ANTÔNIA CÉLIA AMANCIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE EM MESOCARPO DE COCO
VERDE (COCOS NUCIFERA) POR MEIO DE FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA
POR UM FUNGO ISOLADO DE UM PROCESSO DE COMPOSTAGEM**

**SUMÉ - PB
2016**

ANTÔNIA CÉLIA AMANCIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE EM MESOCARPO DE COCO VERDE (COCOS NUCIFERA) POR MEIO DE FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA POR UM FUNGO ISOLADO DE UM PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

**SUMÉ - PB
2016**

A345a Albuquerque, Antônia Célia Amâncio Gonçalves de.
Avaliação da produção de celulares em mesocarpo de coco verde (cocos nucifera) por meio de fermentação semissólida por um fungo isolado de um processo de compostagem. / Antônia Célia Amâncio Gonçalves de Albuquerque. Sumé - PB: [s.n], 2016.

55 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Mesocarpo. 2. Fermentação semissólida. 3. Biotecnologia. 4. Prospecção de fungos. I. Título.

CDU: 60(043.1)

ANTÔNIA CÉLIA AMANCIO GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE EM MESOCARPO DE COCO VERDE (COCOS NUCIFERA) POR MEIO DE FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA POR UM FUNGO ISOLADO DE UM PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

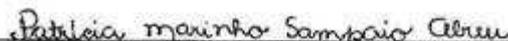
BANCA EXAMINADORA:



Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG



Professora Dra. Lenilde Mérgia Ribeiro Lima.
Examinador I – UAEB/CDSA/UFCG



Professora Ma. Patrícia Marinho Sampaio Abreu.
Examinador II – UAEB/CCT/UFCG

Trabalho aprovado em 18 de maio de 2016.

SUMÉ – PB.

Dedico este trabalho a meus pais Alúzio e Elenice, meu esposo Rodrigo e a meus irmãos e familiares pelo apoio e incentivo e por sempre acreditarem em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

É maravilhoso passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, é muito gratificante dizer obrigada a tantas pessoas que, durante o decorrer desta graduação, simplesmente se mantiveram presentes, junto a meu lado, por isso e muito mais, meus sinceros agradecimentos.

A Deus por todas as bênçãos derramadas sobre minha vida e sobre a vida dos que estão a meu lado, por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa de minha caminhada com saúde e sucesso.

Aos meus pais Aluízio e Elenice por todo o apoio, pelo incentivo nos estudos e pela pessoa que hoje me tornei graças a seus ensinamentos e seu imenso amor, pela enorme compreensão, imensa força, infinita sabedoria e paciência, meus eternos exemplos.

Ao meu esposo Rodrigo por ser minha fonte de estímulo, por todo apoio, meu porto seguro, por me amparar sempre em meio a alguma dificuldade e dando suporte para que eu sempre seguisse em frente, em quem várias vezes recarreguei minhas forças.

Aos meus irmãos Aparecida, Anadi, Cicero, Adenildo, Sueli, Aluízio e Sueleide, pela força, companheirismos e carinho.

Aos meus amigos pela ajuda, pela alegria e pela força, Ozires, Sendy, Janaina, Valdirene, Laisa, Arlene, Carlinha, Anderson, Alan e tantos outros especiais em minha vida.

A minha orientadora Prof^a Glauciane Danusa Coelho, pela orientação, apoio, conduta, confiança e amizade. grande mentora e amiga.

Aos técnicos do laboratório pela ajuda, auxílio e paciência.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, **MUITÍSSIMO OBRIGADA!!!**

RESUMO

A prospecção de fungos produtores de celulase é uma das possíveis estratégias para a obtenção de enzimas necessárias para hidrolisar materiais lignocelulósicos. Sendo assim, tanques de compostagem representam um local potencial para o isolamento de microorganismos com capacidade de produzir enzimas de interesse industrial, tais como as celulases. As celulases são enzimas que se destacam em diversas áreas, desempenhando papéis importantes como a hidrólise do material lignocelulósico para a obtenção de açúcares fermentescíveis destinados à produção de combustíveis de terceira geração. A produção dessa enzima em meio de fermentação semissólida (FSS) vem sendo bastante estudada devido à demanda de maiores produções enzimática e, com isso, a redução dos custos de produção da enzima. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulase (CMCase) por meio da fermentação semissólida do mesocarpo de coco verde por um fungo isolado de um processo de compostagem. O estudo da produção dessas celulases foi realizado por meio do planejamento experimental fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. O mesocarpo do coco verde inoculado com o fungo 302 foi avaliado quanto à produção de celulases com teores de umidade inicial de 45%, 55% e 65% e a variação de temperatura de 30°C, 37°C e 45°C. A fermentação foi realizada por 160 horas, durante as quais foi analisada a capacidade de produção da enzima celulase (CMCase), o efeito da umidade e da temperatura pelo fungo 302 e o crescimento microbiano. O pico de produção enzimática expressa em CMCase (0,54 U.mL⁻¹) ocorreu em 120 horas de fermentação, a 65% e temperatura de 30°C. Quando analisado o crescimento do fungo e a produção enzimática percebe-se que o fungo conseguiu crescer mesmo sem produzir elevados valores de enzima.

PALAVRAS-CHAVE: Mesocarpo, Fermentação semissólida, celulases.

ABSTRACT

The prospect of cellulase producing fungi is one of the possible strategies for achieving necessary enzymes to hydrolyze lignocellulosic materials. Therefore, composting tanks represent a potential site for the isolation of microorganisms capable of producing enzymes of industrial interest, such as cellulases. Cellulases are enzymes that excel in several areas, playing important roles as the hydrolysis of lignocellulosic material to obtain fermentable sugars for the production of third-generation fuels. The production of this enzyme in medium semisolid fermentation (FSS) has been extensively studied due to demand for higher enzyme production and thereby reducing the enzyme production costs. The objective of this study was to evaluate the production of cellulase (CMCase) by semisolid fermentation of green coconut mesocarp by a fungus isolated from a composting process. The study of the production of cellulases was carried out through the factorial design 2² with triplicate at the midpoint. The mesocarp of the coconut inoculated with the fungus 302 was evaluated for the production of cellulases with an initial moisture content of 45%, 55%, 65% and temperature range 30 ° C, 37 ° C and 45 ° C. The fermentation was conducted for 160 hours, during which we analyzed the capacity of the enzyme cellulase (CMCase), the effect of humidity and temperature by the fungus 302 and microbial growth. The peak enzyme production expressed CMCase (0.54 U.mL⁻¹) occurred in 120 hours of fermentation, 65% and 30 ° C. When analyzed the growth of fungus and enzyme production it is noticed that the fungus could grow even without producing high enzyme values.

KEYWORDS: Mesocarp, semisolid fermentation, cellulases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da estrutura da celulose a partir da unidade de D-glicose.....	21
Figura 2 - Monossacarídeos constituintes da hemicelose.....	22
Figura 3 - Estrutura hipotética da lignina	22
Figura 4 - Corte longitudinal do coco e suas partes	25
Figura 5 - Placa de petri com meio BDA contendo o microrganismo 302, após período de incubação a 30°C	31
Figura 6 - FSS em mesocarpo de coco verde utilizando o microrganismo 302	32
Figura 7 - Agitação dos frascos de erlenmeyer em incubadora “shake”	33
Figura 8 – Curva padrão para proteínas construída com a solução reagente biureto e soro albumina bovina 22%	34
Figura 9 - Tubos de ensaio contendo 1 mL de água destilada (branco) e amostras dos ensaios experimentais acrescidos de 4 mL da solução reagente Biureto	34
Figura 10 – Curva padrão para açúcares redutores construída com a solução reagente DNS e glicose diluída em água destilada	35
Figura 11 - Cubeta contendo 0,5 mL das amostras acrescidos de 0,5 ml da solução reagente DNS e 4ml de água destilada.....	36
Figura 12 - Análise qualitativa do crescimento microbiano.....	38
Figura 13 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 30°C e umidade 45%.	39
Figura 14 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 30°C e umidade 65%	40
Figura 15 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 45°C e umidade 45%.	41
Figura 16- Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 45°C e umidade 65%.	42
Figura 17 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 37°C e umidade 55%.	43
Figura 18 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento.....	44
Figura 19 - Diagrama de pareto para a análise da variável dependente atividade enzimática CMCase.	47
Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno em função da umidade e da temperatura para o pico de atividade enzimática CMCase.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis do planejamento experimental	29
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central	29
Tabela 3 - Composição do meio de cultura ágar batata dextrose (BDA)	30
Tabela 4 - Dados referentes aos pontos de maior atividade de CMCase obtidas em cada ensaio.	45
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCase.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Principais aplicações industriais das enzimas microbianas.....	19
Quadro 2 - Avaliação do crescimento do fungo em mesocarpo de coco verde utilizando fermentação semissólida.....	37

ABREVIATURA E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs	Resultado da análise em absorbância
ANOVA	Análise de Variância
AR	Açúcares Redutores
ASTM	American Society for Testing Materials
atm	Atmosfera
BDA	Ágar-Batata-Dextrose
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FSS	Fermentação semissólida
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
UAEB	Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos
UAEQ	Unidade Acadêmica de Engenharia Química
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
rpm	Rotação por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
by	Interação
C	Celsius
F	Valor para a distribuição F
g	Gramas
h	Hora
L	Litro
p	Índice de significância
U_i	Umidade inicial
U	Unidade
°	Graus
R^2	Coefficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 DIVERSIDADE MICROBIANA COMO FONTE DE NOVAS ENZIMAS.....	18
3.1.1 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES	19
3.2 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	20
3.2.1 Celulose	21
3.2.2 Hemicelulose	21
3.2.3 Lignina	22
3.3 COMPOSTAGEM	23
3.3.1 Fases da compostagem	23
3.4 COCO	24
3.5 FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	27
4.2 MATÉRIA PRIMA	27
4.3 PREPARAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE	27
4.4 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE	28
4.5 PRODUÇÃO DAS CELULASES	28
4.5.1 Planejamento experimental	28
4.5.2 Microrganismo e inóculo	30
4.5.3 Repique do fungo	30
4.5.4 Inóculo do fungo	31
4.6 PROCESSO FERMENTATIVO.....	31
4.7 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	32
4.8 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	32
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	34
4.11 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	34
4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO.....	37

5.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)	38
5.3 PROCESSO FERMENTATIVO	38
5.4 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	45
6 CONCLUSÕES.....	49
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela utilização de resíduos agrícolas para obtenção de vários produtos industriais. O Brasil é o maior produtor de frutas tropicais. Na região Nordeste destacam-se os subprodutos de frutas em virtude da ampla disponibilidade frutífera da região (ROGÉRIO, 2005).

O aumento crescente no consumo do coco verde e a vocação natural para a industrialização da água vem aumentando a geração de rejeito (casca de coco), que corresponde a cerca de 85% da massa do fruto, sendo que a degradação deste material leva em torno de oito anos (ROSA et al., 2001). Paralelamente, as indústrias que processam água de coco geram volumes significativos e crescentes do mesmo material, que atualmente é enterrado em lixões e aterros, causando problemas, especialmente em grandes centros urbanos (ROSA, 1998). Uma das alternativas para o mesocarpo de coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas.

As celulasas destacam-se em vários nichos de atuação, tais como alimentícios, detergentes, farmacêutico, têxtil e celulose, no tratamento de efluentes e resíduos, além da produção de bicompostíveis (AMORIM, 2010). Nesse sentido, os custos das celulasas podem ser reduzidos por meio do uso de resíduos como matéria prima, com conseqüente aumento da especificidade enzimática (SINGH et al., 2009; CASTRO et al., 2010; MAEDA et al., 2011). Além disso, a utilização de tecnologias alternativas, neste sentido, a tecnologia de fermentação semissólida (FSS) por meio do uso de resíduos como substrato para a produção enzimática, oferece uma alternativa na redução destes custos (PANDEY, 2002; CHANDRA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e da umidade na produção de celulase (CMCase) por meio da fermentação semissólida em mesocarpo de coco verde, utilizando um fungo isolado de um processo de compostagem.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de celulase (CMCase) em fermentação semissólida por um fungo isolado na fase termofílica de um processo de compostagem, tendo mesocarpo de coco verde como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de produção da enzima CMCase por um fungo isolado no tanque de compostagem, utilizando mesocarpo de coco verde como substrato.
- Avaliar o efeito da temperatura e da umidade, bem como a interação entre estes fatores, na produção de CMCase.
- Analisar qualitativamente o crescimento microbiano.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DIVERSIDADE MICROBIANA COMO FONTE DE NOVAS ENZIMAS

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente, desempenhando funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas como componente fundamental de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Apesar da grande importância dos microrganismos na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (BURKE et al., 2011). O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se os principais focos da era biotecnológica, visto que a utilização destes microrganismos na busca de soluções em áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no cenário mundial atual. O valor do microrganismo é geralmente avaliado pela potencial aplicação direta nos processos biotecnológicos. Vários são os exemplos que atestam a utilização de recursos microbianos pelo homem em diversas atividades de importância socioeconômica: na área industrial, os microrganismos são empregados na produção de compostos comerciais ou para transformar substratos em produtos de maior valor agregado; na agropecuária, destacam-se os microrganismos fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas e vetores; na área de alimentos, as linhagens microbianas são empregadas na produção de bebidas, panificação, queijos, ácidos orgânicos, enzimas. Na área ambiental, as perspectivas de recuperação do meio ambiente utilizando biorremediação são bastante promissoras e dependentes de novos isolados (SCHAECHTER, INGRAHAM e NEIDHARDT, 2010). A exploração dos microrganismos pela indústria gera bilhões de dólares a cada ano (SÁNCHEZ, 2009).

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função da capacidade especializada de degradação (BON et al., 2008; SÁNCHEZ, 2009). O Quadro 1 apresenta algumas das aplicações das enzimas.

Quadro 1- Principais aplicações industriais das enzimas microbianas.

Enzima	Aplicação industrial
Celulases	Aumentar a rehidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores
Celulases	Fabricação de pães, biscoitos e bolos
Celulases, pectinases, xilanases	Promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos
Amilases, proteases e outras glucanases	Aumentar a digestibilidade das rações
Celulases	Amaciamento e desbotamento do brim
Celulases	Melhorar remoção de fibras curtas e ásperas da superfície dos tecidos
Hemicelulases	Hidrólise total das fibras da polpa
Celulases	Remover sujeiras das fibras de algodão

Fonte: BHAT, (2000); CAMASSOLA, (2004); GRAMINHA et al., (2008).

3.1.1 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Enzimas são catalisadores biológicos, são moléculas de proteínas, produzidas por células vivas. Esses biocatalisadores apresentam alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato (SAID e PIETRO, 2004; LINS, 2012).

As celulases são um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar a celulose natural ou modificá-la por pré-tratamentos em carboidratos menores (DAMISA, KUTA e ADABARA, 2013). As celulases são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, na indústria de bebidas, na nutrição animal, na fabricação de detergentes e na indústria de polpa e papel. Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido á sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, os chamados materiais lignocelulósicos (ZANCHETTA, 2013). A

produção de celulases por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com o objetivo de estabelecer melhores condições para a produção dessas enzimas. O processo de produção enzimática, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em meio de cultivo, ou substrato, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma vasta gama de microrganismos tem sido estudada extensivamente de forma a tornar o processo de produção de enzima viável (TAVARES, 2009). Na natureza existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, sendo apenas alguns conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural (SÁNCHEZ, 2009). Dentre esses microrganismos incluem-se bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Rominooccus*) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermofibida*, etc.), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002). Dentre todos os organismos considerados celulolíticos, alguns dos mais utilizados industrialmente são os fungos filamentosos dos gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, e *Penicillium* (ZHANG et al., 2006; SINGHANIA et al., 2010).

3.2 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

As matérias primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza e compõem cerca de 60% de toda a biomassa produzida na terra (TENGERDY, SZAKACS, 2003; JUHÁSZ et al., 2005; SAKUMARAN et al., 2009). A biomassa lignocelulósica tem origem em resíduos vegetais, florestais, animais, resíduos sólidos urbanos e industriais. Os resíduos lignocelulósicos geralmente contêm 30-45% de celulose, 25-30% de lignina, 25-30% de hemicelulose, e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. A proporção percentual desses componentes depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (FUENTES, 2009).

Entre os fungos mais efetivos na biodegradação natural dessas frações lignocelulósicas, estão os fungos de decomposição branca, fungos de decomposição marrom e os fungos de decomposição branda (OKAMOTO, 2011). Os fungos de decomposição branca possuem em comum a capacidade de degradar lignina tão bem como os polissacarídeos da madeira (KIRK, 1998). Os fungos de decomposição marrom atacam extensivamente a

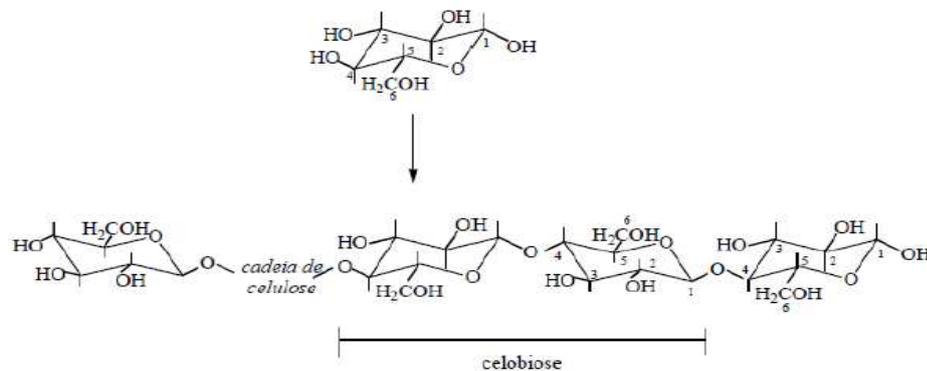
celulose (RAY et al., 2010). Os fungos de decomposição branca atacam principalmente os polissacarídeos da madeira (OKAMOTO et al., 2011).

3.2.1 Celulose

A celulose responde isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. Está presente em todas as plantas e seu conteúdo pode variar de 20 a 99% de acordo com as características de cada espécie (FENGEL e WEGENER, 1989). É o polímero mais abundante na biosfera e o principal constituinte das biomassas (SÁNCHEZ, 2009).

Quimicamente, a celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular, estando firmemente empacotada em cadeias lineares de D-glicose (Figura 1) com ligações β -(1 \rightarrow 4).

Figura 1 - Ilustração da estrutura da celulose a partir da unidade de D-glicose.



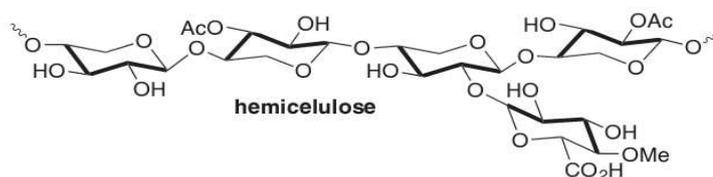
Fonte: ZHANG; LYND, (2006).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um grupo diversificado de polímeros que engloba uma série de carboidratos com uma estrutura química similar a da celulose, mas sendo constituído principalmente de xilana, presente na parede celular e nas lamelas de células vegetais (COLLINS, GERDAY e FELLER, 2005). Por serem intimamente associadas com a lignina e

a celulose, as hemiceluloses têm sua conformação estrutural alterada de acordo com o local em que são encontradas (BOCCHINI et al., 2005). A hemicelulose chega a representar 40% da massa seca de resíduos lignocelulósicos e a degradação deste polímero é realizada por enzimas hemicelulases como, por exemplo, a xilanase (SUN et al., 2004; POLIZELI et al., 2005; GOTTSCHALK et al., 2010). A Figura 2 ilustra os monossacarídeos constituintes da hemicelulose.

Figura 2 - Monossacarídeos constituintes da hemicelulose.

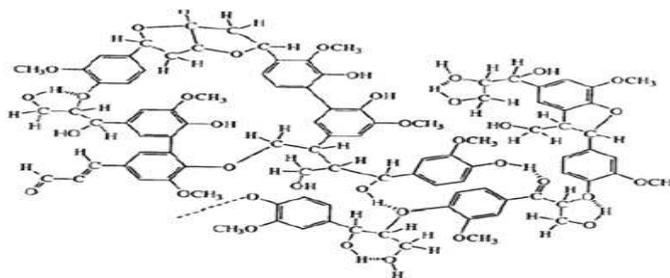


Fonte: FERREIRA et al.(2009).

3.2.3 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, podendo representar até 40% da massa seca. Representa um conjunto de polímeros amorfos de alta massa molecular e de muitas ligações cruzadas características de polímeros termorrígidos (SUN et al., 2011). A Figura 3 ilustra a estrutura hipotética da lignina.

Figura 3 - Estrutura hipotética da lignina.



Fonte: ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, (1990).

3.3 COMPOSTAGEM

Compostagem é um processo controlado de decomposição microbiana, de oxidação de uma massa heterogênea de matéria orgânica. Nesse processo ocorre uma aceleração da decomposição aeróbica dos resíduos orgânicos por populações microbianas, pois utilizam essa matéria orgânica para nutrição. O produto final da compostagem é chamado de composto. (KIEHL, 1985).

3.3.1 Fases da compostagem

As fases da compostagem também podem ser identificadas de acordo com a variação da temperatura, conforme descrito a seguir (BERNAL et al., 1998; TRAUTMANN e OLYNCIW, 2005):

- Fase 1 - Mesofílica: A microbiota mesofílica cresce aceleradamente, assimilando, preferencialmente, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de acesso mais fácil, gerando calor por reações metabólicas exotérmicas e elevando a temperatura para aproximadamente 40 °C.
- Fase 2 - Termofílica: Fase que inibe o crescimento dos mesófilos e estimula a germinação dos esporos dos fungos e endosporos das bactérias termófilas, iniciando a segunda fase do processo. Tem duração média de dois a cinco dias. A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve aspectos cruciais, como ajustamento da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA a temperaturas acima da faixa mesofílica.
- Fase 3 - Resfriamento: É marcada pela queda da temperatura para valores da temperatura ambiente.
- Fase 4 - Maturação: É o período de estabilização que produz um composto maturado, altamente estabilizado e umificado, livre de toxicidade.

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (LASA et al., 1993). Dentre todos esses fatores, a temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. De fato, a maioria dos organismos atualmente conhecida pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem

permitido a seleção ou a persistência de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver (GOMES, 2007). Organismos termófilos moderados incluem organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20 °C e um máximo de 55 °C. O fungo empregado neste trabalho foi isolado numa temperatura de 43°C ± 2 (NUNES et al., 2014).

Enzimas termoestáveis são produzidas por microrganismos termofílicos e mesofílicos. Apesar dos microrganismos termofílicos serem potenciais fontes de enzimas termoestáveis, as maiores destas enzimas utilizadas pelas indústrias são originárias de organismos mesófilos (ENDO et al., 2001; BISCHOFF et al., 2006; VIKARI et al., 2007; NUNES, 2010).

A demanda por enzimas termoestáveis com aplicações industriais vem crescendo muito. Celulases termoestáveis possuem diversas aplicações industriais, tais como indústrias de alimentos e açúcar, utilizando processos de altas temperaturas, como a pasteurização. Outras aplicações incluem indústrias de biocombustíveis, papel, tratamento de resíduos domésticos e agroindustriais (JANG e CHENG, 2003).

3.4 COCO

O coqueiro é uma das principais oleaginosas do mundo. No Brasil, o cultivo do coqueiro representa significativa importância social e econômica, visto que 75% das propriedades produtoras possuem área inferior a 10 hectares. Embora a produção no Brasil ocupe mais de um milhão de toneladas, o rendimento da cultura é dos mais baixos, contribuindo com apenas 2% da oferta mundial. Estima-se uma área plantada de 1.600 hectares, distribuída por mais de 86 países (PERSLEY, 1992). O coqueiro é abundante no Brasil, principalmente na região Nordeste (FAO, 2012; IBGE, 2012).

O coco, fruto formado a partir de uma semente chamada drupa, é constituído basicamente por um epicarpo, camada externa fina e lisa que forma a casca; mesocarpo, camada intermediária fibrosa; endocarpo, camada lenhosa e dura e a castanha chamada de albúmen sólido, que é a parte do fruto de maior valor comercial, além da água de coco (Figura 4). O fruto chega a alcançar o peso médio de 3 a 4 Kg e a quantidade de água diminui à medida que o coco amadurece (PORTAL SÃO FRANCISCO, 2005).

Figura 4 - Corte longitudinal do coco e suas partes.



Fonte: FERRAZ, (2011).

O Brasil é o único lugar do mundo em que o coco é utilizado como fruta, empregado na produção de balas, doces e sorvetes, além de ser bastante empregado na culinária nordestina, enquanto que nos demais países produtores, o coco é utilizado para extração do óleo. No Brasil, os produtos mais nobres do coco são o coco ralado e o leite-de-coco, e mais recentemente a água vem ocupando lugar de destaque dentre os produtos derivados do coco. A partir de meados dos anos 2000 tem-se notado um aumento da exploração do coco voltado para atender o mercado de água. Essa tendência tem deslocado a produção do fruto para áreas não tradicionais, a exemplo dos perímetros irrigados do Nordeste (SIQUEIRA et al, 2002).

A casca do coco verde é um subproduto do consumo e da industrialização da água do coco e tem se tornado um problema ambiental nos grandes centros urbanos por ser um material de difícil decomposição, levando mais de oito anos para se decompor, ocasionando a deposição desse subproduto nos lixões ou as margens de estradas, praias, lotes vagos (SEBRAE NACIONAL, 2016).

3.5 FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

As denominações “fermentação em estado sólido”, “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio sólido” ou simplesmente “fermentação semissólida”, consistem em um único processo, que é definido como o processo no qual o microrganismo cresce sobre partículas da matriz sólida (substrato ou material inerte). O conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) está a um nível de água que assegura o crescimento e o metabolismo das

células e não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PANDEY et al., 2000). Ainda segundo Rahardjo et al., (2006), a fermentação em estado sólido é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre.

Atualmente, aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos industriais são realizados por processos de fermentação submersa e, na maioria das vezes, com microrganismos geneticamente modificados (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010; SINGHANIA et al., 2010). Contudo, a fermentação em estado semissólido ainda é vantajosa pois, além de simular o habitat natural de microrganismos fúngicos selvagens (HÖLKER et al., 2004), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor suscetibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (SINGHANIA et al., 2010), sendo que parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade, atividade de água e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação (SINGHANIA et al., 2010). O nível de umidade varia de acordo com o ecossistema formado entre o microrganismo e o substrato. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, a ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (HOLKER et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEBB) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), câmpus CDSA, em Sumé – Paraíba.

4.2 MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada neste trabalho foi o mesocarpo do coco verde, que foi cedido por revendedores do fruto da cidade de Sumé, Paraíba.

4.3 PREPARAÇÃO DO MESOCARPO DO COCO VERDE

Neste experimento foram utilizados resíduos de sete cocos verdes. Para aumentar a capacidade de retenção de umidade e nutrientes deve-se diminuir o tamanho das fibras então, os resíduos foram triturados em uma máquina desintegradora/trituradora de forragem, equipamento disponível na Escola Agrícola de Sumé. Em seguida, foi feita uma limpeza nos resíduos com intuito de retirar possíveis impurezas que estivessem depositadas junto à forrageira e que tivessem se misturado ao mesocarpo, submeteu-se o mesocarpo a um processo de lavagem até que não se verificasse mais a presença de açúcares redutores, os quais poderiam reprimir a síntese enzimática, pois açúcares como, por exemplo, a glicose, que apesar de, em geral, ser excelente fonte para o crescimento celular é reportada como repressora, quando em grande quantidade, para a produção de diversas enzimas, sendo uma delas a celulase (BON et al., 2008).

O resíduo foi seco em estufa de secagem, com circulação de ar forçada a 50°C por 24h, sendo posteriormente armazenado em sacos hermeticamente fechados.

4.4 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

A umidade foi determinada para presumir possíveis causas de baixo ou alto rendimento no enriquecimento proteico do substrato e por ser necessária ao cálculo da quantidade de água destilada a ser adicionada na montagem do processo fermentativo. O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influênciam a fermentação em estado semissólida (LINS, 2012).

Em balança analítica foram medidas por gravimetria cinco gramas de mesocarpo de coco e colocados em termo balança SHIMADZU (modelo MOC63U) por quinze minutos a 105°C para determinação da massa seca. Os testes foram realizados em duplicata. Com a determinação da massa seca, foi possível realizar a determinação da umidade dos resíduos pela subtração da massa seca pela massa total.

Para ajuste da umidade foi utilizada a equação:

$$V_{aa} = M_{aa} = m_i * \frac{v_2 - v_1}{1 - v_2}$$

Sendo:

$V_{aa} = M_{aa}$ = volume de água a ser adicionado ao meio;

m_i = quantidade de substrato utilizado;

v_2 = umidade desejada;

v_1 = umidade encontrada.

4.5 PRODUÇÃO DAS CELULASES

4.5.1 Planejamento experimental

A produção de celulases foi avaliada por meio de fermentação semissólida utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 totalizando quatro ensaios, com triplicata no ponto central, totalizando sete ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória, para avaliar o efeito da umidade inicial do meio (U_i) e da temperatura de incubação na produção enzimática.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Níveis do planejamento experimental.

Variáveis	-1	0	1
U (%)	45,00	55,00	65,00
T(°C)	30,00	37,00	45,00

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central.

Ensaio	U (%)	T(°C)
1	(-1) 45	(-1) 30
2	(+1) 65	(-1) 30
3	(-1) 45	(+1) 45
4	(+1) 65	(+1) 45
5	(0) 55	(0) 37
6	(0) 55	(0) 37
7	(0) 55	(0) 37

Fonte: Dados da Pesquisa.

4.5.2 Microrganismo e inóculo

Neste trabalho foi utilizado o fungo denominado 302 (fungo 02, obtido da coleta 03), este microrganismo foi isolado durante o projeto realizado anteriormente no laboratório de Microbiologia intitulado “A compostagem como fonte de microrganismo produtores de enzimas de interesse industrial”(NUNES et al. 2014). No referido trabalho, foram obtidos 37 (trinta e sete) isolados fúngicos, sendo 6 (seis), isolados durante a fase termofílica do processo de compostagem, denominada coleta 03.

4.5.3 Repique do fungo

A partir do tubo tipo *eppendorf* contendo o fungo em água destilada foi realizado o primeiro repique. Para tal, com um palito de madeira foi retirada uma concentração da suspensão de esporos do *eppendorf* e transferida para placas de Petri contendo meio de cultura agar-batata-dextrose (BDA) e incubadas á temperatura de 30°C por um período de 10 dias.

Para a preparação do meio BDA as batatas foram cotadas em pequenos pedaços e fervidos em água destilada durante 10 minutos, contados a partir do início da ebulição. Posteriormente o material foi coado e acrescido de dextrose (na preparação deste meio a dextrose foi substituída pela glicose) e Ágar. O volume final foi ajustado para 1L e esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200 g
Glicose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1 L

Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 5 - Placa de Petri com meio BDA contendo o microrganismo 302, após período de incubação a 30°C.



Fonte: Dados da Pesquisa.

4.5.4 Inoculo do fungo

Os esporos do meio BDA foram suspensos em água destilada esterilizada e filtrados em funil com gaze e algodão, previamente esterilizados. A quantificação da suspensão de esporos foi obtida em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de 1 (um) mL da suspensão de esporos na concentração 10^8 esporos /mL foi utilizado como inóculo.

4.6 PROCESSO FERMENTATIVO

Em frascos de erlenmeyer de 250 ml, 30 g de mesocarpo do coco acrescidos com água destilada para obtenção da umidade inicial, foram autoclavados á pressão de 1 atm e temperatura de 121°C durante 1 hora.

Após o substrato, foi inoculado com suspensão de esporos do fungo 2 (dois) da coleta 3 (três) da coleção dos fungos do tanque de compostagem. Os frascos de erlenmeyer foram incubados nas temperaturas indicadas no planejamento fatorial e o cultivo foi interrompido nos tempos de 72, 96, 120, 140 e 160 horas.

Figura 6 - FSS em mesocarpo de coco verde utilizando o microrganismo 302.



Fonte: Dados da Pesquisa.

4.7 ANÁLISE QUALITATIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

A análise qualitativa do crescimento microbiano foi feita a partir da observação visual dos frascos e o crescimento microbiano no mesocarpo de coco verde foi determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), STANDARD METHODS G21-90 (1990), que apresenta as seguintes faixas de crescimento:

- (-) Ausência de crescimento;
- (+) Pouco crescimento, com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;
- (++) Moderado crescimento com surgimento de pellet fino na superfície do meio;
- (+++) Ótimo crescimento da metade a todo o frasco.

4.8 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Moreira Neto (2006): Em cada erlenmeyer foram adicionados 60 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, o material foi homogeneizado manualmente durante 5 minutos, seguido de agitação em velocidade de 120 rpm, por 1 hora, em incubadora sob agitação orbital (modelo SL183/DT SOLAB) a 22°C. A amostra foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o

extrato enzimático foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de carboximetilcelulase, determinação de proteínas totais e aferição do pH.

Figura 7 - Agitação dos frascos de erlenmeyer em incubadora *shaker*.



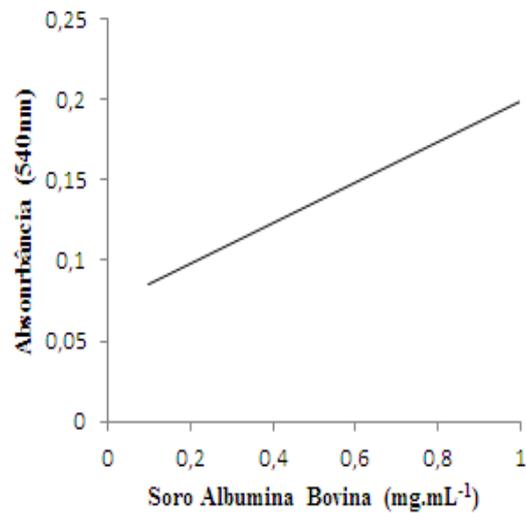
Fonte: Dados da Pesquisa.

4.9 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas utilizou 4 mL da solução reagente Biureto (0,15 % sulfato de cobre; 0,6 % tartarato de sódio e potássio; 3 % hidróxido de sódio; 0,1 % iodeto de potássio) e 1 mL da amostra, diluída de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. As leituras foram realizadas por espectrofotômetro em 540 nm e a curva padrão foi construída com soro albumina bovina líquida 22%. O espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo: 4 mL da solução reagente Biureto e 1 mL de água destilada (GORNALL, BARDAWILL e DAVID, 1949).

A curva padrão para a determinação das proteínas (Figura 8) foi construída com o intervalo de diluição do soro albumina bovina de 2 mg.mL^{-1} com limites inferior e superior de 0 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1} , respectivamente. O método utilizando a solução reagente Biureto mostrou-se mais confiável entre os limites de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e 1 mg.mL^{-1} com $R^2 = 0,9854$, pois Harland (1989) afirma que valores de R^2 próximos de 1 representam modelos melhores para predições.

Figura 8 – Curva padrão para proteínas construída com a solução reagente Biureto e soro albumina bovina 22%.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9 – Tubos de ensaio contendo 1 mL de água destilada (branco) e amostras dos ensaios experimentais acrescidos de 4 mL da solução reagente Biureto.



Fonte: Dados da Pesquisa.

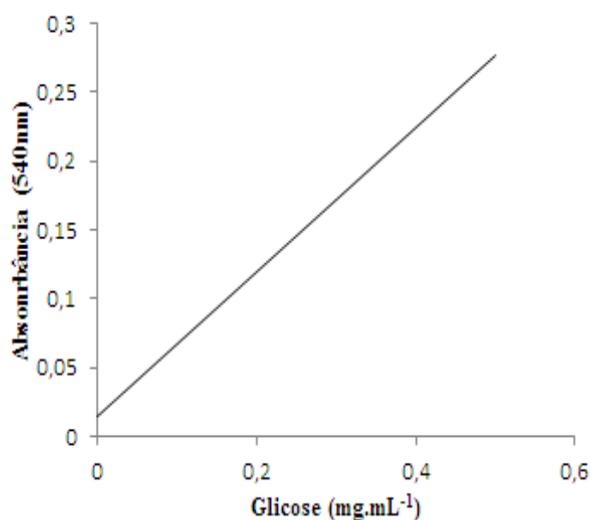
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade celulolítica analisada neste trabalho foi de carboximetilcelulases (CMCase) ou endoglicanases, que foi determinada por meio da incubação de 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose (2%) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0, a uma temperatura de 50°C. Em intervalos de

tempo apropriados, a reação foi interrompida com 0,5 mL de DNS (1 % 3,5-dinitrossalicílico; 1,6 % hidróxido de sódio; 30 % tartarato de sódio e potássio). O meio de reação foi fervido por 5 min e diluído com 4 mL de água destilada. Em seguida foi realizada a determinação de açúcares redutores em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

As amostras foram diluídas com água destilada de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração e os testes foram feitos em duplicata. A curva padrão para a determinação dos açúcares redutores (Figura 10) foi construída com o intervalo de diluição da glicose de 0,2 mg.mL⁻¹ com limites inferior e superior de 0 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹, respectivamente. O método utilizando a solução reagente DNS mostrou-se confiável entre os limites de 0 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹ com $R^2 = 0,9713$, visto que Harland (1989) afirma que valores de R^2 próximos de 1 representam modelos melhores para predições.

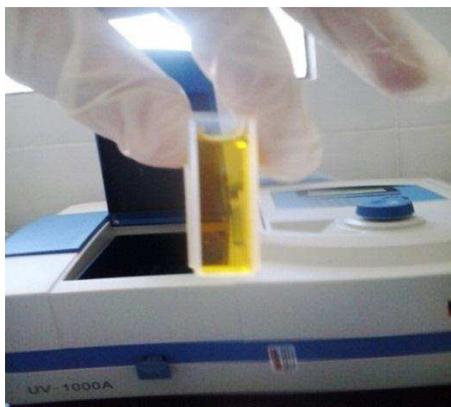
Figura 10 – Curva padrão para açúcares redutores construída com a solução reagente DNS e glicose diluída em água destilada.



Fonte: Dados da pesquisa.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose, por minuto, a 50°C.

Figura 11 - Cubeta contendo 0,5 mL das amostras acrescidos de 0,5 mL da solução reagente DNS e 4 mL de água destilada.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.11 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

O pH foi mensurado por ser um importante fator inerente ao meio de cultura que pode estimular ou inibir o crescimento do microrganismo e por ser utilizado para avaliar o desenvolvimento do processo fermentativo (SCHMIDELL et al., 2001).

Os extratos enzimáticos obtidos tiveram o pH aferido usando pHmetro digital Instruterm (pH 2600).

4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

O processo fermentativo foi realizado avaliando a influência de dois fatores (umidade e temperatura) na produção de enzimas CMCases. Para tal foi adotada a metodologia de planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central. Os valores definidos para os níveis mínimos e máximos, bem como os pontos centrais referentes a cada variável estão descritos na seção 4.5.1. Utilizando o programa computacional Statistica TM (Versão 8.0, da Statsoft, Inc.) estimou-se os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como dados relativos à Análise de Variância (ANOVA), usando as atividades de cada ensaio. A metodologia de superfície de resposta foi usada para fornecer dados mais adequados para o processo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO

O Quadro 2 mostra a avaliação qualitativa do crescimento do fungo no mesocarpo do coco verde utilizando fermentação semissólida.

Quadro 2 - Avaliação do crescimento do fungo em mesocarpo de coco verde utilizando fermentação semissólida.

Tempo(h)	Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	Ensaio 04	Ensaio 05	Ensaio 06	Ensaio 07
72	++	++	+	+	+++	+++	+++
96	++	++	+	+	+++	+++	+++
120	++	++	+	+	+++	+++	+++
140	++	++	+	+	+++	+++	+++
160	++	++	+	+	+++	+++	+++

Fonte: Dados da Pesquisa.

O crescimento microbiano no mesocarpo do coco verde foi determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), STANDARD METHODS G21-90 (1990):

Nos ensaios 03 e 04, utilizou-se a temperatura de 45°C e umidade de 45% (ensaio 03) e 65% (ensaio 04). Observou-se pouco crescimento, com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio, indicando que a elevação da temperatura pode ter influenciado na inibição do desenvolvimento do fungo 302. Nos ensaios 01 e 02, nos quais foram utilizadas temperatura de 30°C e umidades de 45% (ensaio 01) e 65% (ensaio 02), observa-se moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio, indicando que a temperatura foi propícia para o desenvolvimento do fungo 302 e os teores de umidade se mostraram satisfatórios para o crescimento do microrganismo. No ponto central, se utilizou a temperatura de 37°C e umidade de 55%, observando-se um ótimo crescimento da metade a todo o frasco, indicando que as variáveis temperatura e umidade influenciaram positivamente para o desenvolvimento do fungo.

Apesar do fungo empregado neste trabalho ter sido isolado numa temperatura de $43^{\circ}\text{C} \pm 2$ (NUNES et al., 2014), esperava-se obter maior crescimento à temperatura de 45°C , no entanto isso não foi observado. O fungo 302 se desenvolveu mais nas temperaturas de 30°C e 37°C , evidenciando que este é um fungo termofílico moderado, pois segundo Gomes (2007), organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20°C e um máximo de 55°C , são classificados em termófilos moderados.

Pela análise do crescimento do microrganismo, independentemente das variações de temperatura e de umidade, o microrganismo foi capaz de se desenvolver no meio.

Figura 12 - Análise qualitativa do crescimento microbiano.



Fonte: Dados da pesquisa.

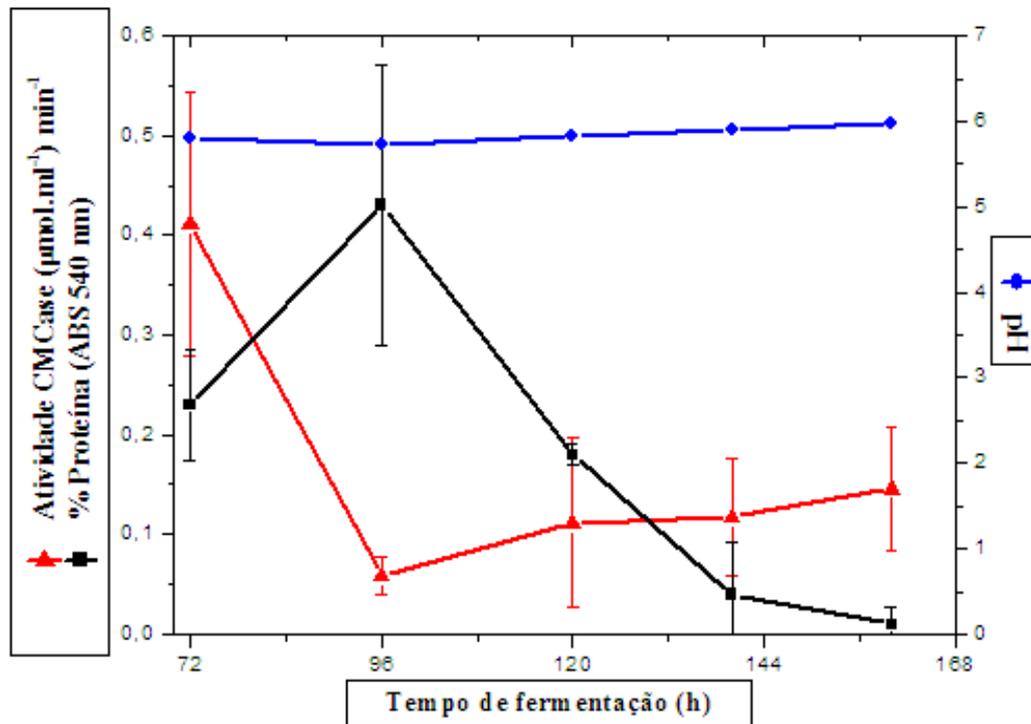
5.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Durante a fermentação o pH do meio variou entre 5,7 e 5,9 (Figuras 13, 14, 15, 16, 17). Segundo Ferreira (2010), os valores ótimos de pH para produção de celulases é na faixa ácida, enquanto que bactérias, chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (SINGH, BATRA e SOBTI, 2001).

5.3 PROCESSO FERMENTATIVO

Os resultados dos parâmetros estudados estão detalhados nas Figuras (13, 14, 15, 16, 17), pode-se visualizar o perfil do processo de produção de CMCCase em FSS, usando o mesocarpo de coco verde.

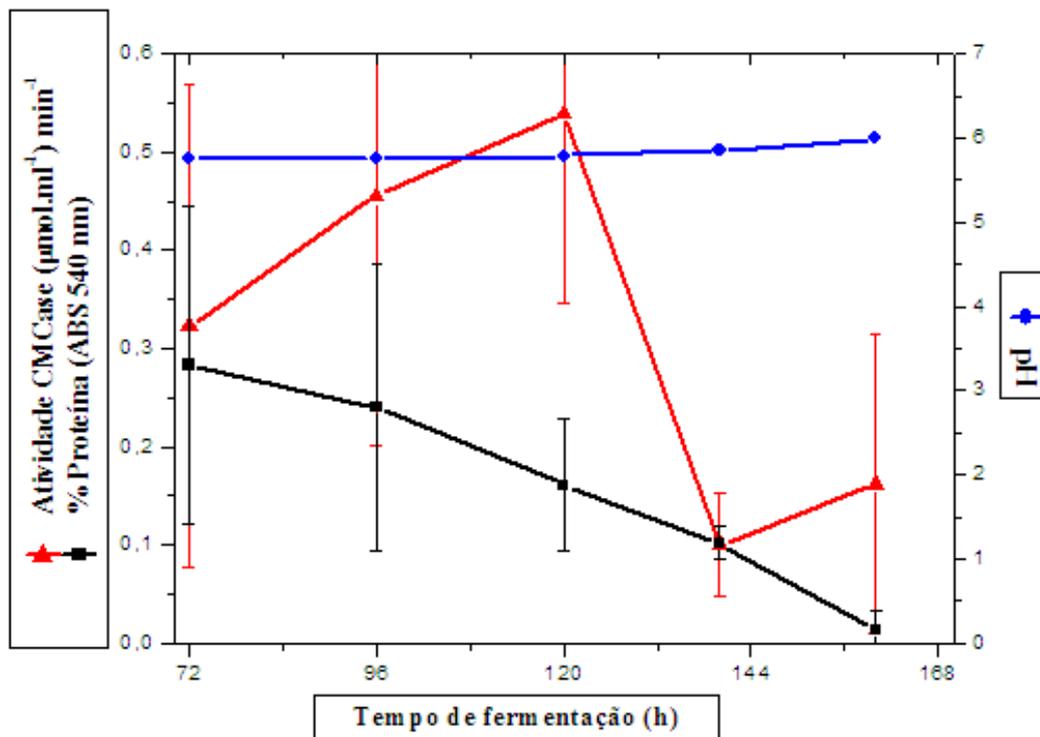
Figura 13 - Perfil do processo de produção de CMCCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 30°C e umidade 45%.



No ensaio 01, para uma umidade de 45% e temperatura de 30°C, observa-se a ocorrência de um pico de atividade enzimática com 72 h de cultivo, quando ocorreu a maior atividade de CMCCase, atingindo ($0,41 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nota-se que após esse período houve queda da concentração enzimática, seguida por uma tendência de aumento na concentração da enzima a partir de 120 h de fermentação, com atividade enzimática de ($0,11 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Comportamento semelhante foi encontrado por Amorim (2010), que verificou pico de produção seguido de processo de queda da produção da enzima. A autora sugere que essa diminuição da atividade pode ser atribuída ao efeito cumulativo de oligossacarídeos especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglicanases como β -glicosidases. A maior concentração de proteínas neste ensaio ocorreu com 96 h de fermentação com (0,43%) de proteínas, quando foi observada a menor atividade de CMCCase ($0,058 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), presente no meio fermentativo.

Ao analisar o crescimento do fungo 302 e a concentração enzimática percebeu-se que o fungo não precisou produzir grandes quantidades de enzimas no meio para crescer, isso pode ser atribuído aos compostos liberados e presentes no meio após a quebra da estrutura do mesocarpo.

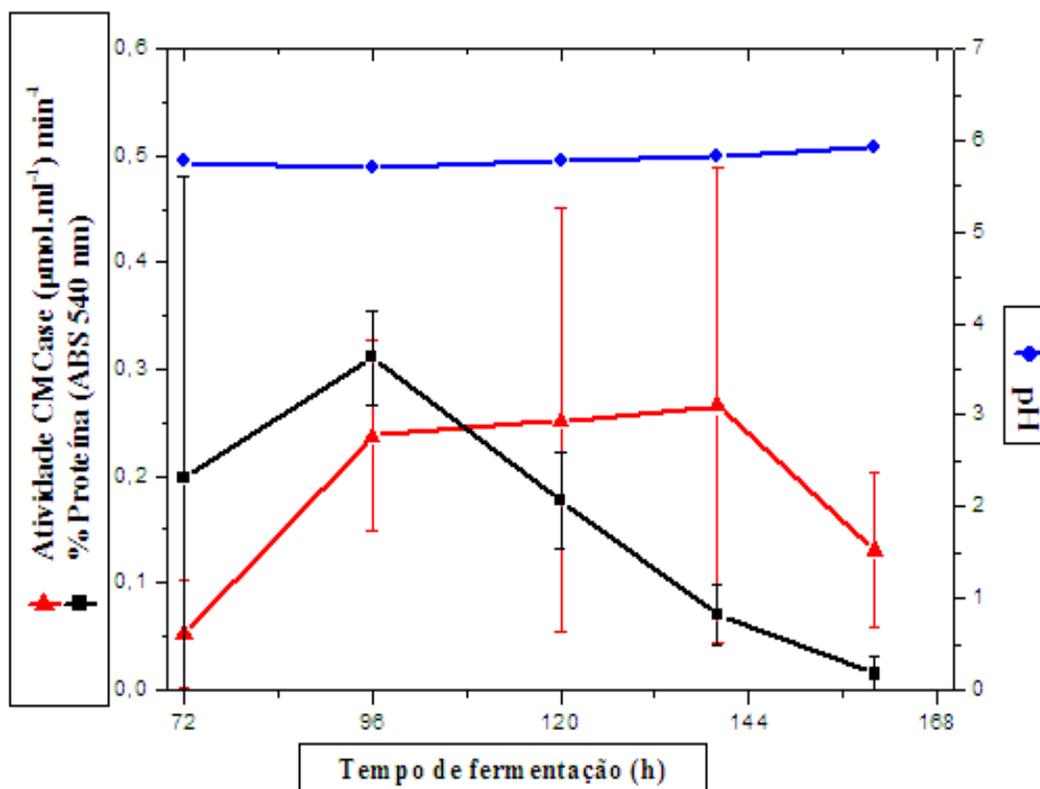
Figura 14 - Perfil do processo de produção de CMCCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 30°C e umidade 65%.



No ensaio 02, para uma umidade de 65% e temperatura de 30°C observa-se um pico de atividade enzimática de CMCCase de ($0,54\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtido com 120 h, a máxima atividade verificada para esse ensaio. Assim como no ensaio 01, houve o pico de atividade seguido de queda na produção da enzima e novamente um aumento na atividade enzimática, sugerindo que os compostos presentes no meio inibiram por um determinado período de tempo a atividade enzimática. Neste ensaio o aumento da umidade resultou em aumento da atividade de CMCCase. Para esse ensaio a maior concentração de proteínas no meio foi observada com 72 h de fermentação com (0,28%) e após esse período observa-se que à medida que o tempo de fermentação aumenta a quantidade de proteínas no meio diminui. A baixa concentração de proteínas pode ter sido ocasionada pela ação do crescimento fúngico, pois muitos microrganismos podem converter proteínas em aminoácidos pela ação de proteases, enzimas que quebram as ligações peptídicas, transformando as proteínas em aminoácidos ou peptídeos (LEE; LEE, 2002; NETO, 2014) e o método que utiliza a solução reagente Biureto não detecta aminoácidos ou peptídeos, apenas proteínas (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

O crescimento do fungo foi semelhante ao observado no ensaio 01, o microrganismo cresceu sem produzir quantidades elevadas de enzima.

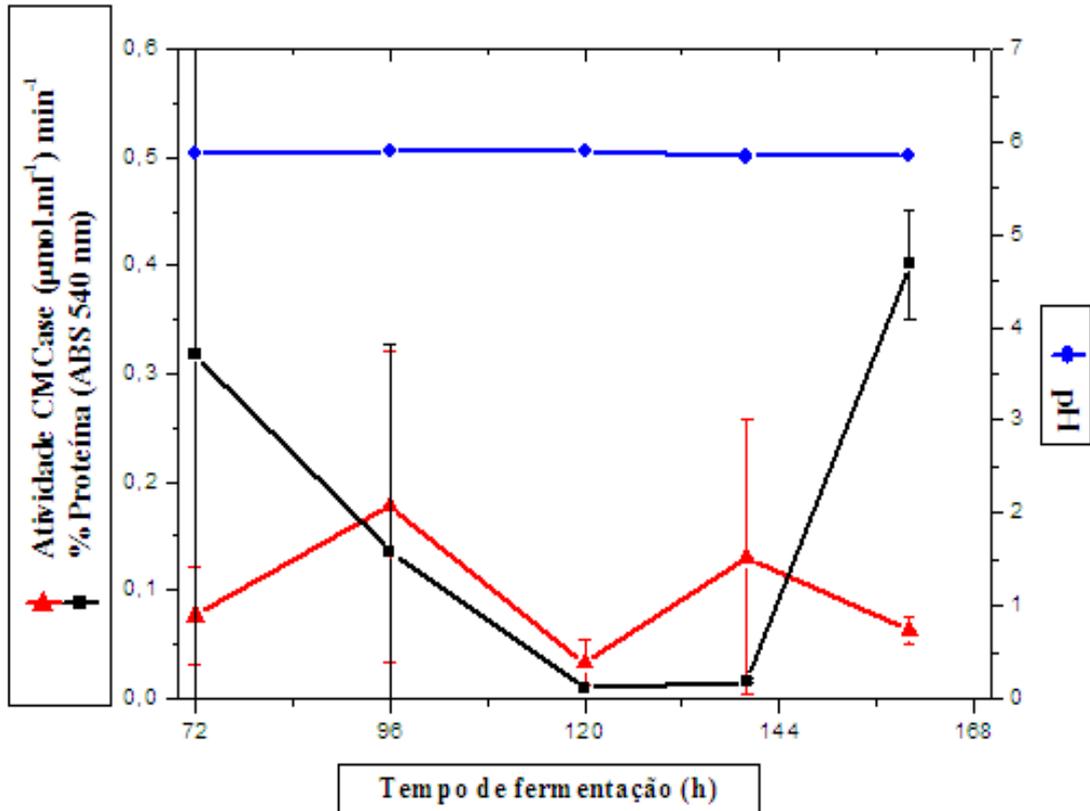
Figura 15 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 45°C e umidade 45%.



No ensaio 03, observa-se que para uma umidade de 45% e temperatura de 45°C, a maior atividade enzimática ocorreu em 140 h, com atividade de (0,26 U.mL⁻¹), o aumento da temperatura neste ensaio pode ter contribuído para a diminuição da atividade de CMCase. Após atingir esse valor de atividade enzimática, percebe-se a diminuição na concentração da enzima. A máxima concentração de proteínas observada neste ensaio foi de (0,31%) a 96 h de fermentação.

Ao analisar o crescimento do fungo nessa faixa de temperatura, observou-se que o microrganismo teve um menor crescimento, predizendo que a inibição de seu crescimento se deu devido a sua adaptação nessa faixa de temperatura, pois a adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve aspectos cruciais necessários para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas (GOMES, 2007) e que o fungo conseguiu crescer em temperatura de 45°C sem precisar produzir grandes quantidades de enzimas para sobreviver.

Figura 16 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 45°C e umidade 65%.

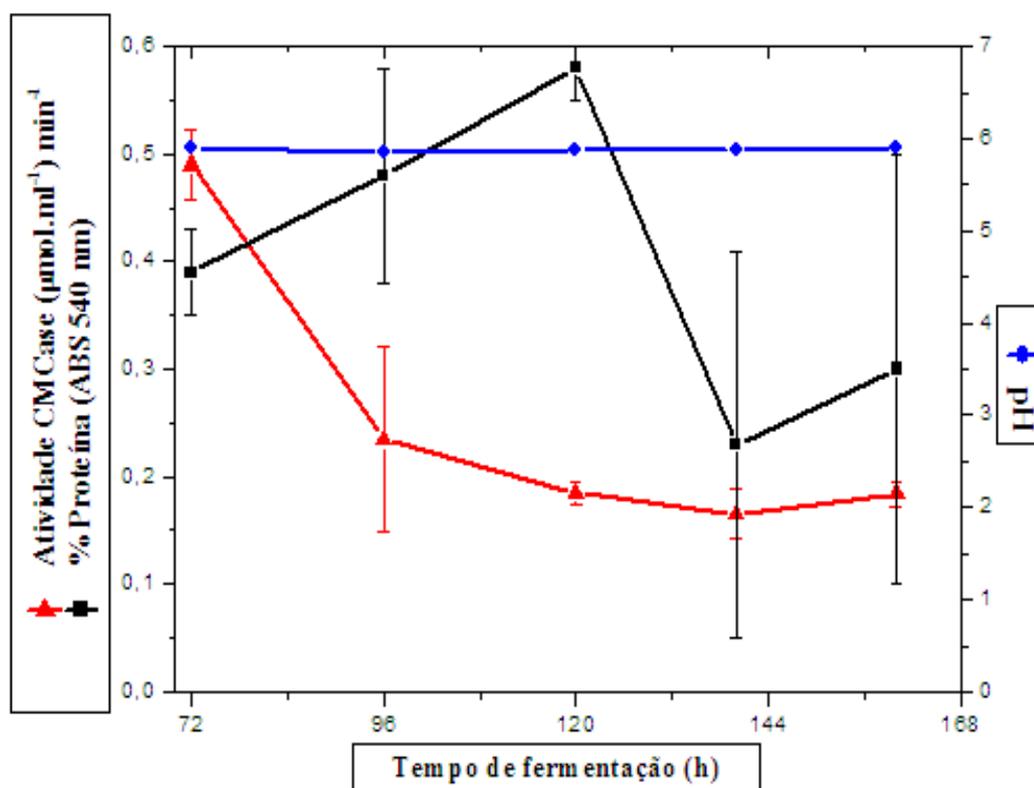


No ensaio 04, observa-se que para uma umidade de 65% e temperatura de 45°C, a maior concentração da enzima CMCase ocorreu em 96 h com atividade de (0,17 U.mL⁻¹). Após esse período, observa-se a diminuição da concentração da enzima e uma nova tendência de aumento de atividade em 140 h com atividade enzimática de (0,13 U.mL⁻¹), assim como nos ensaios 01 e 02, esse comportamento pode ser atribuído ao efeito cumulativo de oligossacarídeos presentes no meio. A maior concentração de proteínas obtida nesse ensaio foi de (0,40%) com 160 h de fermentação.

O crescimento do fungo foi semelhante ao observado no ensaio 03, em que microrganismo teve pouco crescimento, efeito atribuído ao aumento da temperatura.

Tendo em vista a reprodutibilidade dos dados, foram realizados ensaios em triplicata do ponto centra. A Figura 17 apresenta as cinéticas dos processos para esse ensaio.

Figura 17 - Perfil do processo de produção de CMCase por FSS em mesocarpo de coco verde a temperatura de 37°C e umidade 55%.

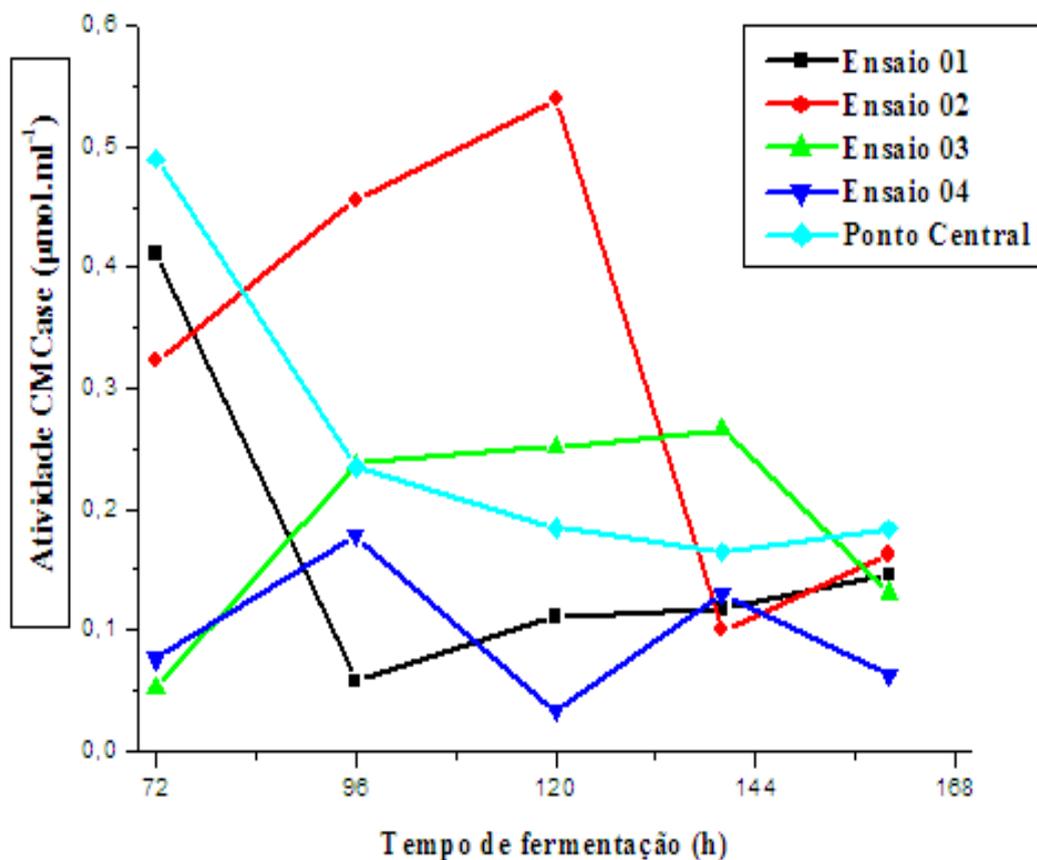


Ao analisar os resultados do ponto central pode-se inferir que ao longo do processo fermentativo, houve atividade enzimática de CMCase. A maior atividade enzimática neste ensaio foi encontrada com 72 h, com (0,49 U.mL⁻¹) e após esse período há uma queda na concentração enzimática, seguida por novo aumento com 160 h de fermentação com atividade enzimática de (0,18 U.mL⁻¹). A maior concentração de proteínas obtido nesses ensaios foi com 120 horas de fermentação, com produção de (0,58%).

Ao analisar o crescimento microbiano, percebe-se que nessa faixa de temperatura (37°C) e umidade (55%) se obteve o maior crescimento do fungo 302, sugerindo que esses índices de temperatura e umidade são ideais para o desenvolvimento do microrganismo.

Observa-se também que em todos os ensaios do planejamento o pH do meio não sofreu grandes variações, ficando entre as faixas de 5,7 e 5,9.

Figura 18 - Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento.



Em todos os ensaios realizados houve produção de atividade enzimática de CMCase em todos os tempos avaliados, sendo que as fermentações ocorreram com variações de temperatura e umidade. Ao analisar a figura 08 é possível verificar que as maiores atividades ocorreram nos ensaios 01 e 02. Os ensaios 01 (45% de umidade e a 30°C) e 02 (65% de umidade a 30°C) apresentaram os melhores resultados para a produção de CMCase com atividade máxima de (0,41U.mL⁻¹) e (0,54U.mL⁻¹), respectivamente. Oliveira Júnior et al. (2015), observaram o melhor resultado para a produção da enzima CMCase de 0,282 e 0,279 (U.mL⁻¹) pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e por um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*) em FSS utilizando resíduo de coco como substrato, a temperatura de 30°C. Ferreira et al. (2011) encontraram valores semelhantes para atividade da CMCase de (0,291 U.mL⁻¹), com umidade de 60% durante 96 h usando fermentação utilizando *Aspergillus niger* em estado sólido do resíduo do cajá. Oliveira Júnior (2014) usando coco como substrato observou ao longo do processo fermentativo a máxima concentração de CMCase de (0,233 U.mL⁻¹).

Nos ensaios 03 (umidade de 45% e 45°C) e 04 (umidade de 65% a 45°C), observou-se produção enzimática de (0,26 U.mL⁻¹) e (0,17 U.mL⁻¹), respectivamente. Os baixos níveis de produção de CMCase pode ter sido ocasionada possivelmente pelo aumento da temperatura, indicando que o aumento da temperatura é desfavorável para a produção da enzima.

No ponto central (umidade de 55% a 37°C), observa-se que este segue os parâmetros dos demais ensaios, a máxima atividade de CMCase foi de (0,49 U.mL⁻¹). Dessa forma, é possível inferir que as temperaturas moderadas promoveram maior produção de CMCase.

Ao analisar o crescimento do fungo com a produção da enzima percebeu-se que o fungo conseguiu crescer mesmo quando submetido a mudanças de temperatura e umidade e que durante seu desenvolvimento não precisou produzir elevados índices enzimáticos. Santos (2007), sugere que nesse caso o microrganismo encontra condições favoráveis ao seu crescimento, se desenvolvendo sem a necessidade de produção de grandes quantidades de enzimas.

5.4 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Tabela 4 - Dados referentes aos pontos de maior atividade de CMCase obtida em cada ensaio.

Ensaio	U (%)	T(°C)	CMCase (U.mL ⁻¹)	Conc. de proteínas(%)	Tempo (horas)
1	-1(45,00)	-1(30,00)	0,41	0,23	72
2	+1(65,00)	-1(30,00)	0,54	0,17	120
3	-1(45,00)	+1(45,00)	0,26	0,07	140
4	+1(65,00)	+1(45,00)	0,17	0,13	96
5	0(55,00)	0(37,00)	0,49	0,39	72
6	0(55,00)	0(37,00)	0,36	0,33	72
7	0(55,00)	0(37,00)	0,37	0,28	72

Fonte: Dados da Pesquisa.

Ao analisar a Tabela 4, observa-se que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos nos experimentos em que foram utilizados níveis moderados de temperatura inicial, 30°C (Ensaio 01, 02) e 37°C (valores do ponto central).

Os valores de produção enzimática obtidos nesse experimento predizem que o microrganismo conseguiu desenvolver-se sem produzir grandes quantidades de enzimas no meio e que as variações de temperatura influenciaram no crescimento microbiano e na produção enzimática e que nenhuma das variações nos teores de umidade influenciaram na produção da enzima CMCase.

A análise de variância (Tabela 5), o gráfico de pareto, os gráficos de superfície de resposta apresentaram coeficiente de determinação $R^2 = 0,87929$, o valor do R^2 apresentado é admissível, pois este coeficiente mede o quanto a variável resposta é explicada pelo modelo. Com o valor de R^2 acima de 70%, o modelo está explicando bem a variação na variável resposta. Harland (1989) afirma que valores de R^2 próximos de 1 representam modelos melhores para predições.

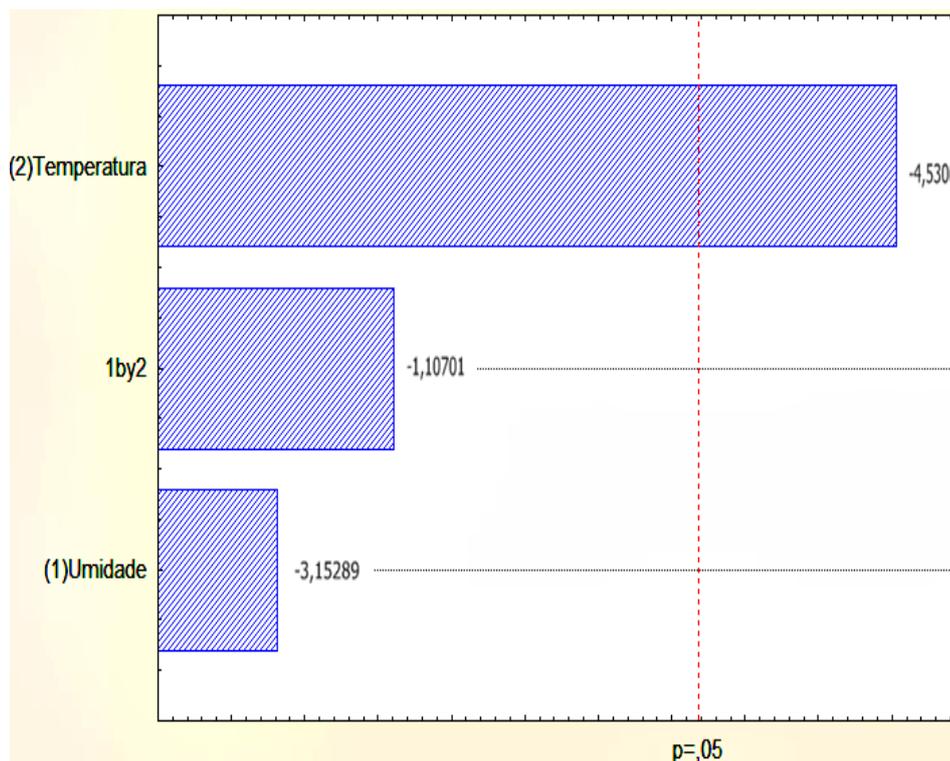
Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCase.

Fator	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	P
Umidade	0,000400	1	0,000400	0,10004	0,772513
Temperatura	0,082076	1	0,082076	20,52693	0,020120
1by 2	0,004900	1	0,004900	1,22547	0,349076
Erro Puro	0,011995	3	0,003998		
Total	0,099371	6			

Fonte: Dados da Pesquisa.

A análise de variância mostra que a variável que teve influencia sobre a atividade enzimática foi a variável temperatura. A análise ainda mostra que a variável umidade bem como a interação entre as variáveis estudadas no processo fermentativo (1by 2) não tiveram influência sobre a atividade enzimática, ou seja, não são significativas.

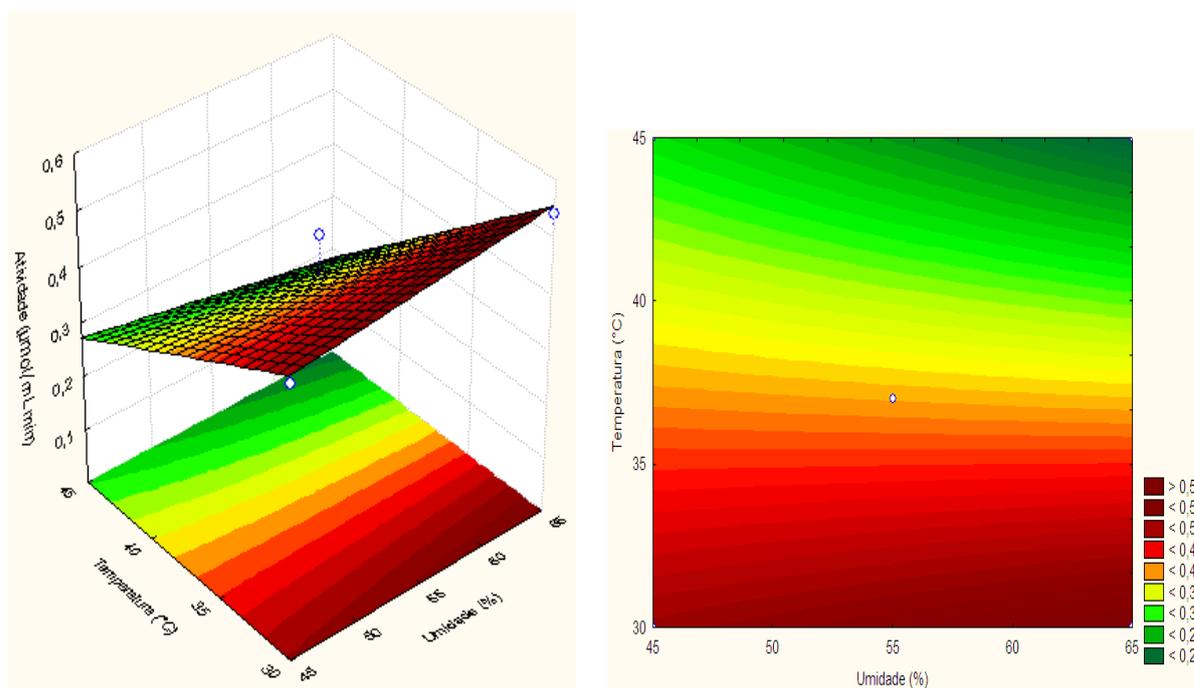
Figura 19 - Diagrama de pareto para a análise da variável dependente atividade enzimática CMC_{Case}.



O diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo que cada variável possui sobre a atividade enzimática, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise estatística (95%).

De acordo com o diagrama de Pareto para a atividade de CMC_{Case} a única variável que influenciou no processo fermentativo foi a temperatura, confirmando que o fungo utilizado neste trabalho conseguiu se desenvolver mesmo quando submetido a variações de temperatura e que este microrganismo é um fungo termofílico. A umidade e a interação entre os parâmetros não foram significativas para um nível de significância de 95%, ou seja, a umidade e a interação (1by 2) não influenciaram na atividade enzimática nas condições utilizadas nesse experimento. Pode-se, portanto, apontar a temperatura como um parâmetro importante para a síntese da enzima CMC_{Case}.

Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno em função da umidade e da temperatura para o pico de atividade enzimática CMCase.



A superfície de resposta ilustra o efeito e permite visualizar a variação da resposta em função das variáveis independentes dentro das faixas utilizadas, umidade e temperatura sobre a atividade de CMCase, no período de fermentação de 160 horas, a atividade de CMCase máxima foi de $(0,54 \text{ U.mL}^{-1})$, esse valor corresponde ao ensaio 02, com umidade de 65% e temperatura de 30°C.

As curvas de contorno confirmam a análise dos efeitos, as faixas de umidade (65%) e temperatura (30°C) proporcionaram as melhores atividades enzimáticas do planejamento, atividades estas encontradas no ensaio 02.

Por meio das análises feitas é possível inferir que a temperatura foi o único fator que realmente influenciou no aumento da atividade enzimática expressa CMCase utilizando o fungo 302 na fermentação.

A partir dos dados obtidos evidencia-se a capacidade deste fungo de degradar a celulose.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos pode-se concluir que:

A reutilização de resíduos é uma alternativa para a redução do impacto ambiental causado e também uma redução nos custos do processo fermentativo.

A temperatura foi a única variável que apresentou influência no experimento realizado nesse trabalho

O mesocarpo do coco pode ser considerado um substrato promissor para a produção da enzima CMC_{ase}, no entanto, talvez deva ser submetido a tratamentos prévios, como por exemplo, a caracterização do resíduos, para que haja aumento da produção enzimática;

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Além de utilizar diferentes processos fermentativos, outros pontos, como a avaliação do pH inicial e o emprego de microrganismos diferentes, podem ser investigados para que maior produção da enzima CMC_{ase} sejam alcançados.

Levando em conta a relação carbono/nitrogênio, outros substratos poderiam ser investigados em análises futuras para a obtenção de uma avaliação mais consistente do desempenho do fungo utilizado neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM G21: **Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi**, 1990.
- AMORIM, B.C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma* SP.** (Dissertação) Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 86, p. 37-66. 2010.
- BERNAL, M. P.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; PAREDES, C.; ROIG, A. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. **Agriculture ecosystems & environment**, v. 69, 1998.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 355-83, 2000.
- BISCHOFF, K. M., ROONEY, A. P.; LI, X. L.; LIU, S.; HUGHES, S. R. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol Lett.** V.28, p. 181-188, 2006.
- BOCCHINI, et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v 40, p 3653-3659, 2005.
- BON et al., **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado.** Rio de Janeiro: **Editora Interciência**, p. 506, 2008.
- BURKE, J.D.; MICHAEL, A.B.; WEINTRAUB, N.; CHARLOTE, C.; HEWINS, R.; Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43. N.4, p.795-803, 2011.
- CAMASSOLA, M. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 391-396, 2004.
- CASTRO, A.M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181-188, 2010.
- CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B., E REDDY, B. R Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p. 323-328, 2007.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic. **FEMS. Microbiology**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- DAMISA, D.; KUTA, F.A.; ADABARA, N.U. Mutagenic treatment of *Aspergillus Níger* with hydroxylamine for improved cellulase synthesis from cellulosic wastes. **Journal of Biotechnological Science**. n.1, v.2, p. 65-72, 2013.
- ENDO, K.; HAKAMADA, Y.; TAKIZAWA, S.; KUBOTA, H.; SUMITOMO, N.; KOBAYASHI, T. A novel alkaline endoglucanase from the alkaliphilic

Bacillus isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 57, p. 109-116, 2001.

FAO. 2012. **World Production**. Available in. Acessado em 15 de dezembro de 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, J. M. **Produção e propriedades de painéis de fibra de coco (Cocos Nucifera L.) em mistura com cimento Portland**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 98 f, 2011.

FERREIRA A. N.; PACHECO C. S. V.; TAVARES J. M. C.; ROCHA T. J. O.; FRANCO M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v.9, n.2, p.207-213, abr./jun. 2011.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, Vol. 30, N° 1, p. 136-145, 2007.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 177, p. 751-766. 1949. ISSN 0021-9258.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1-2, p.72-78, 2010.

GRAMINHA, et al. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p. 1-22, 2008.

HARLAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989. ISBN 0-8247-7881-2.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 25, p. 1-88, 2012.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990- **Manual de los derivados de la cana de azúcar. Bagazo**. Cuban Institute of Research on Sugarcane, México, p. 62, 1990.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. V.1, P. 263-268, 2003.

JUHÁSZ, et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *trichoderma reesei* on various carbon sources. **Processo Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo, Ceres, 1985.

KIRK, T. K. & CULLEN, D. (1998). **Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper industry**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

LASA, I.; BERENGER, J.; **Microbiology**, p. 9-77, 1993.

LEE, C.; LEE, S. S. Cereal Fermentation by Fungi. **Applied Mycology and Biotechnology**, [S.l.], v. 2, p. 151-170, 2002. ISSN 1432-0614.

LINS, S. A. S. **Produção de celulases por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande. 75f. 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2001.

MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M. de; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p.1196-1201, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 1520-6882.

MOREIRA NETO, S. L. M. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe Castanella* CCB 444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto De Botânica, Secretaria De Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

NETO, J. M. S. **Otimização do enriquecimento protéico da algaroba (*Prosopis juliflora*) por meio da fermentação utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 visando a produção de ração animal** (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal de Campina Grande. 63 f. Sumé, 2014.

NUNES, J.S.; DELGADO, R.F.A.; SOUSA, E.N.; COELHO, G.D. **A compostagem como fonte de micro-organismos com potencial biotecnológico**. ANAIS ENAMA, 2014.

OKAMOTO et al. **Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *trametes hirsute***. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 48, p. 273-277, 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 113f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; SOUZA FILHO, P. F. de; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. dos; ASSIS, C. F. Produção de enzimas pelo fungo *penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*aspergillus fumigatus*) em FSS utilizando

resíduo de coco como substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. v.1, nº 2, fevereiro 2015.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1135-1169, 2000.

PERLEY, G.J. **Replanting the tree of life: towards an international agenda for coconut palm research**. Wallingford: CAB, 1992.

POLIZELI, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 37, p. 577-591, 2005.

PORTAL SÃO FRANCISCO. **Coco**. [S.I.], (2005). Disponível em <www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/coco/coco-13.php>. Acessado em 19 de outubro de 2015.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, p.161-179, 2006.

RAY et al. Brown rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for softwood biomass in biofuel production. **Biomass And Bioenergy**, v. 34, p. 1257-1262, 2010.

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

ROSA, M.F. **Alternativas para o uso da casca de coco verde**. Rede local da Embrapa Agroindústria de Alimentos, 10 p, Rio de Janeiro 1998.

ROSA, M.F., BEZERRA, F.C., ARAÚJO, F.B. S NORÕES, E.R.V. **Utilização do pó de coco verde na germinação de alface hidropônico**. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 2, p. 294, jul. 2001.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 1, p. 1-7.

SÁNCHEZ, C. **Lignocelulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi**. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal , 132 p. 2007.

SCHAECHTER, M.; INGRAHAM, J.L.; NEIDHARDT, L.C.; **Micróbio, uma visão geral**. Ed. Artmed, v.1, p. 528, 2010.

SCHMIDELL, W. et al.(Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001.v. 2. ISBN 978-85-212-0279-0.

SEBRAE 2016, **A água de coco e suas propriedades isotônicas impulsionam a produção de coco verde no país, inclusive no interior de vários estados**. Disponível em www.sebrae.com.br. Acessado em 30 de março de 2016

- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. A highly alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus sp.* VG1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.**, v. 17, p. 761-765, 2001.
- SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v.100, p.6679-6681, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SIQUEIRA, Luiz Alberto et al. **A introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Elsevier: Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.
- SUN, et al. Lignin vs. enzyme hydrolysis. **Bioresources**, v. 6, p. 317-328, 2011.
- SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- TAVARES, M. B. R. **Estudo da produção de enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 108 p. 2009.
- TENGERDY, R.P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v 13, p 169-179, 2003.
- TRAUTMANN, N.; OLYNCIW, E. **Compost Microorganisms.** In: CORNELL Composting, Science & Engineering. Cornell University Ithaca, 2005.
- VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Adv Biochem Engin-Biotechnol.** V. 108, p. 121-145, 2007.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; Lichtig, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. ISSN 1678-7064.
- ZANCHETTA A. **Celulases e suas aplicações**, São Paulo, 2013.
- ZHANG, Y. H. P.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.
- ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering.**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.