



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

**APROVEITAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE (*Cocos nucifera* L.)
PARA PRODUÇÃO DE CELULASES**

FORTALEZA

2010

SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

**APROVEITAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE (*Cocos nucifera L.*)
PARA PRODUÇÃO DE CELULASES**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2010

O45a Oliveira, Simone Lopes do Rêgo de

Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulases / Simone Lopes do Rêgo de Oliveira, 2010.

81 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2010.

1. Coco 2. Fermentação. 3. Enzimas. I. Rodrigues, Sueli (Orient.). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 664

SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

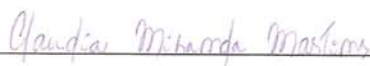
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 26/02/2010.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará - UFC



Dra. Célia Maria Araújo Galvão
Centro de Tecnologia Canavieira - CTC

À Deus, presente em todas as horas em minha vida, pois serviram para o meu crescimento espiritual, minha mãe e meu esposo por serem responsáveis por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Para realizarmos nossos sonhos e chegarmos à vitória precisamos enfrentar grandes obstáculos, e quando temos por perto pessoas que ajudaram para que a realização dos sonhos tornarem-se possível, os desafios se tornam bem menores.

Primeiramente à DEUS por ser a luz da minha vida, a minha força, o meu escudo, a minha fortaleza e ter me dado sabedoria guiando sempre o meu caminho.

À minha amada mãe Zenilda que foi o início de tudo, que é meu porto seguro e exemplo de força e honestidade, todo meu amor.

Ao meu amado esposo Luiz Henrique fonte de incentivo, amor, companheirismo e paciência, obrigada por ter acreditado em mim, ter vivido comigo cada momento de alegria e dificuldade. Toda minha gratidão por me fazer acreditar que tudo daria certo e por ser incondicionalmente meu maior incentivador.

Professora Dra. Sueli Rodrigues raros são os verdadeiros mestres, somente aqueles que têm o dom de multiplicar conhecimentos com prazer, humildade e dedicação. Obrigada pela oportunidade de conhecê-la, por sua orientação, competência, sabedoria, confiança e apoio constante em todos os momentos na execução deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial minha avó Anita que rezou e, tenho certeza, ainda olha por mim junto do Pai, muitas saudades.

À Profa. Dra. Claudia Miranda Martins e à Dra. Célia Maria Araújo Galvão por tão gentilmente aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação.

À Thatyane Vidal pelas valiosas sugestões, amizade, constante presença nas alegrias, tristezas, incertezas e por sua fundamental ajuda na realização desse trabalho, dividindo comigo seu conhecimento em momentos de dúvidas.

À Tatiane Maciel por sua fundamental importância e participação na execução deste projeto. Obrigada pela infinita paciência ao meu lado.

À Soraya Sancho pelo carinho, incentivo, ajuda incondicional e infinita paciência para a concretização deste trabalho, todo meu amor e admiração. Minha gratidão também pela ajuda de Daniel Sancho.

Às amigas Mariana Santiago, Cristiane Rabelo, Cláudia Patrícia e Imilena pela sincera amizade, companheirismo e por estarem sempre presentes nesses dois anos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biotecnologia: Anaísa, Isabel, Luís Carlos, Mauro, Jonas, Ana Laura, Tiago, Samara, Rosane, Mayra, Ana Lúcia e Alexandre pelo carinho e ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto da EMBRAPA – Agroindústria Tropical pela doação do pó da casca de coco verde utilizado neste trabalho.

À Embrapa – Semi-árido pelas linhagens de *Trichoderma polysporum* e *T.viride* utilizadas neste trabalho.

À Coleção de Culturas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*ARS Culture Collection, Peoria, Illinois, USA*) pelas linhagens de *Aspergillus niger* NRRL 2001 e *T. reesei* NRRL 11460.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado.

À UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela estrutura necessária à realização desse trabalho.

*“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria,
mas os insensatos desprezam a sabedoria e o ensino”.*
Provérbios 1:7

RESUMO

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia. Nas últimas décadas tem-se observado um aumento na tendência do uso da fermentação semi-sólida para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de macromoléculas vegetais complexas. No campo da comercialização de enzimas, o Brasil é consumidor de produtos importados. Neste cenário, a casca do coco verde surge como uma matéria-prima estratégica para alavancar a produção de enzimas em território nacional. Deste modo, torna-se importante um estudo mais aprofundado sobre o uso do pó da casca do coco verde como substrato para a obtenção de enzimas celulolíticas, sobretudo de interesse da indústria de alimentos. Os fungos produtores de celulases utilizados neste trabalho foram isolados da casca de coco. Os resultados de atividade enzimática obtidos com as cepas isoladas da casca do coco foram comparados quanto à capacidade de produção de celulases com linhagens de *Trichoderma polysporum*, *T. viride*, *T. reesei* NRRL 11460 e *Aspergillus niger* NRRL 2001. O resíduo da casca de coco verde como fonte alternativa para a produção de celulases se revelou como um ótimo substrato indutor, pois de acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a linhagem CZ01 (isolada da casca do coco) é boa produtora de celulases, pois cresceu facilmente em substrato semi-sólido lignificado, além de apresentar elevada atividade no extrato enzimático bruto, quando comparada com outros produtores enzimáticos, incluindo uma linhagem patenteada de *T. reesei* Rut C-30 (NRRL 11460), utilizando o mesmo substrato indutor. Vale ressaltar também, que a grande maioria das celulases reportadas na literatura científica são obtidas em condições de pH ácido e neste estudo a máxima atividade enzimática foi obtida na faixa de pH muito próximo da neutralidade (faixa de 6.0 a 6.5). Portanto, a linhagem selecionada e isolada da casca do coco (CZ01) apresentou boa atividade enzimática quando comparada com resultados obtidos por outras linhagens reportadas na literatura científica, tratando-se, portanto, de uma linhagem bastante promissora para a produção de celulases viabilizando o aproveitamento deste resíduo agroindustrial.

Palavras-chave: Processos fermentativos, enzimas e subprodutos.

ABSTRACT

Enzyme production by fermentative process is a broad field of biotechnology. In recent decades, there has been an increasing trend in the use of solid-state fermentation (SSF) for the production of some enzymes, especially those involved in the degradation of vegetables complex macromolecules. Regarding the enzyme market Brazil is consumer of imported products. In this scenario, the coconut shell emerges as a strategic raw material to reach the production of enzymes in the country. Thus, it is important to further on the use of coconut green shell powder as substrate for cellulolytic enzymes of interest in the food industry. Cellulase producing fungi used in this study were isolated from coconut shell. The results of enzyme activity obtained with the isolated strains from coconut shell were compared in terms of production capacity of cellulases with strains of *Trichoderma polysporum*, *T. viride*, *T. reesei* NRRL 11460 and *Aspergillus niger* NRRL 2001. From the results, the coconut shell waste can be considered a good inducer for cellulase production. The strain isolated from coconut shell (CZ01) is a good producer under solid-state fermentation because higher enzyme activity was obtained with its crude enzyme extract when compared with other enzyme producers, including a patented strain of *T. reesei* Rut C-30 (NRRL 11460), using the same inducer substrate. It is also worth mentioning that the majority of cellulase reported in the scientific literature are obtained under conditions of acidic pH and in this study the maximum enzyme activity was obtained at pH close to neutral (range 6.0 to 6.5). Therefore, the isolated and selected strain from the coconut shell (CZ01) showed good enzyme activity when compared with results obtained by other strains reported in the scientific literature, being therefore a very promising strain for the cellulase production enabling the use of this agroindustrial wastes.

Keywords: Fermentation process, enzymes and subproducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte longitudinal do coco verde.....	18
Figura 2	Esquema de degradação da celulose.....	22
Figura 3	Formas de representação gráfica da molécula de β -D-glucose.....	27
Figura 4	Estrutura da celulose.....	27
Figura 5	Pó da casca de coco verde.....	30
Figura 6	Pó da casca de coco verde deslignificada.....	31
Figura 7	Casca de coco com fungos produtores de celulases.....	31
Figura 8	Imagens macroscópicas das linhagens isoladas da casca de coco: (a) CZ01; (b) C02 e (c) CD03.....	41
Figura 9	Imagens microscópicas das lâminas de microcultivo, utilizando a objetiva de 40x, das linhagens selecionadas da casca de coco: (a) CZ01 e (b) CD03.....	41
Figura 10	Avaliação do método de cultivo para a produção de celulases por fermentação semi-sólida (FSS) e fermentação submersa (FS).....	43
Figura 11	Superfície de resposta para a otimização da determinação da atividade enzimática.....	47
Figura 12	Diagrama de pareto para o efeito estimado de cada variável.....	48
Figura 13	Efeito do pH na hidrólise enzimática de celulose para a linhagem CZ01 à 60°C.....	49
Figura 14	Efeito da quantidade de pó da casca de coco verde como substrato na atividade enzimática de celulases, utilizando uma quantidade fixa de trigo de 1,5 g.....	51
Figura 15	Atividade específica de xilanase, carboximetil celulase e celobiase.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química da casca de coco verde.....	18
Tabela 2 - Composição química do pó de coco e da fibra do coco	19
Tabela 3 - Ensaio do planejamento fatorial (2^2).....	37
Tabela 4 - Composição do meio de cultura para a produção de celulasas	38
Tabela 5 - Resultados de atividade enzimática (UI/gds) obtidos a partir da fermentação da casca de coco verde com e sem tratamento de deslignificação	42
Tabela 6 - Valores de atividade enzimática (UI/gds) obtidos em diferentes métodos de extração da enzima	45
Tabela 7 - Planejamento fatorial (2^2) e resultados obtidos de atividade enzimática de celulasas produzida pelo isolado CZ01	46
Tabela 8 - Análise de variância para a atividade enzimática (UI/gds)	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	Produção de coco verde	17
2.2.	Caracterização da casca do coco verde	18
2.3.	Aproveitamento da casca do coco verde	19
2.4.	Enzimas	20
2.4.1.	Celulases	21
2.4.2.	Xilanase	23
2.4.3.	Celobiase	24
2.4.4.	Produção de enzimas por fermentação semi-sólida	24
2.5.	Celulose	26
2.6.	Fungos produtores de enzimas celulolíticas	28
3	METODOLOGIA	30
3.1.	Matéria-prima para fermentação	30
3.1.1.	Obtenção do resíduo	30
3.1.2.	Deslignificação do pó da casca de coco verde	30
3.1.3.	Remoção de taninos	31
3.2.	Microrganismos	31
3.2.1.	Isolamento e seleção de linhagens fúngicas produtoras de celulases	31
3.2.2.	Ativação das linhagens utilizadas para comparação	32
3.3.	Composição dos meios de cultura para a produção de celulases	33
3.3.1.	Fermentação submersa	33
3.3.2.	Fermentação semi-sólida	34
3.4.	Métodos de extrações da enzima do meio sólido	34
3.5.	Determinação da atividade enzimática de celulase total	34
3.6.	Seleção da linhagem com maior atividade celulolítica total	35
3.7.	Otimização da temperatura e pH da atividade enzimática de celulases	36
3.8.	Otimização da composição do meio de cultura para a produção de celulases	38
3.9.	Determinação da atividade enzimática	38
3.9.1.	Xilanase	39
3.9.2.	Carboximetil celulase (CMCase)	39

3.9.3	Celobiase	39
3.10	Análise estatística	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Isolamento e seleção de linhagens fúngicas produtoras de celulases	41
4.2	Deslignificação da casca de coco verde	42
4.3	Remoção de taninos da casca de coco verde	43
4.4	Métodos de cultivo para a produção de celulases	43
4.5	Seleção da linhagem com maior atividade celulolítica total	45
4.6	Otimização da temperatura e pH para determinação da atividade da linhagem selecionada	46
4.7	Otimização da composição do meio de cultura para a produção de celulases	50
4.8	Determinação da atividade enzimática específica	52
	CONCLUSÕES	54
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	64

Anexo 1 - Determinação por superfície de resposta dos parâmetros pH e temperatura da atividade celulase produzida por *Trichoderma polysporum* em meio contendo casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*). Apresentado no XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

Anexo 2 - Avaliação do cultivo de linhagens de *Trichoderma spp.* em resíduos de baixo custo para produção de enzimas celulolíticas. Apresentado no XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

Anexo 3 - Determinação por superfície de resposta dos parâmetros pH e temperatura da atividade celulase produzida por *Aspergillus niger* NRRL 2001 em meio contendo casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*). Apresentado no IX Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2009.

Anexo 4 - Resultados do planejamento experimental 2² obtidos com a linhagem *Trichoderma reesei* NRRL 11460.

1 INTRODUÇÃO

O consumo *in natura* e o processamento de frutas para a produção de sucos resultam em grandes volumes de resíduos que devem ser adequadamente dispostos. Estes resíduos são constituídos em sua maioria por bagaços, cascas e sementes de frutas, destacando-se a casca do coco verde. Apesar dos esforços tecnológicos empregados para o aproveitamento destes resíduos, a demanda ainda é muito incipiente em relação à sua disponibilidade (COELHO *et al.*, 2001).

A disposição de resíduos no meio ambiente deve ocorrer após o tratamento dos mesmos, adequando-os aos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (AQUARONE; BORZANI; LIMA, 1990). Esta iniciativa, em geral, demanda investimentos significativos e não são acessíveis aos pequenos e médios produtores e comerciantes. Os resíduos gerados pela indústria de alimentos possuem alto valor de reutilização. Dessa forma, nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para a minimização ou reaproveitamento destes nos diferentes processos industriais. Estes resíduos envolvem quantidades apreciáveis de casca e caroço que, além de fonte de matéria orgânica, servem também como fontes de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento como, por exemplo, em processos fermentativos (COELHO *et al.*, 2001).

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia. Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na tendência do uso da fermentação semi-sólida, para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de macromoléculas vegetais complexas (COUTO; SANROMÁN, 2005).

A fermentação em estado sólido ou cultura em estado sólido é definida como sendo o tipo de cultivo no qual um microrganismo cresce numa mistura de material sólido (água-insolúvel), na ausência ou presença de limitada quantidade de água livre (GERVAIS; MOLIN, 2003), a água presente nestes sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Ela imita o meio natural dos fungos e, em geral, possibilita a obtenção de elevadas atividades de enzimas, incluindo enzimas ligninolíticas (PANDEY *et al.*, 1999). O crescimento do microrganismo pode ocorrer na superfície ou em todo substrato, dependendo da porosidade e da umidade do substrato (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Os meios de cultivo utilizados em FSS, na sua maioria, são produtos agrícolas ou subprodutos de agroindústrias, como por exemplo: farelo de arroz, farelo de trigo, bagaço de mandioca, torta de babaçu, bagaço de cana-de-açúcar e casca de coco verde. Estes substratos contêm, geralmente, substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes. Enzimas hidrolíticas, secretadas por alguns microrganismos, hidrolisam estas macromoléculas liberando pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento microbiano (COELHO *et al.*, 2001). Dentre estes subprodutos agroindustriais, a utilização da casca de coco verde, embora apresentando potencial para ser utilizada como substrato na produção de enzimas hidrolíticas na indústria de alimentos, ainda é pouco difundida, mesmo havendo um grande volume de resíduos oriundos da comercialização da água-de-coco, já consolidada no Nordeste brasileiro.

Devido à ampla disponibilidade de resíduos de casca de coco verde na região Nordeste e a possibilidade real de agregar valor a tais resíduos, com significativa redução do impacto ambiental causado pelo seu acúmulo, propõe-se nesta dissertação o uso do pó da casca de coco verde como substrato semi-sólido para a obtenção de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, como as celulasas, xilanase e celobiase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de coco verde

O Brasil é líder mundial na produção de coco verde, com uma área equivalente a 57 mil hectares plantados. Em 2007, cerca de 2,77 bilhões de toneladas de cocos foram produzidas, em uma área cultivada de 273.459 hectares (FAO, 2008). O aumento na produção e no consumo da água-de-coco tem gerado cerca de 6,7 milhões de toneladas de casca/ano, acarretando um sério problema ambiental, sobretudo para as grandes cidades, dado que cerca de 80% a 85% do peso bruto do coco verde é considerado lixo (MACHADO; DAMM; JUNIOR, 2009).

A casca de coco verde, subproduto do uso e da industrialização da água-de-coco, é depositada em lixões e às margens de estradas. É um material de difícil decomposição, pois leva mais de oito anos para se decompor. Cerca de 70% do lixo gerado nas praias do Nordeste é composto por cascas de coco verde. Em Fortaleza são geradas 150 toneladas por dia de resíduos de cascas de coco verde (DIÁRIO DO NORDESTE, 2010).

De modo geral, resíduos agroindustriais vêm sendo progressivamente utilizados como alternativa para minimizar o impacto ambiental por eles provocado (CORREIA *et al.*, 2003). Portanto, a utilização da casca do coco verde processada, além da importância econômica e social, é também importante do ponto de vista ambiental.

Uma alternativa para a minimização deste problema consiste no aproveitamento de tais resíduos em processos fermentativos. Uma vez que eles podem ser usados como substratos sólidos para o crescimento de microrganismos, visto que a matéria orgânica que os constitui é utilizada como fonte de energia e carbono para o crescimento, síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (MENEZES *et al.*, 2006).

2.2. Caracterização da casca do coco verde

A casca de coco é constituída por uma fração de fibras e outra fração denominada pó, que se apresenta agregada às fibras (Figura 1). De acordo com Kampf e Fermino (2000), o pó da casca de coco é um material residual do processamento da casca de coco verde. A composição química da casca de coco varia conforme a fonte, a época do ano e a quantidade de chuvas (ROSA *et al.*, 2001).

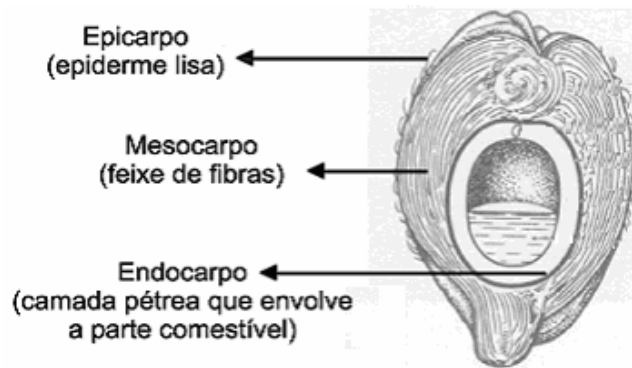


Figura 1- Corte longitudinal do coco verde

Fonte: FERREIRA *et al.* (1998).

Uma caracterização química do pó da casca de coco verde proveniente do Estado do Ceará foi realizada no Laboratório de Solos da Embrapa Agroindústria Tropical (Tabela 1) (SILVA, 1999).

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

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

M.O - matéria orgânica
Fonte: SILVA (1999).

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

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

Fonte: HAN (2009).

2.3. Aproveitamento da casca do coco verde

Estudos recentes sugerem a utilização do resíduo da casca de coco na agricultura intensiva, principalmente no cultivo de plantas ornamentais e hortaliças (BRÍGIDA *et al.*, 2010). Tornar viável o aproveitamento da casca do coco verde, gerado tanto como resíduo industrial quanto como lixo urbano, significaria mais uma alternativa de lucro para os sítios de produção, além da importância econômica, social e ambiental.

Uma das alternativas para a utilização da casca do coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como, por exemplo, a produção de enzimas. Este resíduo lignocelulósico apresenta composição similar à madeira (RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008). Dessa forma, o resíduo pode ser utilizado como meio de cultura natural para a produção de enzimas hidrolíticas, como: celulasas, celobiase e xilanase. Além de apelo ambiental, este resíduo também conta com importante apelo econômico, uma vez que meios de cultura sintéticos são muito caros, e a opção geralmente é feita por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agroindústria (COUTO; SANROMÁN, 2005).

No campo da comercialização de enzimas, o Brasil é basicamente consumidor de produtos importados, o que transforma o coco verde em uma arma estratégica para alavancar o desenvolvimento de uma indústria nacional de enzimas (ROSA *et al.*, 2001).

Portanto, investir no aproveitamento da casca de coco verde para a produção de enzimas significa se inserir em um mercado que movimenta, anualmente, cerca de dois bilhões de dólares. Tal montante impulsiona o grande interesse na busca por processos de baixo custo energético, baixo impacto ambiental e que utilizem matérias-primas renováveis, como é o caso dos subprodutos da agroindústria (MULIGGWE; KASEVA, 2006).

Sendo os resíduos do coco verde um potencial de recursos ociosos ou mal aproveitados, sua inclusão no horizonte de negócios pode resultar em atividades que proporcionem lucros através da criação de novos produtos com alto valor agregado (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

2.4. Enzimas

A denominação enzima, proposta em 1867 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymç*, que significa “em fermentação” (SPIER, 2005). São substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (FELLOWS, 1994).

Conforme Spier (2005), enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária e termolábeis, que aceleram a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações e efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos, sejam plantas ou animais, desde os mais simples (unicelulares) aos mais desenvolvidos (pluricelulares).

As enzimas apresentam ampla utilização na indústria alimentícia, principalmente em processos de maceração de vegetais e frutas para a produção de néctares e purês, no processamento de produtos cárneos, na produção de queijos, na extração e clarificação de sucos de frutas, vinho e na recuperação de óleos vegetais. As enzimas, como poligalacturonase e pectinase, entre outras, são utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para diminuir a viscosidade dos mesmos, contribuindo para o aumento do seu fluxo nos processos que empregam membranas (VAILANT *et al.*, 1999). São utilizadas também nas indústrias de papel e celulose, têxtil e na produção de ração animal (CUNHA, 1999).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal como, por exemplo, menor custo de produção e maior facilidade de produção em larga escala (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Apesar disto, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre um determinado substrato podem apresentar funcionamento ótimo em

pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem prévia das enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES *et al.*, 2002).

A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido, leva em consideração uma série de fatores, principalmente relacionados ao custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais.

Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulíticos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose (avicelase, carboximetilcelulases e β -glucosidase); enzimas que atuam sobre a porção hemicelulósica (xilanasas, mananases, glucanases e galactanasas) e enzimas oxidativas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoxidases, que atuam sobre a lignina (TUOR; WINTERHALTER; FIECHTER, 1995).

2.4.1. Celulases

As enzimas conhecidas como celulases hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos e uma porção não carboidrato (GERVAIS; MOLIN, 2003). Celulases são sistemas enzimáticos complexos com atividade endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.91) e 1,4- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) (Figura 2). Estas enzimas juntamente com as hemicelulases e pectinases estão entre as enzimas mais importantes no processamento de material lignocelulósico para a produção de alimentos, combustíveis e produtos químicos (KIM; HONG, 2001).

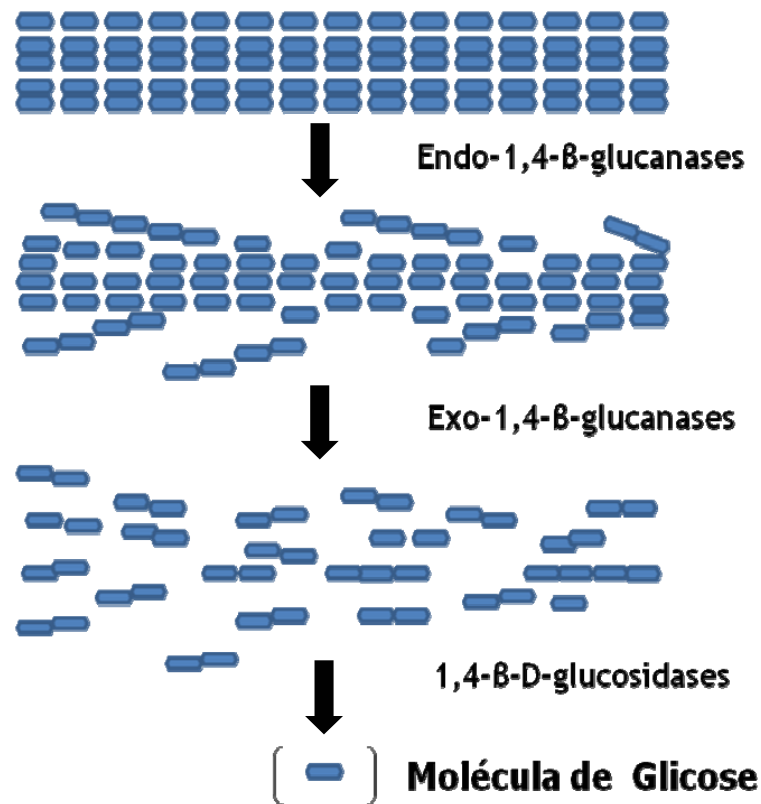


Figura 2 - Esquema de degradação da celulose.

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada com ácidos, liberando unidades de glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Na natureza existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas, contudo, apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais e aromatizantes. Estas enzimas catalisam ainda processos de produção de vinagre de laranja e extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). Complexos enzimáticos contendo celulasas, glucanases, hemicelulasas e pectinases são utilizados na indústria de vinhos para acelerar o processo de vinificação e melhorar a qualidade do produto final (ROLDÁN *et al.*, 2006).

2.4.2. Xilanase

Xilanases são enzimas produzidas principalmente por fungos e bactérias, estando associadas às celulases ou outras enzimas. A xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste de uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (BIELY, 1993). A xilana localiza-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interface entre a lignina e os outros polissacarídeos.

Dependendo de sua origem biológica, uma ou mais isoformas de endo-1,4- β -xilosidase (1,4- β -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) clivam a xilana aleatoriamente em suas ligações β -1,4 em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose. Já a β -xilosidase (β -D-xilosídeo-xilohidrolase, EC 3.2.1-37) hidrolisa xilobiose e pequenos xilo-oligossacarídeos em regiões não-redutoras até xilose. Endo-xilanases, os maiores componentes do sistema xilanolítico de microrganismos, têm sua ação facilitada por enzimas acessórias que removem as ramificações da cadeia do xilano como a α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetilxilano esterase e ácido felúrico esterase, entre outras (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Existem evidências de que a xilana e resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes e de que pontes de hidrogênio e forças de Van der Wals unem este polissacarídeo à cadeia de celulose (FERREIRA FILHO, 1994).

O grande interesse pelas enzimas xilanases está relacionado ao seu potencial de aplicação na indústria e sua eficiência vem sendo estudada nos processos de clareamento de polpa de papel, recuperação de fibras celulósicas têxteis e bioconversão da biomassa em combustíveis e substâncias químicas (PRADE, 1995). Na panificação, as xilanases são adicionadas ao pão para aumentar o seu volume específico, determinando a textura do miolo e seu sabor final (CAMACHO; AGUIAR, 2003). As xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanas a oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e conseqüentemente eliminando a turbidez da cerveja. A produção de etanol a partir de pentoses como a xilose vem sendo amplamente estudada (RIZZATTI *et al.*, 2004).

2.4.3. Celobiase

De acordo com Silva, Franco e Gomes (1997), acredita-se que a degradação da celulose requer um complexo enzimático envolvendo um conjunto de três enzimas, como endoglucanase, exoglucosidase e β -glucosidase. A endoglucanase (EG), ou endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4), catalisa aleatoriamente a hidrólise das ligações internas nas regiões amorfas da molécula liberando celo-oligossacarídeos com vários graus de polimerização e celobioses. Da ação desta enzima resultam terminais livres para a ação da exoglucanase, ou exo-1,4- β -glucanase ou celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91), que promove a hidrólise sequencial da segunda ligação glicosídica a partir da extremidade não redutora da molécula produzindo celobiose. A celobiase ou β -glucosidase (EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise da celobiose e, numa velocidade menor, degrada também pequenos oligossacarídeos, nos dois casos liberando D-glucose. A síntese da β -glucosidase por microrganismos depende de diversos fatores, como: tempo de cultura, presença de compostos indutores no meio e um nível intracelular adequado de nutrientes e minerais (PALMA-FERNANDEZ; GOMES; DA SILVA, 2002).

As enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases atuam sobre a celulose produzindo celobiose como produto final. A principal função da β -glucosidase, comumente chamada de celobiase, é a hidrólise da celobiose à glucose, reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases. Por prevenir o acúmulo do dissacarídeo, a β -glucosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulósica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose (PARK *et al.*, 2001).

2.4.4. Produção de enzimas por fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida (FSS) é definida como sendo o tipo de cultivo no qual um microrganismo cresce numa mistura de material sólido, na ausência ou presença limitada de água livre. Ela imita o meio natural dos fungos e, em geral, possibilita a obtenção de elevadas atividades de enzimas, incluindo enzimas ligninolíticas. O crescimento do microrganismo

pode ocorrer na superfície ou em todo substrato, dependendo da porosidade e da umidade do substrato (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Na FSS podem ser destacadas como principais vantagens: a simplicidade, o baixo custo, a alta produtividade, a alta concentração dos produtos, menor requerimento de espaço e energia (PANDEY *et al.*, 1999). O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição. Desse modo, a FSS tem se mostrado adequada para a produção de enzimas por fungos filamentosos, ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural destes organismos (PANDEY, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2005).

A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido, leva em consideração uma série de fatores, principalmente relacionados ao custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em *habitats* naturais (PANDEY, 2003).

Materiais lignocelulósicos são produtos primários da fotossíntese de organismos em ambientes terrestres, sendo também o recurso natural renovável mais abundante. Sua disponibilidade para uso imediato é estimada em aproximadamente 100 bilhões de toneladas por ano (JARVIS, 2003; ZHANG; LYND, 2005). A degradação da celulose por celulasas e celobiasas, produzidas por inúmeros microrganismos, é responsável pelo ciclo de carbono fixo para CO₂ atmosférico (MELILLO *et al.*, 2002; BERNER, 2003). O mesmo mecanismo pode ser utilizado para a produção sustentável de bioprodutos (DEMAIN; NEWCOMB; WU, 2005; MOREIRA, 2005; REDDY; YANG, 2005).

Em materiais lignocelulósicos, a celulose, a hemicelulose e a lignina encontram-se dispostas em um arranjo muito complexo, o que dificulta o processo de hidrólise. Entretanto, a produção de bioprodutos, destacando-se enzimas, pode ser realizada através da conversão destes resíduos. Destes constituintes, chamam atenção a celulose e lignocelulose, que são apropriados para a produção de enzimas líticas industriais utilizadas na indústria de alimentos como as celulasas, celobiasas e xilanases (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007).

2.5. Celulose

A celulose é o composto orgânico mais comum na natureza. Ela constitui entre 40% e 50% de quase todas as plantas. Há estimativas de que cerca de 50 bilhões de toneladas deste composto químico são produzidas por ano. A celulose está presente também em bactérias e algas, mas em pequenas proporções, além de estar localizada principalmente na parede secundária das células vegetais (KLOCK *et al.*, 2005).

O estudo da química da celulose iniciou em 1838 pelo químico francês Anselme Payen, que mostrou por análise elementar que o tecido de plantas contém um componente majoritário com 44,4% de carbono; 6,2% de hidrogênio e 49,3% de oxigênio, o que é equivalente a uma fórmula empírica de $C_6H_{10}O_5$ e um peso molecular de 162. Desde que, a análise do peso molecular da celulose indicava pesos muito maiores que 162, era evidente que a celulose era, ou um alto polímero (molécula constituída por um grande número de unidades repetidas relativamente simples conectadas por ligações químicas), ou um agregado de moléculas simples unidas por forças de associações secundárias (VIGIANO, 2008).

Evidências conseguidas após 1930 provaram que a celulose é um polímero composto por um grande número de unidades repetidas. Posteriormente, foi provado que estas unidades derivam da condensação da D-glucose, (um açúcar simples - monossacarídeo hexose $C_6H_{12}O_6$) (KLOCK *et al.*, 2005). As formas de representação da molécula de glucose são apresentadas na Figura 3.

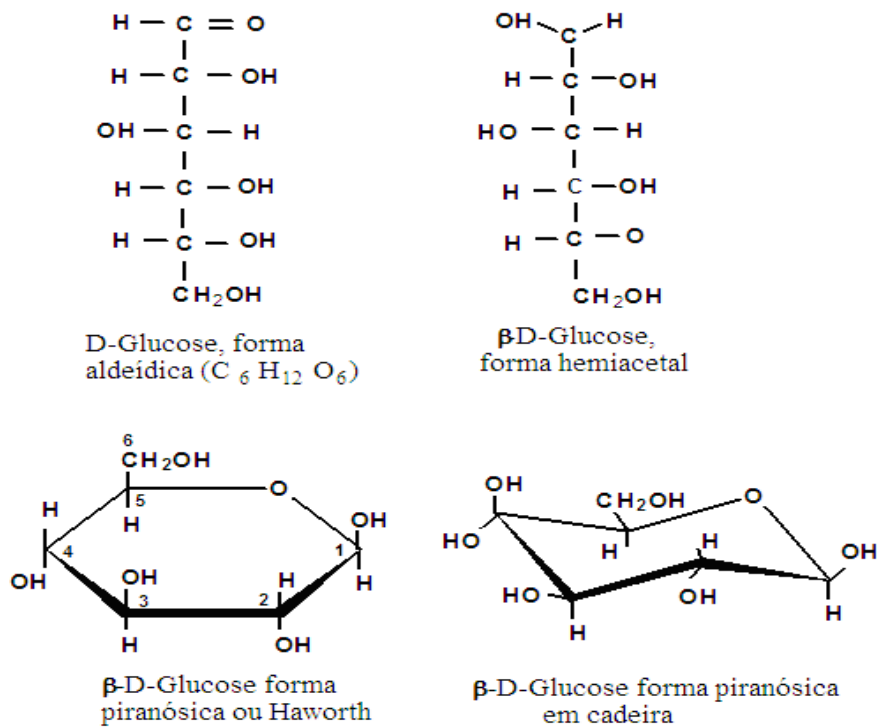


Figura 3 - Formas de representação gráfica da molécula de β -D-glucose

Fonte: KLOCK *et al.* (2005).

A celulose é um polissacarídeo que se apresenta como um polímero de cadeia linear com comprimento suficiente para ser insolúvel em solventes orgânicos, água, ácidos e álcalis diluídos, à temperatura ambiente, consistindo de unidades de β -D- anidroglicopiranoose, que se ligam entre si através dos carbonos 1-4, possuindo uma estrutura organizada e parcialmente cristalina (CASTRO *et al.*, 2007). A fórmula de representação da celulose é apresentada na Figura 4.

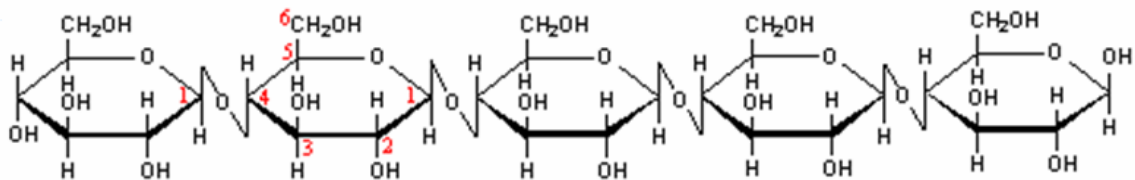


Figura 4 - Estrutura da celulose

Fonte: KLOCK *et al.* (2005).

A estrutura da celulose se forma pela união de moléculas de β -glucose através de ligações β -1,4-glicosídicas. A celulose é um polímero de cadeia longa de peso molecular variável, com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, com um valor mínimo de $n = 200$ (tipicamente 300 a 700, podendo passar de 7000) (SAHA, 2003).

A celulose tem uma estrutura linear ou fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias, fazendo-as impenetráveis a água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais.

2.6. Fungos produtores de enzimas celulolíticas

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a diversos substratos, entre os quais: efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agroindustriais e resíduos derivados de petróleo (TAVARES *et al.*, 1998). Os fungos filamentosos pela sua peculiar capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade relativa e na ausência de água livre são os que melhor se adaptam a FSS. Todos os microrganismos de importância industrial empregados em FSS crescem na natureza, sobre substratos com reduzida umidade e pertencem geralmente a espécies dos gêneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (PANDEY *et al.*, 2003).

O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição bastante ampla ocorrendo no mundo inteiro, em quase todos os tipos de solos e outros *habitats* naturais, especialmente, naqueles que contêm matéria orgânica. Por se tratar de um micoparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (HARMAN *et al.*, 2004). Esta atividade de biocontrole tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo, à produção de enzimas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, como as celulases, quitinases, β -1,4-glucosidases e proteases. Do ponto de vista biotecnológico, algumas espécies, como *Trichoderma reesei* e *T. viride*, têm sido utilizadas para a produção de celulases em escala industrial (CORABI-ADELL; LUCON; KOIKE, 2002). Estas diversas aplicações, aliadas à sua importância ecológica, indicam a necessidade de um estudo mais

sistemático de sua biodiversidade, como também a triagem e preservação de linhagens promissoras.

As espécies do gênero *Aspergillus* são isoladas geralmente do solo, dos ambientes aquáticos e do ar. É uma das poucas espécies de fungos que receberam o *status* de GRAS (*Generally Regarded As Safe*) conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA) (NASSER *et al.*, 2003).

A fermentação industrial de culturas de *Aspergillus* produz numerosas enzimas e metabólicos comercialmente importantes incluindo ácido cítrico, α -amilase, glucoamilases, glucanases, lipases, hemicelulases e xilanases. O gênero *Aspergillus* pode secretar grandes quantidades de proteínas no meio de cultura. Desde 1980, os biotecnologistas têm usado uma variedade de cepas de *Aspergillus* para expressar proteínas de interesse comercial (LOPES, 2005).

Cepas do fungo filamentosso *Aspergillus niger* são as mais utilizadas na produção comercial de pectinases porque suas características toxicológicas são aprovadas em termos legislativos (MALVESSI; SILVEIRA, 2004). As formas mutantes desta espécie também são bastante utilizadas, pois o rendimento de um processo enzimático pode ser melhorado através da seleção de mutantes que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor (MENEZES *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram avaliadas três espécies de *Trichoderma*, uma de *Aspergillus* além de três espécies fúngicas isoladas diretamente da casca do coco verde, com a finalidade de selecionar a melhor produtora de celulasas utilizando a casca do coco verde como substrato.

3 METODOLOGIA

3.1. Matéria-prima para fermentação

3.1.1. Obtenção do resíduo

O resíduo utilizado nesse estudo foi obtido após beneficiamento da casca conforme descrito por Rodrigues, Pinto e Fernandes (2008). As cascas do coco verde foram cortadas em pedaços, lavadas com água fria para remoção de sujidades e secas ao sol por 4 dias. O material foi então desintegrado em um moinho de facas industrial projetado pela Embrapa-Agroindustrial Tropical para esta finalidade, e que separa a fibra, do pó da casca de coco. Após desintegração do material, este foi submetido à secagem ao sol até que a umidade final atingisse 20% (4 dias). As fibras remanescentes foram separadas da casca através de uma peneira de nylon de abertura de 1,5 mm, visando um ajuste granulométrico, de modo a se obter partículas com diâmetros inferiores a 1,5 mm, proporcionando um meio mais homogêneo para o crescimento dos microrganismos, sendo em seguida, armazenado a temperatura ambiente (Figura 5).



Figura 5 - Pó da casca de coco verde.

3.1.2. Deslignificação do pó da casca de coco verde

No processo de deslignificação do pó da casca de coco, foram utilizados 30 g de substrato (matéria-prima lignificada) em 100 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4% (p/v). Esta mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos. Em seguida, o material foi lavado em água corrente até que a água de lavagem atingisse pH próximo da neutralidade

(7,0). O pó da casca de coco deslignificado foi levado à estufa em temperatura ajustada a 60 °C durante cinco horas para secagem (SEGUENKA *et al.*, 2009) (Figura 6).



Figura 6 - Pó da casca de coco verde deslignificado.

3.1.3. Remoção de taninos

Para a remoção deste composto fenólico foram utilizados três tratamentos. O primeiro tratamento consistiu na lavagem do resíduo com água destilada; o segundo tratamento consistiu na lavagem com água destilada, seguido de ultrassom (25 kHz, 150 W) durante vinte minutos e o terceiro consistiu na lavagem com etanol 50% (v/v) seguido de ultrassom durante vinte minutos. Para cada grama de pó da casca de coco utilizou-se 50 mL de etanol 50% ou água destilada. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2. Microrganismos

3.2.1. Isolamento e seleção de linhagens fúngicas produtoras de celulasas

Os fungos produtores de celulasas foram isolados da casca de coco e podem ser visualizados na Figura 7 apresentada abaixo.



Figura 7 - Casca de coco com fungos produtores de celulasas.

As linhagens foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo caldo batata-dextrose e incubadas a 30 °C em agitador orbital a 200 rpm. Após 48 horas, as cepas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar celulose com a seguinte composição: 0,5 g/L de MgSO₄ (sulfato de magnésio); 0,5 g/L de KCl (cloreto de potássio); 3,0 g/L de NaNO₃ (nitrato de sódio); 0,01 g/L de FeSO₄.7H₂O (sulfato de ferro); 1,0 g/L de K₂HPO₄ (fosfato de potássio); 15 g/L de ágar-ágar; 5,0 g/L de celulose microcristalina. As placas foram incubadas a 30 °C por 120 horas (BRAGA *et al.*, 2009). As colônias que apresentaram halo foram selecionadas como produtoras de celulasas. As linhagens isoladas foram caracterizadas de acordo com características macroscópicas e microscópicas das colônias dos fungos, através de microscopia óptica com aumento de 40x a partir de microcultivo entre lâmina e lamínula, utilizando o corante lactofenol de Amann com azul de algodão na montagem deste material (RIVALIER; SEYDEL, 1932).

Os resultados obtidos com as cepas isoladas da casca do coco foram comparados quanto à capacidade de produção de celulasas com linhagens de *Trichoderma polysporum* e *T. viride* isoladas do solo e doadas pela Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE, Brasil); *Aspergillus niger* NRRL 2001 e *T. reesei* NRRL 11460 foram obtidos na forma liofilizada da Coleção de Culturas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*ARS Culture Collection, Peoria, Illinois, USA*). Os microrganismos foram conservados na forma esporulada e mantidos sob refrigeração.

3.2.2. Ativação das linhagens utilizadas para comparação

As linhagens, *T. polysporum*, *T. viride*, *T. reesei* e *A. niger* foram ativadas em meio ágar batata-dextrose (BDA) sendo incubadas por sete dias em estufa incubadora tipo BOD (*Biochemistry Oxygen Demand*) a 30 °C. Os fungos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C, sendo repicados mensalmente. Este procedimento foi repetido a cada 60 dias para garantir a viabilidade das linhagens.

Os esporos de *Trichoderma* e *Aspergillus* foram coletados através da adição de uma solução estéril de *Tween* 80 a 0,01% (v/v) e quantificados em câmara de Neubauer após a devida diluição da densa suspensão obtida. Em seguida, para a obtenção da cultura estoque de *Trichoderma* foi inoculada uma quantidade igual a 1×10^6 esporos/mL em meio de cultura

contendo 3 g de trigo e 2 mL de água destilada (autoclavados por 15 minutos a 121 °C), sendo mantida sob refrigeração a 4 °C. Para a obtenção da cultura estoque de *Aspergillus* foram inoculados 1×10^6 esporos/mL em solo estéril e mantido congelado a - 18 °C. Esta técnica permite a estocagem de linhagens de *Aspergillus* sem perda de estabilidade por até dez anos (COURI; FARIAS, 1995).

3.3. Composição dos meios de cultura para a produção de celulases

3.3.1. Fermentação submersa

Para a produção enzimática foi empregado o meio de cultura de Mandels e Weber (1969) como pré-inóculo. Este foi constituído de 30 g/L de $C_6H_{12}O_6$ (glucose); 15 g/L de KH_2PO_4 (fosfato de potássio); 5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ (sulfato de amônio); 1,23 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio); 0,00271 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de ferro); 0,0016 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (sulfato de manganês); 0,0014 g/L de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (sulfato de zinco); 0,0036 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (cloreto de cobalto) e 0,8 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (cloreto de cálcio). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Vale ressaltar que a composição do meio de cultura, para a produção de celulases, foi a mesma correspondente ao meio do pré-inóculo, sendo suplementado com 15 g/L de pó da casca de coco verde como substrato indutor, sem adição de glucose e autoclavado a 121 °C por 5 minutos.

O ensaio para a produção de celulases seguiu a metodologia de Domingues *et al.* (2000), onde foram inoculados 50 µL de uma suspensão de esporos contendo 1×10^7 esporos/mL no meio de pré-inóculo, sendo incubado por 48 horas sob agitação em agitador orbital (200 rpm) a 30 °C. O meio para produção de celulases foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo ativado (KADAM; KEUTZER, 1995). A fermentação foi conduzida por um período de 120 horas a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm, sendo realizadas amostragens nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas para determinação da atividade enzimática.

3.3.2. Fermentação semi-sólida

O meio de cultivo foi constituído de 1,5 g de pó da casca de coco verde e 1,5 g de trigo adicionados de 3,5 mL de uma solução salina, com a seguinte composição: 9 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1 g/L de KH_2PO_4 . O meio foi autoclavado a 121°C por 5 minutos, sendo inoculado com uma suspensão de esporos contendo 1×10^6 esporos/mL (COELHO *et al.*, 2001). A fermentação foi conduzida por um período de 120 horas em estufa tipo BOD a 30 °C, sendo realizadas amostragens nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas para determinação da atividade enzimática.

Visando verificar a influência da flora microbiana natural da casca do coco verde, na produção de enzimas, também foram conduzidos experimentos com o substrato não autoclavado.

3.4. Métodos de extrações da enzima do meio sólido

Foram testadas duas condições de extração da enzima, com e sem agitação. As extrações foram realizadas pela adição de tampão acetato de sódio (200 mM), pH 5,5 ao meio semi-sólido. O meio foi submetido à agitação em agitador orbital a 160 rpm e temperatura de 30 °C por 30 minutos (COELHO *et al.*, 2001). A seguir, procedeu-se a filtração em papel de filtro *Whatman* n° 1 no intuito de separar o resíduo da fermentação, do sobrenadante (extrato enzimático). A cinética de produção enzimática foi acompanhada por um período de 120 horas em estufa tipo BOD a 30 °C, sendo realizadas amostragens nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas para determinação da atividade enzimática.

3.5. Determinação da atividade enzimática de celulase total

A atividade enzimática foi determinada através da incubação do extrato enzimático bruto livre de células com solução de celulose microcristalina (Avicel®) como substrato. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 200 mM com pH e temperatura variados de acordo com um planejamento experimental. Foram adicionados 125 µL do extrato

enzimático a 125 µL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado ao valor desejado, conforme planejamento fatorial, contendo 1% (m/v) de celulose microcristalina (Avicel, Fluka). A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura do ensaio (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Foram realizados diversos planejamentos fatoriais para a otimização das condições ótimas de pH e temperatura para a determinação da atividade enzimática de cada uma das linhagens estudadas, conforme descrito no item 3.7.

A atividade enzimática foi quantificada através da determinação da concentração de açúcares redutores (AR) de acordo com o método do DNS (MILLER, 1959). Segundo esse método, os AR liberados durante a hidrólise do substrato (Avicel) pelo extrato enzimático, reduzem o DNS, gerando complexos de coloração marrom-alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540 nm. A construção de uma curva-padrão com glucose permite associar a absorbância à concentração dos produtos da reação de hidrólise (RIBEIRO, 1997). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (BINOD *et al.*, 2007).

3.6 Seleção da linhagem com maior atividade celulolítica total

Após a seleção do melhor método de fermentação, para a produção de enzimas celulolíticas, foi realizado um *screening* para a produção de celulasas pelas linhagens isoladas da casca do coco.

O critério de seleção da melhor linhagem produtora de celulasas foi baseado na quantificação da atividade enzimática obtida a partir dos diferentes métodos de fermentação utilizados (fermentação semi-sólida e submersa).

3.7 Otimização da temperatura e pH da atividade enzimática de celulases

Em processos fermentativos, onde cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais.

Os experimentos de fermentação em meio semi-sólido foram realizados utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 . O período estabelecido de ensaio foi de 24 horas, uma vez que o cultivo por tempos superiores a 24 horas resultou em esporulação dos fungos e perda da atividade enzimática. O planejamento experimental foi realizado com o intuito de se estabelecer as condições mais adequadas à síntese da enzima celulase pelos microrganismos estudados em meio contendo pó da casca de coco verde como substrato.

O pH e a temperatura ótima de determinação da atividade das enzimas produzidas pela linhagem selecionada, identificada neste trabalho como CZ01, foram determinadas através da metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). O pH da solução de atividade e da solução-tampão de extração variou na faixa de 4,3 a 5,7 e a temperatura na faixa de 35,8 °C a 64,1 °C. As determinações das atividades enzimáticas foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.

Para a linhagem CZ01, o estudo das condições ótimas de pH e temperatura foi realizado através de um planejamento experimental 2^2 composto central rotacional com três pontos centrais (RODRIGUES; IEMMA, 2005), onde foram realizados 11 ensaios conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Ensaio do planejamento fatorial (2²)

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	4,5 (-1)	40,0 (-1)
2	4,5 (-1)	60,0 (+1)
3	5,5 (+1)	40,0 (-1)
4	5,5 (+1)	60,0 (+1)
5	4,3 (- α)	50,0 (0)
6	5,7 (+ α)	50,0 (0)
7	5,0 (0)	35,8 (- α)
8	5,0 (0)	64,1 (+ α)
9*	5,0 (0)	50,0 (0)
10*	5,0 (0)	50,0 (0)
11*	5,0 (0)	50,0 (0)

*Ponto central.

Além desse planejamento fatorial 2², foi feito um experimento unifatorial com a linhagem CZ01, para a determinação do melhor pH para a atividade de celulasas. O pH foi variado na faixa de 4,5 a 8,5 uma vez que sua elevação apresentou efeito positivo e significativo na atividade enzimática e a temperatura foi mantida em 60 °C, pois a mesma não apresentou efeito significativo.

Para as linhagens de *Trichoderma* e *Aspergillus*, os parâmetros de pH e temperatura também foram avaliados para a otimização da determinação da atividade de celulasas. O pH e a temperatura ótima da enzima produzida pelas linhagens *T. polysporum* e *A. niger* foram determinados também através da metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). A metodologia experimental é detalhada nos anexos 1 e 3, respectivamente. Os valores de pH variaram na faixa de 4,5 a 5,5 e a temperatura na faixa de 40 °C a 60 °C.

Para a linhagem *T. viride* foi feito um estudo de comparação com outras linhagens de *Trichoderma* utilizando o pó da casca de coco verde como substrato para produção de celulasas, conforme apresentado no anexo 2.

3.8 Otimização da composição do meio de cultura para a produção de celulases

Alguns microrganismos produzem uma quantidade baixa de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura otimizado é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático.

Por isso, esta etapa visou estabelecer a melhor proporção de substrato utilizado para a produção da enzima celulase. Um estudo variando a quantidade de pó da casca de coco verde e fixando a quantidade de trigo em 1,5 g foi realizado para determinar a melhor composição do meio de cultura para a determinação da atividade enzimática (Tabela 4). Para o cálculo das quantidades de solução salina foi multiplicado o total de sólido por 1,16, que é o fator correspondente da composição de pó da casca de coco e trigo utilizado em ensaios anteriores, ou seja, utilizava-se 3,0 g de sólido no total e 3,5 mL de solução salina, portanto com a razão de $3,5/3,0 = 1,16$.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura para a produção de celulases

Pó da casca de coco verde (g)	Trigo (g)	Solução salina (mL)
0,5	1,5	2,32
1,0	1,5	2,90
1,5	1,5	3,48
2,0	1,5	4,06
2,5	1,5	4,64
3,0	1,5	5,22

3.9 Determinação da atividade enzimática

O termo atividade específica é utilizado aqui como atividade do extrato enzimático utilizando-se substratos específicos em substituição ao avicel. Uma vez encontrada a condição ótima de fermentação para a linhagem selecionada (CZ01), a atividade enzimática específica foi determinada através da medida da concentração de açúcares redutores obtidos da hidrólise enzimática de substratos como xilana de carvalho, carboximetil celulose (CMCase) e celobiose. O ensaio foi realizado nas condições otimizadas de pH, temperatura e composição

de meio de cultura. A atividade enzimática foi quantificada pela liberação de açúcares redutores determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio. A fermentação foi conduzida por 24 horas em estufa tipo BOD a 30 °C. A determinação da atividade específica foi realizada a 60 °C em pH 6,5 (condições ótimas para determinação de atividade celulolítica do extrato enzimático obtido com a linhagem CZ01 utilizando-se celulose microcristalina como substrato).

3.9.1 Xilanase

A atividade xilanase foi determinada conforme metodologia de Biely (1993). Foram adicionados 125 μL do extrato enzimático a 125 μL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado a 6,5 contendo 1% (m/v) de xilana de carvalho (Fluka) como substrato. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura de 60 °C (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 μL do reagente DNS. A atividade enzimática foi então determinada conforme descrito no item 3.5.

3.9.2 Carboximetil celulase (CMCase)

Para a atividade de CMCase foram adicionados 125 μL do extrato enzimático a 125 μL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado a 6,5 contendo 1% (m/v) de carboximetil celulose (Sigma) como substrato. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura de 60 °C (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 μL do reagente (DNS). A atividade enzimática foi então determinada conforme descrito no item 3.5.

3.9.3 Celobiase

Para a atividade de celobiase foram adicionados 125 μL do extrato enzimático a 125 μL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado a 6,5, contendo 1% (m/v) de celobiose (Fluka) como substrato. A mistura foi incubada por 1 hora à

temperatura de 60 °C (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). A atividade enzimática foi então determinada conforme descrito no item 3.5.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 90% de confiança, utilizando o programa Statistica versão 7.0 (Statsoft), sendo os resultados expressos como médias \pm desvio padrão.

Foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, para a comparação entre as médias. O gráfico comparativo foi elaborado por meio do programa OriginPro versão 8.0 (OriginLab).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e seleção de linhagens fúngicas produtoras de celulases

Foram isolados três fungos morfologicamente distintos a partir da casca do coco (CZ01, C02 e CD03 - Figura 8). Todos se mostraram capazes de degradar a celulose como única fonte de carbono. Contudo, apenas dois fungos, os que apresentaram os melhores resultados de atividade celulolítica (CZ01 e CD03) foram selecionados para os ensaios posteriores.

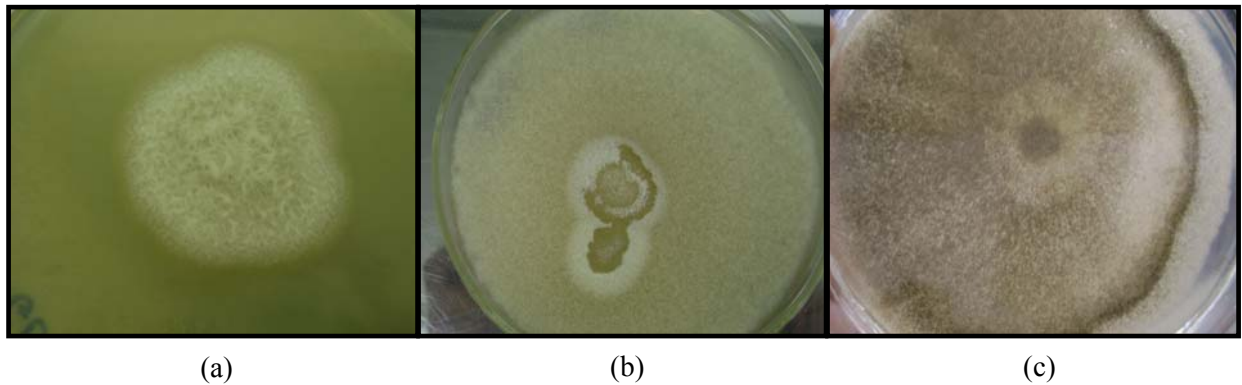


Figura 8 - Imagens macroscópicas das linhagens isoladas da casca de coco: (a) CZ01; (b) C02 e (c) CD03.

As linhagens CZ01 e CD03 foram caracterizadas como pertencentes às classes Zigomicetos e Deuteromicetos, respectivamente (Figura 9).

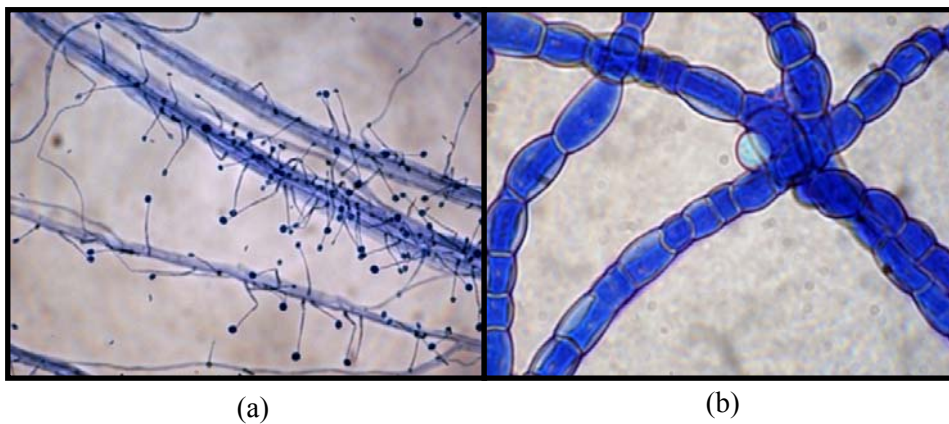


Figura 9 - Imagens microscópicas das lâminas de microcultivo, utilizando a objetiva de 40x, das linhagens selecionadas da casca de coco: (a) CZ01 e (b) CD03.

4.2 Deslignificação da casca de coco verde

A Tabela 5 apresenta os resultados de atividade enzimática de celulases utilizando a casca de coco verde com e sem tratamento de deslignificação. De modo geral, tratamentos alcalinos aos quais os resíduos são submetidos, propiciam um efeito positivo na indução à síntese das diferentes frações celulolíticas. Entretanto, neste trabalho, não houve diferença significativa de acordo com o teste de Tukey entre os resultados obtidos para a linhagem CZ01, quando se utilizou a casca de coco verde lignificada e deslignificada como substrato para a produção de celulases. Melhores resultados foram obtidos com a casca de coco verde lignificada para a atividade celulolítica da linhagem CD03, como pode ser observado na Tabela 5. Possivelmente a lignina presente no resíduo não dificultou a indução da atividade da enzima produzida pelo microrganismo CD03.

Em um estudo realizado por Aguiar e Menezes (2000) para a produção de endoglucanases em bagaço de cana, foi observado que o bagaço sem tratamento de deslignificação apresentou níveis de produção enzimática para endoglucanases semelhantes aos bagaços tratados com hidróxido de sódio a 4% e vapor, como também foi observado neste trabalho para o microrganismo CZ01.

Tabela 5 - Resultados de atividade enzimática (UI/gds) obtidos a partir da fermentação da casca de coco verde com e sem tratamento de deslignificação

Microrganismo	Casca de coco lignificada	Casca de coco deslignificada
CZ01	1,26 ± 0,09 ^a	1,24 ± 0,10 ^a
CD03	0,42 ± 0,05 ^b	0,24 ± 0,02 ^c

Em uma mesma linha, médias com letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Como a deslignificação é uma etapa a mais no processamento da matéria-prima, em nível industrial não seria interessante, pois além de ser um processo oneroso e de baixo rendimento, há gasto de energia e tempo. Desta forma, optou-se por usar a casca de coco verde lignificada, pois os resultados de atividade enzimática de CZ01 e CD03 foram melhores em relação à casca de coco deslignificada, mostrando que o processo de deslignificação diminui a atividade enzimática.

4.3 Remoção de taninos da casca de coco verde

Os resultados obtidos para o pó da casca de coco verde submetido aos tratamentos de remoção de taninos, não propiciaram um bom crescimento micelial dos microrganismos CZ01 e CD03 no meio de fermentação, portanto, não foi dado prosseguimento aos ensaios de determinação da atividade enzimática.

Como o tratamento da matéria-prima com etanol não propiciou um bom crescimento, deduz-se que alguma reação entre o pó da casca de coco verde e o etanol residual podem ter inibido o crescimento dos microrganismos, comprometendo o metabolismo dos fungos.

4.4 Métodos de cultivo para a produção de celulases

Na avaliação do método de cultivo para a produção de celulases houve diferença significativa entre as médias de atividade enzimática de CZ01 e CD03 para a fermentação semi-sólida (FSS) (em 24 horas de fermentação) e fermentação submersa (FS) (em 120 horas de fermentação), de acordo com o teste de Tukey. Para ambos os microrganismos, o melhor método de cultivo para a produção de celulases foi a FSS (Figura 10). Vale ressaltar que a atividade enzimática máxima em FSS ocorreu no período de 24 horas, o que corresponde ao tempo de produção industrial corrente.

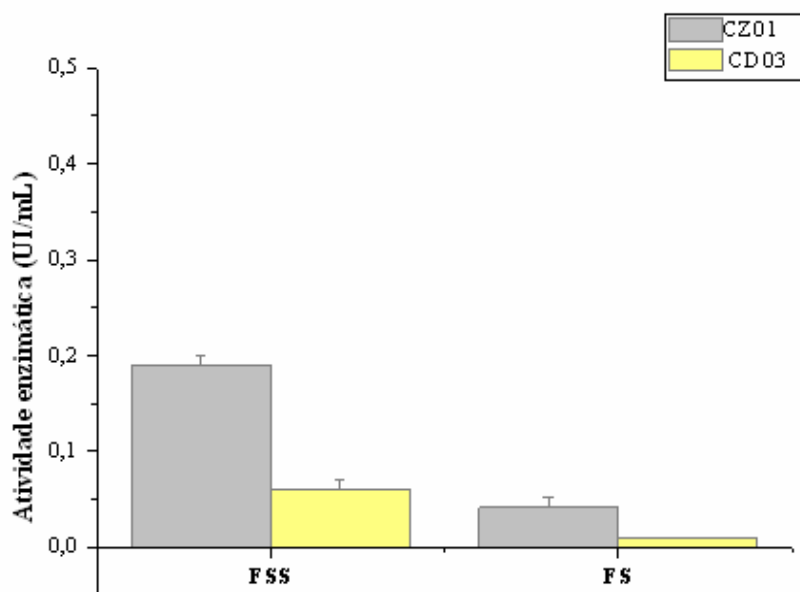


Figura 10 - Avaliação do método de cultivo para a produção de celulases por fermentação semi-sólida (FSS) e fermentação submersa (FS).

Em ambos os sistemas de fermentação foi necessária a esterilização do substrato, uma vez que a flora microbiana natural do resíduo interferiu na atividade enzimática dos microrganismos. A possibilidade de se conduzir o processo utilizando o substrato sem prévia esterilização pode representar redução de custos. Entretanto, o controle microbiológico do processo é prejudicado, bem como a qualidade do produto final, uma vez que não se pode garantir o desenvolvimento da mesma linhagem fúngica a cada batelada.

Neste estudo foram encontrados valores de atividade enzimática de $0,18 \pm 0,09$ UI/mL e $0,06 \pm 0,05$ UI/mL para as linhagens CZ01 e CD03, respectivamente, em FSS utilizando o pó da casca de coco verde como substrato indutor. Os resultados para CZ01 e CD03 convertidos para (g) equivalem a $1,26 \pm 0,09$ UI/gds e $0,42 \pm 0,05$ UI/gds, respectivamente. Portanto, a linhagem CZ01 mostrou que seu potencial de hidrólise a partir de resíduos lignocelulolíticos é bem superior em relação à linhagem CD03.

Os resultados das FSS foram bem superiores quando comparados com os resultados da FS, isso pode ser explicado porque em FSS o volume de líquido no reator é bem menor quando comparado com a FS, facilitando a recuperação do produto final, deixando-o mais concentrado e o meio de fermentação semi-sólido reproduz o *habitat* natural dos fungos filamentosos, de modo que esses microrganismos são capazes de crescer satisfatoriamente em substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzimas, como por exemplo, as celulases (SILVA *et al.*, 2005).

Menezes e Hennies (1994) obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total de *Aspergillus niger*, quando utilizaram bagaço de cana em fermentação submersa. Após quinze dias de incubação de *Pleurotus sajor caju*, níveis de atividade de celulases total igual a 0,6 UI/g foram observados por Bisaria, Madan e Vasudevan (1997) na fermentação semi-sólida usando palha de arroz como substrato. Por outro lado, atividade enzimática de 0,4 UI/mL de celulase total foi obtida por *Aspergillus fumigatus* cultivado sobre resíduos de grama (LATIF; RAJOKA; MALIK, 1997). No trabalho de Lopes (2008), o valor de celulases de 0,042 UI foi obtido em 72 horas de fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Os resultados de diferentes métodos de extrações da enzima mostraram que sob agitação de 160 rpm e temperatura de 30 °C por 30 minutos, foi a metodologia que

apresentou melhores resultados de recuperação do extrato enzimático do meio sólido, para ambos os microrganismos (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de atividade enzimática (UI/gds) obtidos em diferentes métodos de extração da enzima

Microrganismos	Com agitação	Sem agitação
CZ01	1,26 ± 0,09 ^a	0,23 ± 0,09 ^b
CD03	0,42 ± 0,05 ^c	0,17 ± 0,02 ^d

Em uma mesma linha, médias com letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

A agitação mecânica empregada nos processos hidrolíticos tende a incrementar a atividade das enzimas, uma vez que promove uma maior interação enzima-substrato, além de reduzir as resistências difusionais presentes no meio reacional. No entanto, a partir de um determinado “valor crítico”, a agitação mecânica tende a incrementar o deslocamento tangencial das enzimas, bem como incorporar tensões de cisalhamento ao meio, resultando em perda de atividade enzimática, além de menor contato entre enzima e substrato (JORGENSEN; BACH; JENSEN, 2005).

Portanto, faz-se necessário, em estudos futuros, a realização de ensaios para a otimização do tempo e velocidade de agitação, pois os resultados de extração da enzima do meio sólido com agitação foram mais promissores em relação à extração da enzima sem agitação.

4.5 Seleção da linhagem com maior atividade celulolítica total

Os estudos realizados permitiram selecionar a linhagem CZ01 como melhor produtora de enzimas celulolíticas dentre as linhagens isoladas a partir da casca do coco, devido aos melhores resultados de atividade enzimática de celulasas obtidos, quando comparados com as linhagens *T. polysporum* com uma atividade enzimática de 0,47 UI/gds; *T. viride* com 0,64 UI/gds e *A. niger* com 0,31 UI/gds, conforme apresentado nos anexos 1, 2 e 3, respectivamente. Ensaio de otimização de temperatura, pH e composição de meio de cultura foram realizados visando maximizar a atividade da enzima produzida pela linhagem CZ01.

4.6 Otimização da temperatura e pH para determinação da atividade da linhagem selecionada

A Tabela 7 apresenta o planejamento experimental e os resultados obtidos de atividade celulolítica do extrato enzimático produzido pela linhagem CZ01 por fermentação semi-sólida, em função da temperatura e do pH de realização do ensaio de atividade enzimática.

Tabela 7 - Planejamento fatorial (2^2) e resultados obtidos de atividade enzimática de celulasas produzida pelo isolado CZ01

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (UI/gds)
1	4,5 (-1)	40,0 (-1)	0,11 ± 0,09
2	4,5 (-1)	60,0 (+1)	0,31 ± 0,10
3	5,5 (+1)	40,0 (-1)	0,55 ± 0,11
4	5,5 (+1)	60,0 (+1)	1,06 ± 0,01
5	4,3 (- α)	50,0 (0)	0,00 ± 0,00
6	5,7 (+ α)	50,0 (0)	0,77 ± 0,07
7	5,0 (0)	35,8 (- α)	0,00 ± 0,01
8	5,0 (0)	64,1 (+ α)	0,00 ± 0,02
9*	5,0 (0)	50,0 (0)	0,00 ± 0,08
10*	5,0 (0)	50,0 (0)	0,00 ± 0,08
11*	5,0 (0)	50,0 (0)	0,00 ± 0,01

* Ponto central.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido para a atividade enzimática é apresentada na Tabela 8. De acordo com a tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática (UI/gds) foi de 5,0, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (3,45) no intervalo de 90% de confiança (Tabela 8). Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste F .

Tabela 8 - Análise de variância para a atividade enzimática (UI/gds)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	1,14	5	0,23	5,0
Residual	0,28	5	0,05	
Total	1,42	10		
Coefficiente de determinação	0,80			
F tabelado (90%)				$F_{5,5} = 3,45$

Os resultados da atividade enzimática de CZ01 apresentados na Tabela 7 foram analisados através do gráfico de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft) (Figura 11).

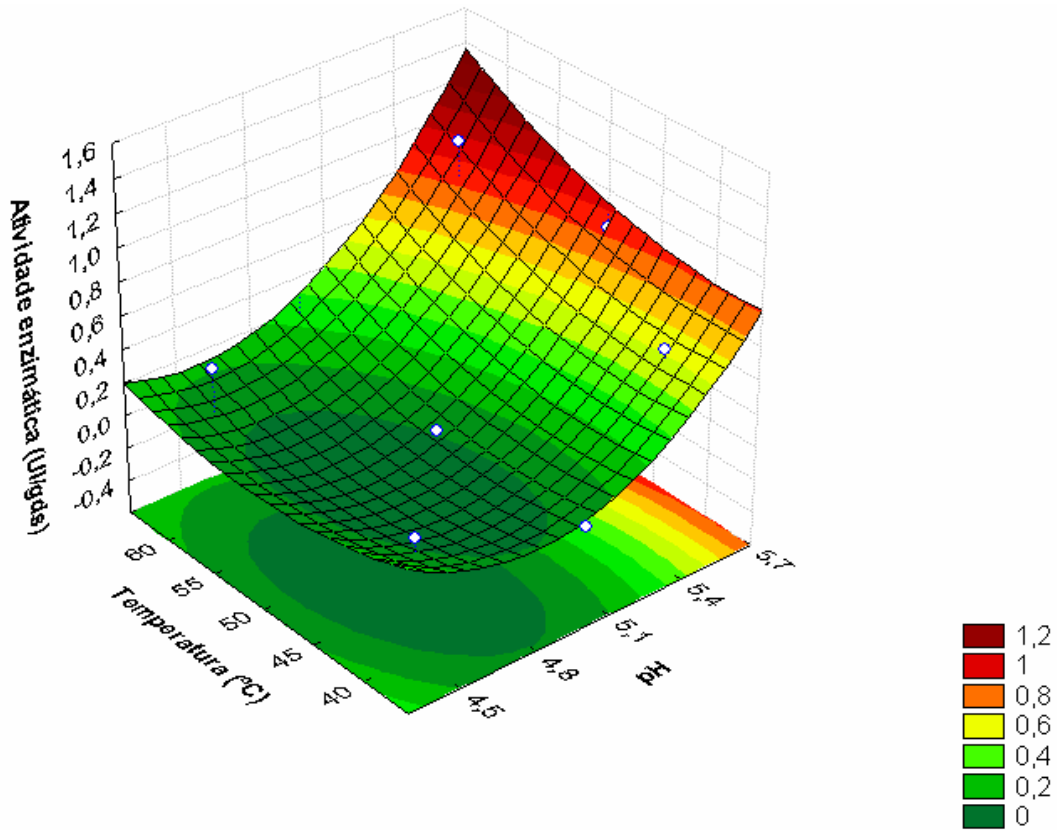


Figura 11 - Superfície de resposta para a otimização da determinação da atividade enzimática.

Os resultados obtidos com os testes de variação de pH e temperatura foram submetidos à análise estatística com 2 níveis e 2 fatores onde estes foram plotados em gráfico de superfície de resposta (Figura 11) com $p < 0,1$ (confiabilidade de 90%). A partir dos coeficientes de regressão ajustados, foi construído o modelo estatístico que relaciona a atividade enzimática de celulasas com os fatores pH e temperatura (variáveis codificadas), conforme observado na Equação 1:

$$\text{Atividade enzimática (UI/gds)} = 27,04 - 10,03\text{pH} + 0,98\text{pH}^2 - 0,14\text{T} + 0,0007\text{T}^2 + 0,01\text{pH}*\text{T} + 0 \quad (1)$$

Onde:

pH: pH da solução de atividade

T: temperatura do ensaio

Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se temperatura de 60 °C. A maior produção de celulases foi observada com pH 5,5, sendo que com a diminuição do pH houve queda bastante significativa na produção de celulases. Os resultados mostram que, variações nos valores de temperatura não apresentaram efeito significativo para a produção de celulases utilizando o pó da casca de coco verde como substrato em FSS, já o pH demonstrou ser um parâmetro importante. Esse efeito foi comprovado pela análise do Diagrama de Pareto (Figura 12), onde apenas o pH aparece acima da linha de significância.

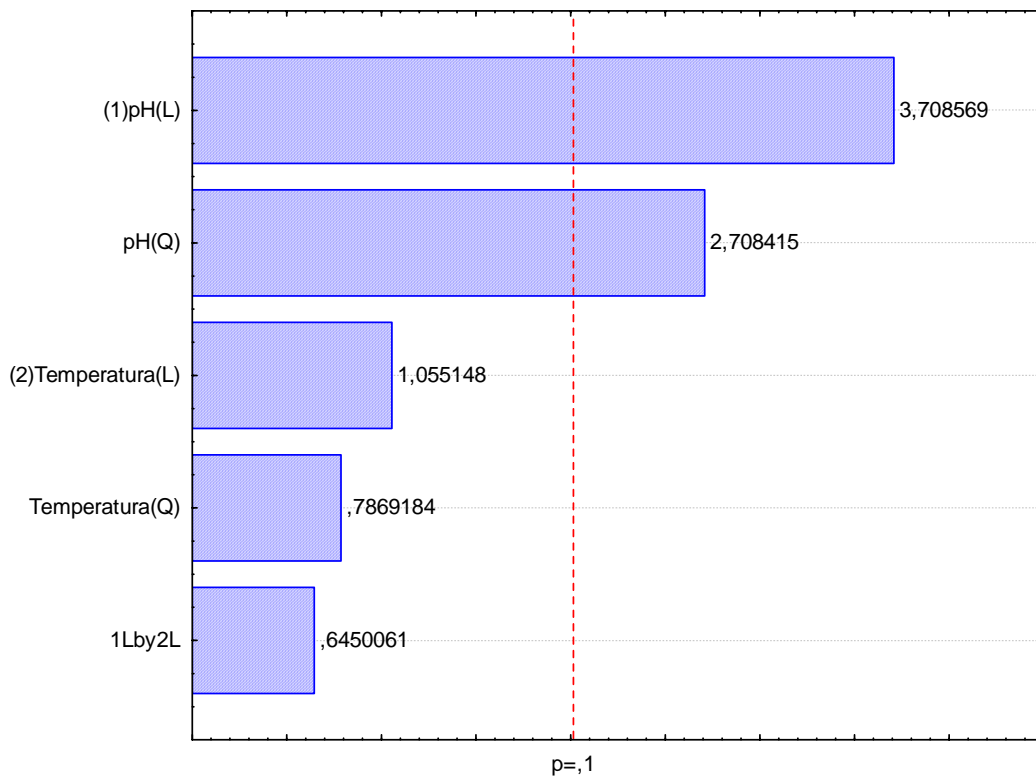


Figura 12 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável.

O Diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possuem sobre a atividade de celulases, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise estatística (90%).

Cabe destacar que o fator correspondente ao efeito linear e quadrático da variável [(1) pH] mostrou significância estatística. A variável temperatura [(2) T], bem como sua interação com a variável pH (1 by 2) não apresentaram significância estatística, embora a superfície de resposta aponte para maiores valores de atividade em temperaturas elevadas.

O comportamento da enzima é promissor uma vez que as celulases obtidas do *T. polysporum* e *A. niger* NRRL 2001 apresentaram atividade ótima na faixa de pH 5,5 e temperatura em torno de 40 °C, como pode ser observado nos anexos (OLIVEIRA *et al.*, 2009a; OLIVEIRA *et al.*, 2009b; OLIVEIRA *et al.*, 2009c). Johnson *et al.* (1982) mencionaram que a atividade máxima de celulases produzida por *Clostridium thermocellum* foi alcançada a temperatura de 70 °C e pH variando na faixa de 5,7 a 6,1.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que a linhagem CZ01 é boa produtora de celulases, pois cresceu facilmente em substrato semi-sólido, além de apresentar elevadas concentrações no extrato enzimático bruto, quando comparado com outros produtores enzimáticos, incluindo uma linhagem patenteada de *T. reesei* Rut C-30 (NRRL 11460), utilizando o mesmo substrato indutor (Ver anexo 4). Com o intuito de maximizar a produção da enzima e acrescentar novas e melhores condições para a produção de celulases utilizando o pó da casca de coco verde, partiu-se para o estudo da produção de celulases com o microrganismo CZ01. Os resultados do efeito do pH para a atividade enzimática de celulases podem ser observados na Figura 13.

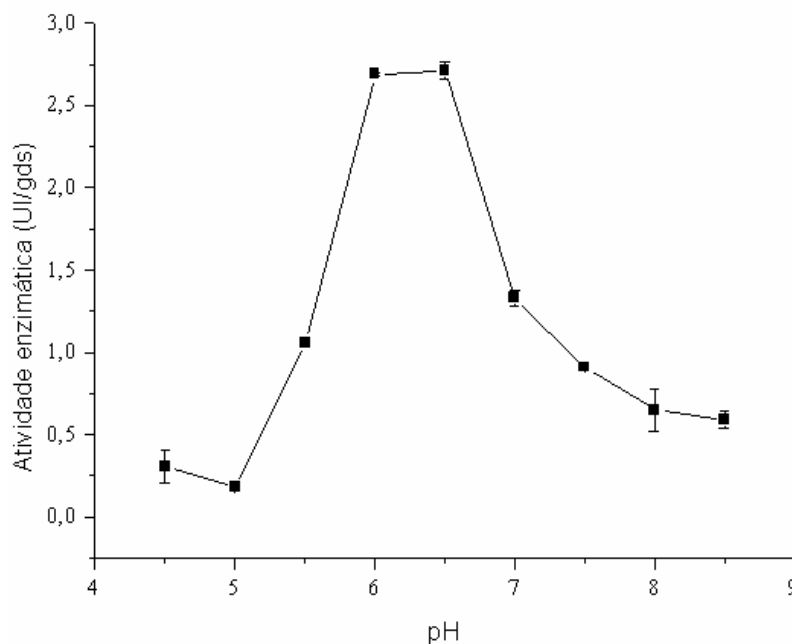


Figura 13 - Efeito do pH na hidrólise enzimática de celulose para a linhagem CZ01 a 60 °C.

Observa-se na Figura 13 que a máxima atividade enzimática de celulases está na faixa compreendida entre pH 6,0 e 6,5. Em pH abaixo de 6,0 e acima de 6,5 a atividade enzimática de celulases decresce visivelmente. Esse resultado é muito promissor, uma vez que, celulases obtidas em pH próximo da neutralidade favorecem o processo industrial, pois além de evitar a corrosão nas tubulações, já que o pH não é ácido, os efluentes provenientes das indústrias não precisam de onerosos tratamentos de correção de pH.

Vale ressaltar também que a grande maioria das celulases reportadas na literatura científica são obtidas em condições de pH ácido. No estudo realizado por Aguiar *et al.* (2008), a máxima produção de celulases a partir de resíduos lignocelulósicos utilizando *Aspergillus niger*, foi obtida em pH 5,0 e temperatura de 50 °C.

No trabalho de Fonteles *et al.* (2009), constatou-se através da análise de superfície de resposta condições ótimas para a atividade enzimática, que foram determinadas em pH 5,7 e temperatura de 61 °C. Nessas condições otimizadas a atividade enzimática máxima foi de $0,46 \pm 0,02$ UI/gds (FONTELES *et al.*, 2009). De acordo com Wen *et al.* (2005) uma máxima atividade enzimática de celulase de 1,74 UI/mL foi produzida por linhagens de *Trichoderma reesei* RUT-C30, utilizando adubo leiteiro como substrato, os efeitos de pH e temperatura na produção de celulases apresentaram valores ótimos em 25,5 °C e pH 5,7.

4.7 Otimização da composição do meio de cultura para a produção de celulases

Pode-se observar que a relação 1,5:1,5 entre pó da casca de coco verde e trigo, pH 6,5 e temperatura de 60 °C levou à obtenção da máxima atividade da enzima celulase ($2,46 \pm 0,07$ UI/gds), dentro do intervalo avaliado para a linhagem CZ01 (Figura 14). Esse resultado deixa evidente a influência da composição do meio de cultivo, na eficiência do processo.

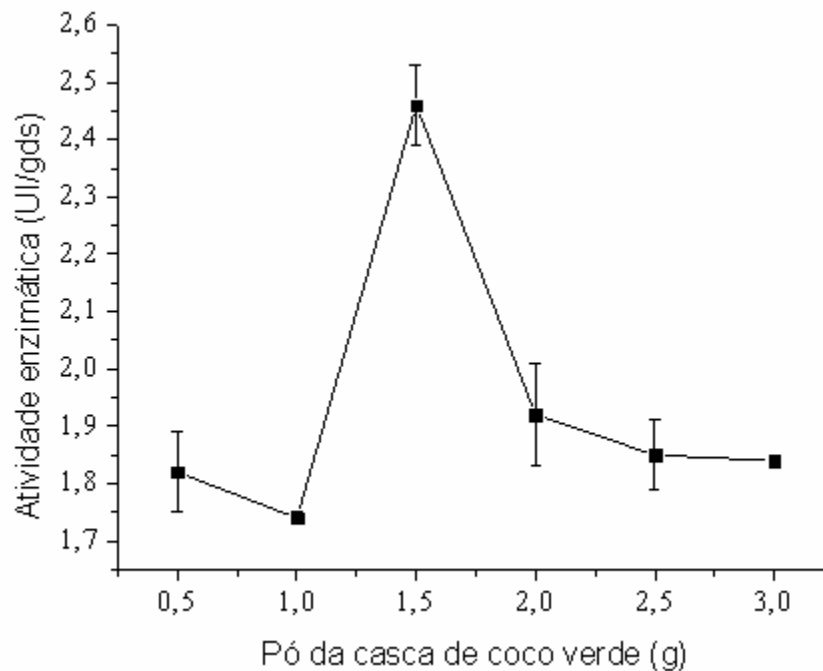


Figura 14 - Efeito da quantidade de pó da casca de coco verde como substrato na atividade enzimática de celulases, utilizando uma quantidade fixa de trigo de 1,5 g.

O farelo de trigo apresenta maior capacidade de retenção de água comparado aos compostos celulósicos, logo, sua utilização na composição do meio de cultura conferiu maior retenção da água e melhor difusão do oxigênio no meio. Além disso, o farelo de trigo permitiu um melhor desenvolvimento do fungo uma vez que aumentou os espaços entre as fibras da casca de coco verde, permitindo um crescimento homogêneo do microrganismo no meio de cultura com conseqüente melhor utilização do substrato pelo mesmo.

A atividade de celulase obtida com a linhagem CZ01 mostrou-se satisfatória quando comparada à apresentada por Fonteles *et al.* (2008) (1,41 UI/gds), tendo como agente de fermentação a linhagem *T. polysporum*, empregando bagaço do pedúnculo de caju como substrato em fermentação semi-sólida. Esses resultados confirmam o potencial da linhagem CZ01 em produzir enzimas em escala industrial, pois os valores de atividade enzimática estão acima dos encontrados por outros autores, conforme descrito na literatura.

É importante ressaltar que a comparação de dados entre diferentes processos deve ser feita levando-se em consideração que, nos cultivos em meio sólido, a obtenção de diferentes níveis de eficiência, em relação à formação do produto desejado, depende, no conjunto de

fatores que influenciam os cultivos em estado sólido, do substrato e da espécie microbiana utilizados, dentre outros parâmetros, como pH e temperatura.

Por outro lado, a diminuição da atividade celulase, com o aumento da concentração de pó da casca de coco verde (Figura 13) pode ser um indicativo de que este resíduo agiu como inibidor da síntese da enzima, ou seja, pode ter ocorrido inibição pelo substrato ou por algum componente da casca de coco ou pode também ter ocorrido um problema de aeração, uma vez que uma grande quantidade de pó aglomera com pouco trigo.

4.8 Determinação da atividade enzimática específica

Com relação à atividade celulolítica específica, os maiores valores foram encontrados quando utilizou-se como substrato na determinação da atividade enzimática a xilana de carvalho e a CMCase com médias de atividade enzimática de $2,86 \pm 0,18$ e $2,80 \pm 0,14$ UI/gds, respectivamente (Figura 15). Já para a celobiose a atividade enzimática não foi detectada, sendo necessário um estudo mais detalhado das condições de fermentação e de inibição.

A linhagem CZ01 demonstrou capacidade para produzir as frações celulolíticas e xilanase. Enquanto que nestas mesmas condições não foi detectada atividade de celobiase para a mesma linhagem. Ensaio posteriores poderão ser feitos em condições diferentes de pH, temperatura e composição do meio de cultura, com a finalidade que a atividade enzimática de celobiase possa ser detectada. A verificação da concentração de celobiase no extrato enzimático e na solução de atividade também será alvo de estudos futuros. O fungo foi capaz de produzir o complexo celulolítico e xilanolítico a partir de pó da casca de coco verde, fonte de carbono abundante e barata no Brasil. Na Figura 14 são apresentados os resultados para os substratos específicos utilizando complexo celulolítico do extrato bruto da fermentação.

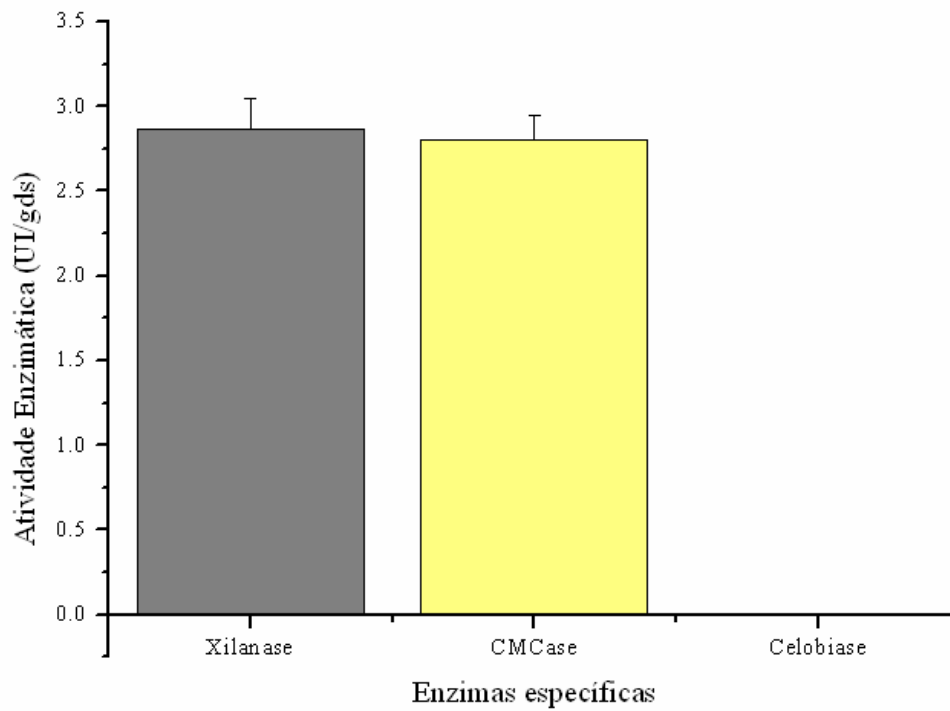


Figura 15 - Atividade específica de xilanase, carboximetil celulase e celobiase.

No estudo realizado por Fonteles *et al.* (2009), com relação à atividade celulolítica específica de *T. polysporum*, foram encontradas para as enzimas xilanase e celobiase médias de atividade de 0,55 UI/gds e 0,41 UI/gds, respectivamente. Para a CMCase a atividade enzimática foi extremamente baixa ($0,03 \pm 0,03$ UI/gds). Entretanto, os autores utilizaram como substrato o bagaço do pedúnculo do caju, que possui composição diferente da casca do coco verde.

CONCLUSÕES

O resíduo da casca de coco verde se revelou como um ótimo substrato indutor no processo de produção de celulases. A produção de celulases a partir deste resíduo pode representar, em nível industrial, um processo importante no aproveitamento de resíduos agroindustriais, com vasta aplicação na indústria alimentícia.

A linhagem selecionada e isolada da casca do coco (CZ01) apresentou boa atividade enzimática quando comparada com resultados obtidos por outras linhagens reportadas na literatura científica, tratando-se, portanto, de uma linhagem bastante promissora. Verificou-se que as condições de máxima atividade enzimática de celulases foram em temperatura de 60 °C, pH na faixa de 6,0 a 6,5 e composição de meio de cultura de 1:1 de pó da casca de coco e trigo.

A identificação da linhagem, otimização da fermentação submersa, utilização de outros substratos tais como o bagaço de cana-de-açúcar, bem como a caracterização da enzima são objetos de trabalhos futuros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Ceppa**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- AGUIAR, C. M.; MARGONAR, M. H. L.; LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos. In: Encontro de Química da Região Sul, 16., 2008, Blumenau. **Anais...** Blumenau, 2008.
- ALVES, M. H. *et al.*; Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 2, 1990.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 350 p.
- BARROSO, T. **Tecnologia para o aproveitamento da casca de coco verde é mostrada na Amazontech 2004**. EMBRAPA. Fortaleza, 2009. Disponível em <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 20 set. 2009.
- BERNER, R. A. The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. **Nature**, v. 426, p. 323-326, 2003.
- BIELY, P. (1993). Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In Hemicellulose and hemicellulases ed. Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. p. 29-51. London: Portland Press, M. E., Pérez, R., Huitrón, C. β -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp* CHM - 1035. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.
- BINOD, P. *et al.* Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2742-2748, 2007.
- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 58, 1997.

BRAGA, R. M. *et al.* Avaliação da produção de celulase por cepas de *Fusarium*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009, Natal. **Anais...** Natal, 2009.

BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 832-838, 2010.

CAMACHO, N. A.; AGUIAR, O. G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp and its application in bakery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.

CASTRO, A. M. *et al.* Produção e caracterização das celulases de *Aspergillus niger* obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2007.

COELHO, M. A. Z. *et al.* Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim Ceppa**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69 (supl.), p.1-306, 2002.

CORREIA, D. *et al.* Uso do pó da casca de coco na formulação de substratos para formação de mudas enxertadas de cajueiro anão precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 557-558, 2003.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

_____. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, 2006.

CUNHA, R. T. **Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis**. Rio de Janeiro, 1999. p. 122. Monografia, Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ, 1999.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB M.; WU, J. H. D. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-154, 2005.

DOMINGUES, F. C. *et al.* The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 394-401, 2000.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - Aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

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

FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 292p.

FOOD and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2008). Database agricultural – Production – Crops primary – Coconut, July 20.

FONTELES, T. V. *et al.* Celulase e enzimas correlatas produzidas por *Trichoderma polysporum* através da fermentação do bagaço de caju. In: Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Fortaleza, 9., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2009.

FONTELES, T. V. *et al.* Produção biotecnológica de enzimas celulolíticas usando bagaço de caju como substrato: efeito do pH e temperatura na determinação da atividade enzimática. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2008.

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

HAN, J. **Properties of non wood fibers**. Disponível em: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/han98a.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2009.

HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

JARVIS, M. Cellulose stacks up. **Nature**, v. 426, n. 6967, p. 611-612, 2003.

JOHNSON, E. A. *et al.* Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1125-1132, 1982.

JORGENSEN, K.; BACH, P.; JENSEN, A. D. Impact and attrition shear breakage of enzyme granules and placebo particles-application to particle design and formulation. **Powder Technology**, v.149, p. 157- 167, 2005.

KADAM, K.; KEUTZER, W. Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30 due to citric acid. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1111-1114, 1995.

KAMPF, A. N.; FERMINO, M. H. Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. In: Encontro Nacional Sobre Substrato Para Plantas, 2000, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre: Genesis, 2000. 312p.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 139-144, 2001.

KLOCK, U. *et al.* **Química da madeira** – Manual didático, 3ª ed. Revisada, Curitiba, 86 p. 2005.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 343-348, 1997.

LOPES, D. O. Produção de celulase por *Trichoderma* sp t676 por fermentação em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar. In: Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, 3., Londrina. **Anais...** Londrina, 2008.

LOPES, M. I. **Análise das etiquetas de genes expressos (ests) de uma cepa de *Aspergillus niger* em condições de depleção e não depleção para nitrogênio.** 2005. 103 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2005.

MACHADO, K. C.; DAMM, D. D.; JUNIOR, C. C. M. F. Reaproveitamento tecnológico de resíduo orgânico: casca de coco verde na produção de gabinetes ecológicos de computadores, In: Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, 2., **Anais...** Porto Alegre, 2009.

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

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MELILLO, J. M. *et al.* Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2173-2176, 2002.

MENEZES, G. D. G. *et al.* Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista da Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, v. 25, n. 1, p. 15-27, 2006.

MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Sistema celulolítico de *Aspergillus niger* em substrato sólido de bagaço de cana-de-açúcar tratado. **Coletânea do ITAL**, v. 24, n. 1, p. 75-89, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. **Science News Online**, v. 168, n. 14, p. 209-224, 2005.

MULIGGWE, S. E.; KASEVA, M. E. Assessment of industrial solid state waste management and resource recovery practices in Tanzania. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 47, p. 260-276, 2006.

NASSER, P. P. *et al.* Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *circumdati* e produção de ocratoxina A. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 27, n. 5, p. 1172-1175, 2003.

NOGUERA, P. *et al.* Coconut coir waste, a new and viable ecologically-friendly peat substitute. **Acta Horticulturae**, p. 279-286, 2000.

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

OLIVEIRA, S. L. R. *et al.* Determinação por superfície de resposta dos parâmetros pH e temperatura da atividade celulases produzida por *Trichoderma polysporum* em meio contendo casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*). In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009a, Natal. **Anais...** Natal, 2009a.

_____. Avaliação do cultivo de linhagens de *Trichoderma* spp. em resíduos de baixo custo para produção de enzimas celulolíticas. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009b, Natal. **Anais...** Natal, 2009b.

_____. Determinação por superfície de resposta dos parâmetros pH e temperatura da atividade celulase produzida por *Aspergillus niger* NRRL 2001 em meio contendo casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*). In: Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação, 9., 2009c, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2009c.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002.

PANDEY, A. *et al.* Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

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

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 54-59, 2007.

PARK, Y. K. *et al.* Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 12-14, 2001.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal Technology Management and Innovation**, v. 2, n. 1, 2007.

PRADE, R. A. Xylanases from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 101-131, 1995.

PRODUÇÃO de resíduos de coco verde. **Diário do Nordeste Online**, Fortaleza, 28 jan. 2009. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=610142>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural by products for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

RIBEIRO, R. R. **Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex – 1X8-50**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, Brasil, 1997.

RIVALIER, E.; SYDEL, S. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué a létude microspique des champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v. 10, p. 444-452, 1932.

RIZZATTI, A. C. S. *et al.* Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermo tolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 88-93, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95-100, 2008.

ROLDÁN, A. *et al.* Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 3, p. 375-382, 2006.

ROSA, M. F. **Alternativas para o uso da casca de coco verde**. Rio de Janeiro: Rede local da Embrapa Agroindústria de Alimentos, 10 p. (Programa 10 – Extração, colheita, pós-colheita, transformação e preservação de produtos agrícolas. Subprojeto 10.1999.08303), 1998.

ROSA, M. F. *et al.* **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6 p. (Comunicado Técnico, 54).

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade de celulases de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291. 2003.

SEGUENKA, B. *et al.* Produção de celulases a partir de fungos filamentosos utilizando serragem de eucalipto (*Eucalyptus robusta*) como fonte de carbono. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009, Natal. **Anais...** Natal, 2009.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859-865, 2005.

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

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2005. 178p. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, UFPR. 2005.

TAVARES, V. B. *et al.* Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p.722-725, 1998.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot-fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**. Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 1-17, 1995.

VAILLANT, F. *et al.* Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. **Journal of Food Engineering**, Abingdod, Oxon, v. 42, n. 4, p. 215-224, 1999.

VIGIANO, D. J. M. **Estudo de caso de degradação química de papéis ácidos**. Belo Horizonte. Escola de Belas Artes da UFMG, 2008.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 491-499, 2005.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 99-106, 2005.

ANEXOS

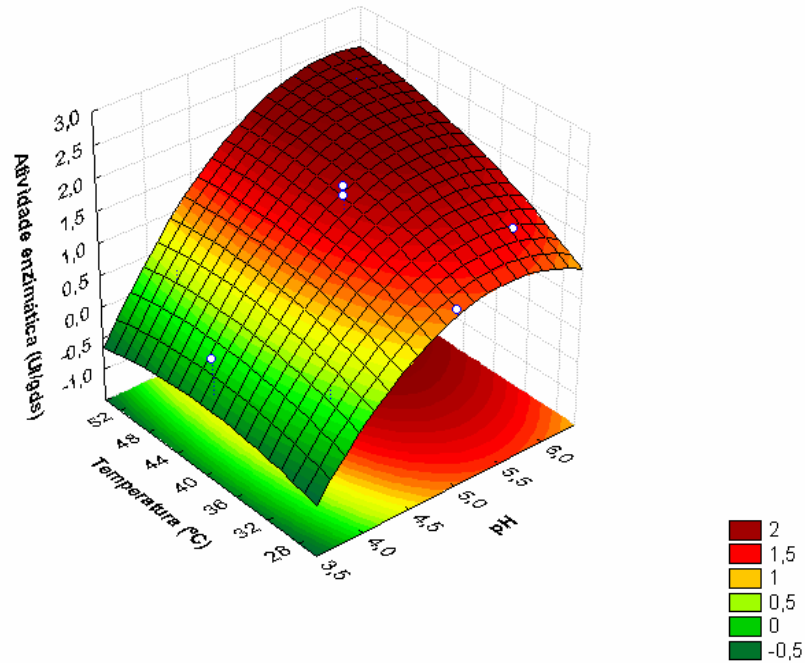
[Anexo 1](#)

[Anexo 2](#)

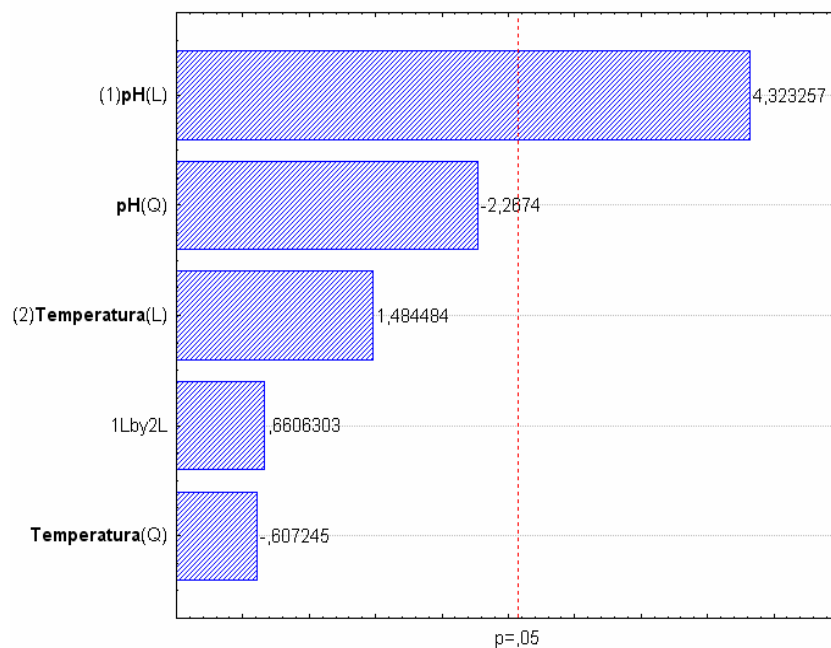
[Anexo 3](#)

Anexo 4 - Resultados do planejamento experimental 2² obtidos com a linhagem *T. reesei* NRRL 11460

- a) Superfície de resposta do planejamento experimental relacionado à otimização do pH e temperatura para a produção de celulases

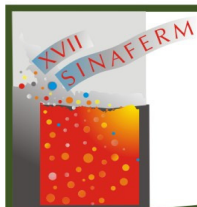


- b) Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável



c) Análise de variância (ANOVA) referente à produção de celulasas por *T. reesei* NRRL 11460.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	6,56	5	1,33	5,36
Residual	1,24	5	0,24	
Total	7,80	10		
Coeficiente de determinação	0,84			
F tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$



Determinação por Superfície de Resposta dos Parâmetros pH e Temperatura da Atividade Celulase Produzida por *Trichoderma polysporum* em Meio Contendo Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera* L.)

Simone Lopes do R. de Oliveira¹, Thatyane Vidal Fonteles¹, Mayra Garcia Maia Costa¹, Tatiane Cavalcante Maciel¹, Sueli Rodrigues¹

¹Universidade Federal do Ceará – Depto. de Tecnologia de Alimentos
Caixa Postal 12168– 60.356-000 Fortaleza – CE - E-mail: simonezen30@gmail.com

RESUMO

*Fatores externos como pH e temperatura precisam ser otimizados, pois alteram a conformação protéica e a velocidade das reações enzimáticas. Em relação às enzimas líticas, a metodologia de superfície de resposta é frequentemente utilizada para a otimização e verificação da influência dos componentes do meio de cultivo para a produção das enzimas, assim como para a otimização e a verificação da influência de parâmetros na produção enzimática. O objetivo deste trabalho foi determinar por superfície de resposta as condições ótimas de pH e temperatura da atividade celulase produzida por *Trichoderma polysporum* a partir da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.). As condições que maximizam a atividade enzimática de *T. polysporum* produzida a partir da casca de coco verde são pH 5,5 e temperatura de 40 °C.*

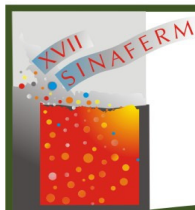
Palavras-chave: fermentação; celulase; casca de coco.

INTRODUÇÃO

A ampla aplicabilidade da atividade enzimática permite utilizá-la em diversos processos. Hoje o número de enzimas conhecidas e caracterizadas é grande. Entretanto, poucas são produzidas em larga escala e aplicadas industrialmente. Por isso, tornar-se necessário um estudo avançado das enzimas e suas condições ótimas de atuação.

Em vista do exposto pode-se concluir que a estrutura química íntegra das proteínas com atividade catalítica é determinante para a atuação delas. No entanto, fatores externos como pH e temperatura precisam ser otimizados, pois alteram a conformação protéica e a velocidade das reações enzimáticas (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Uma das alternativas para a casca de coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. Levando em consideração o processo fermentativo, o pH do meio de cultivo e a temperatura de incubação são fatores muito importantes para o bom desenvolvimento da fermentação, pois influenciam tanto no crescimento quanto na formação do produto desejado (HASHIZUME, 2001). Os fungos são



os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas e os principais celulolíticos produtores de celulasas incluem o gênero *Trichoderma* (AGUIAR e MENEZES, 2000).

Modelos matemáticos têm sido cada vez mais utilizados para ajudar a explicar respostas de reações bioquímicas. A metodologia de superfície de resposta é frequentemente usada para determinar uma resposta ótima entre uma faixa específica de condições experimentais. Em muitos casos, a interação de parâmetros que influenciam processos fermentativos pode ser avaliada com um número reduzido de ensaios através de um planejamento experimental (THÉODORE e PANDA, 1995).

Em relação às enzimas líticas, a metodologia de superfície de resposta é frequentemente utilizada para a otimização e verificação da influência dos componentes do meio de cultivo para a produção das enzimas, assim como para a otimização e a verificação da influência de parâmetros na produção enzimática (FLEURI e SATO, 2008). O objetivo deste trabalho foi determinar por superfície de resposta as condições ótimas de pH e temperatura da atividade celulase produzida por *T. polysporum* a partir da casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do Microrganismo

Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Trichoderma polysporum* produtora de enzimas hidrolíticas. A cepa é pertencente ao Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará - LABIOTEC (DETAL/UFC) e foi cedida pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina – PE).

Substrato Empregado para Fermentação

Como matéria prima para o processo fermentativo foi utilizado casca de coco verde coletada no comércio local de água de coco *in natura*.

As cascas de coco foram primeiramente limpas, lavadas, cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa durante 4 dias à 50 °C. Em seguida, o material foi desintegrado, moído em moinho industrial. As cascas de coco foram peneiradas utilizando-se uma peneira de 1,5 mm e armazenadas à temperatura ambiente antes da utilização.

Preparo da Cultura Estoque

A linhagem é mantida em meio de cultura composto de 5g de farelo de trigo e 3 mL de água destilada. Sendo estocada, na forma esporulada à 4 °C e repicada periodicamente (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Ensaio Fermentativo

O meio de cultura utilizado para determinação da atividade enzimática na casca do coco foi composto por: 1,5 g de farelo de trigo, 1,5 g de casca de coco, 3 mL de solução salina



contendo 1 g/L de NaNO_3 ; 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 1g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de NaCl e 3 mL de água destilada.

O meio foi colocado em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, inoculou-se 1.10^6 esporos/mL de *T. polysporum* contados em câmara de Neubauer (FREIRE, 1996) a partir de culturas puras do fungo, mantidas em farelo de trigo, na forma esporulada a 4 °C. Os frascos foram incubados em B.O.D a temperatura de 30 ± 0.5 °C durante 48 horas. O trigo pode servir como substrato, mas sua função majoritária neste experimento foi para melhorar a retenção da umidade e deixar o meio sólido mais poroso, pois foram feitos testes utilizando somente o trigo e a atividade enzimática foi muito inferior em relação ao resultado utilizando-se trigo e casca de coco verde.

Obtenção do Extrato Enzimático

Após o período de incubação, adicionou-se 20 mL de tampão acetato de sódio (200 mM) com pH ajustado de acordo com o delianeamento pelo planejamento experimental) a cada frasco contendo o substrato-suporte fermentado, em seguida a suspensão foi agitada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 para a obtenção do extrato aquoso da enzima livre de células (YOSHIOKA *et al.*, 1981).

Otimização das condições de determinação da atividade enzimática

Parâmetros de pH e temperatura foram avaliados com relação à otimização da determinação da atividade enzimática. O pH ótimo e a temperatura ótima da enzima produzida pela linhagem foi determinado através da metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO *et al.*, 2002) onde foram variados o pH na faixa de 4,5 a 6,0 e a temperatura na faixa de 40 a 70 °C.

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da incubação do extrato enzimático bruto livre de células com solução de celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 200 mM com pH e temperatura variados de acordo com o planejamento experimental.

Atividade de celulase

Foram adicionados 75 µL do extrato enzimático a 125 µL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado ao valor desejado, conforme planejamento fatorial, contendo 1% (p/v) de celulose microcristalina. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura do ensaio (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS). A atividade hidrolítica foi determinada através da quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação, quantificados pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (UI) sendo 1 UI definida como a

quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor nas condições de ensaio (BINOD et al., 2007).

Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em duplicata sendo as respectivas análises realizadas em triplicata sendo calculadas a média e o desvio padrão de cada uma delas. Os planejamentos experimentais e as análises de superfície de resposta foram efetuados com o auxílio do software Statistica 7.0 v.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos de atividade enzimática de acordo com o planejamento experimental realizado.

Tabela 1 – Planejamento experimental e atividade de celulase produzida por *T.polysporum* a partir da casca do coco verde.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade enzimática (UI/gds)
1	4,5	40	0,04 \pm 0,10
2	4,5	60	0,05 \pm 0,00
3	5,5	40	0,47 \pm 0,11
4	5,5	60	0,18 \pm 0,03
5	4,5	50	0,09 \pm 0,03
6	5,5	50	0,28 \pm 0,19
7	5,0	40	0,38 \pm 0,04
8	5,0	60	0,29 \pm 0,02
9	5,0	50	0,31 \pm 0,06
10	5,0	50	0,34 \pm 0,13
11	5,0	50	0,26 \pm 0,04

A Tabela 2 apresenta os efeitos das variáveis independentes, bem como suas interações na atividade enzimática. Observa-se que somente o efeito quadrático da temperatura e a interação entre pH e temperatura não foram significativos no intervalo de confiança considerado (95%).

Tabela 2 - Efeitos estimados das variáveis independentes para a atividade enzimática

Fator	Atividade enzimática	
	Efeito	Desvio padrão
Média	0,29*	0,02*
pH(L)	0,35*	0,03*
pH (Q)	-0,38*	0,05*
Temperatura (L)	-0,16*	0,03*
Temperatura (Q)	0,09	0,05
pH x Temperatura	-0,10	0,04

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a atividade enzimática no planejamento experimental é expresso pela equação (1):

$$\text{Atividade enzimática (UI/gds)} = -21,54 + 8,52 \text{ pH} - 0,77 \text{ pH}^2 - 0,06 T + 5 \times 10^{-4} T^2 - 0,01 \text{ pH} \times T \quad (\text{Eq. 1})$$

De acordo com a análise de variância (ANOVA) e o teste de F, o modelo de regressão foi significativo no nível de confiança considerado (95%), uma vez que o coeficiente de correlação obtido foi satisfatório (0,97) e o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática foi igual a 33, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F .

Os resultados de atividade enzimática foram analisados através de gráfico de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). A Figura 1 apresenta a superfície de resposta obtida para a atividade enzimática (Eq. 1).

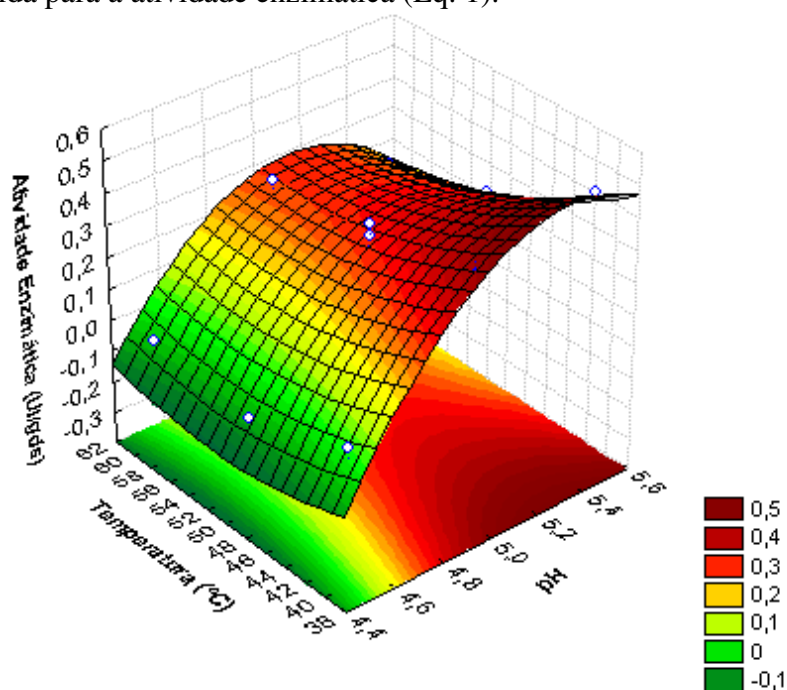


Figura 1 - Superfície de resposta da atividade enzimática de celulase em função dos valores de pH e temperatura para *Trichoderma polysporum*.

De acordo com a superfície de resposta obtida (Figura 1), observa-se que o pH apresentou maior influência sobre a atividade enzimática que apresenta um aumento em valores de pH a partir de 5,0. A variação de temperatura, no intervalo estudado, praticamente não apresentou influência na atividade enzimática, entretanto, a região ótima de atividade enzimática foi obtida com a combinação de valores de temperatura aproximadamente de 40 °C e pH em torno de 5,5. Nestas condições foi obtida uma atividade enzimática máxima de $0,47 \pm 0,11$, mostrando que a condição experimental que maximiza a atividade enzimática foi encontrada em pH 5,5 e temperatura de 40 °C.

CONCLUSÃO



Analisando os coeficientes dos modelos empíricos ajustados, verificou-se que as variáveis independentes pH e temperatura afetaram a variável de resposta estudada (atividade enzimática), entretanto, as condições que maximizam a atividade enzimática de *T. polysporum* a partir da casca de coco verde como substrato será em pH 5,5 e temperatura de 40 °C. A realização de um maior número de ensaios pode ser necessária para melhorar o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, C. L.; Menezes, T. J. B. (2000), Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *Boletim Ceppa*, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 5770.

Barros Neto, B.; Scarminio I. S.; Bruns, R. E. (2002), *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Campinas: Editora da UNICAMP, Brasil, 350 p.

Binod, P.; Sandhya, C.; Pradeep, S.; George Szak, G.; Pandey, A. (2007), Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 14, p. 2742-2748.

Bobbio, F. O.; Bobbio, P.A. (1995), *Introdução à química de alimentos*, São Paulo: Editora Varela Ltda, Brasil, 2ª edição.

Cavalcante, R. S.; Lima, H. L. S.; Pinto, G. A. S.; Gava, C. A. T.; Rodrigues, S. (2008), Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. Communication. *Food Bioprocess Technology*, v.1, p. 100-104.

Freire, D. M. G. (1996), Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 174 pp.

Fleuri, L. F.; Sato, H. H. (2008), Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 299-310.

Hashizume, T. (2001), Tecnologia do Vinho. Em: Borzani, W.; Aquarone, E.; Lima, U. A. *Biotechnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos*, v. 4, São Paulo: Editora Edgard Blücher, Brasil.

Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428.

Théodore, K.; Panda, T. (1995), Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial Technology*, v. 17, n. 12, p. 1043.

Yoshioka, H.; Chavanich, S.; Nilubol, N.; Hayashida, S.; (1981), Produccion and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoideis* YH-50. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, p. 579-586.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro e a Embrapa Semi-árido pelas linhagens microbianas.



XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

Avaliação do Cultivo de Linhagens de *Trichoderma* spp. em Resíduos de Baixo Custo para Produção de Enzimas Celulolíticas

Simone Lopes do R. de Oliveira¹, Thatyane Vidal Fonteles¹, Mayra Garcia Maia Costa¹, Tatiane Cavalcante Maciel¹, Sueli Rodrigues¹

¹Universidade Federal do Ceará – Depto. de Tecnologia de Alimentos
Caixa Postal 12168 – 60.356-000 Fortaleza – CE - E-mail: simonezen30@gmail.com

RESUMO

*O reaproveitamento de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos tem sido uma boa alternativa na perspectiva de reutilização de recursos que podem conter muitas substâncias de alto valor que, geralmente são rejeitados pelas agroindústrias. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade celulolítica de linhagens de *Trichoderma* utilizando matérias-primas de baixo custo como o bagaço do pedúnculo do caju e casca do coco verde como substratos em processos fermentativos. Os resultados apontaram as linhagens testadas como boas produtoras de celulases sendo, portanto viáveis estudos posteriores para aplicações a nível industrial.*

Palavras-chave: celulase; celulose; *Trichoderma*

INTRODUÇÃO

O *Trichoderma* é um fungo imperfeito e possui muitas espécies que são geneticamente distintas. O crescimento rápido desse fungo em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso, com pústulas conidiogênicas brancas ou verdes são características utilizadas para distinguir as espécies desse gênero (BISSET, 1991). O gênero tem sido estudado extensivamente como fonte potencial de celulases. Ballesteros *et al.*, (2004) sugerem que o sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose cristalina é o de *Trichoderma*.

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada, com ácidos, a glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem (RUEGGER e TAUK-TORNISIELO, 2004).

Uma das alternativas para a casca de coco verde e o bagaço do pedúnculo de caju poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. Como a maioria



dos rejeitos agroindustriais, estes materiais contêm grande quantidade de compostos como celulose, hemicelulose, não havendo necessidade de grandes complementações de fonte de carbono para o adequado desenvolvimento microbiano. Estes compostos funcionam como indutores para a produção de enzimas extracelulares, como celulases, xilanases e outras (COELHO *et al.*, 2001).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (RUEGGER e TAUK-TORNISIELO, 2004).

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados industrialmente para produção de enzimas microbianas. Dentre os produtores de celulases destaca-se o gênero *Trichoderma*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade celulolítica obtida de linhagens de *Trichoderma* utilizando como substratos matérias-primas de baixo custo como o bagaço do pedúnculo do caju e casca do coco verde via processo fermentativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do Microrganismo

Neste trabalho foram utilizadas linhagens fúngicas produtoras de enzimas hidrolíticas como: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma polysporum*. As cepas são pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará - LABIOTEC (DETAL/UFC) e foram cedidas pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina – PE).

Substratos Empregados para Fermentação

O bagaço de caju utilizado nesse estudo foi obtido de uma indústria local (Pacajus-CE, Brasil). Logo após a coleta, as fibras foram lavadas, para remoção dos açúcares redutores residuais, desidratadas a 60 °C por 24 h e trituradas.

As cascas de coco verde foram coletadas no comércio local de água de coco *in natura*. Primeiramente foram limpas, lavadas, cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa durante 4 dias à 50 °C. Em seguida, o material foi desintegrado, moído em moinho industrial e peneirado utilizando-se uma peneira de 1,5 mm e armazenado à temperatura ambiente antes da utilização.

Preparo da Cultura Estoque



As linhagens são mantidas em meio de cultura composto de 5g de farelo de trigo e 3 mL de água destilada. Sendo estocadas, na forma esporulada à 4° C e repicadas periodicamente (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Ensaio Fermentativo

O meio de cultura utilizado para determinação da atividade enzimática na casca do coco foi composto por: 5g de trigo, 1g de casca de coco, 3mL de solução salina contendo 1 g/L de NaNO₃, 1 g/L de (NH₄)₂HPO₄; 1g/L de MgSO₄.7H₂O; 1 g/L de NaCl e 6mL de água destilada.

O bagaço do pedúnculo de caju foi triturado e seco em estufa a 60 °C e o meio de cultura composto por: 5g de trigo, 1g de bagaço do pedúnculo de caju, 6mL de água destilada e 3mL da solução salina descrita acima. Ambos os meios foram colocadas em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, autoclavados por 15 minutos, a 1 atm, 121°C. O trigo pode servir como substrato, mas sua função majoritária neste experimento foi para melhorar a retenção da umidade e deixar o meio sólido mais poroso, pois foram feitos testes utilizando somente o trigo e a atividade enzimática foi muito inferior em relação ao resultado utilizando-se trigo e casca de coco verde e trigo com bagaço do pedúnculo de caju. Após resfriamento dos meios inoculou-se 1.10⁶ esporos/mL de *Trichoderma* contados em câmara de Neubauer (FREIRE, 1996) a partir das culturas estoque do fungo. Os frascos foram incubados em B.O.D. a temperatura de 30 ± 0.5 °C durante 48 horas.

Obtenção do Extrato Enzimático

Após o período de incubação, adicionou-se 20 mL de tampão acetato de sódio (200 mM pH 5.0) cada frasco contendo o substrato-suporte fermentado, em seguida a suspensão foi agitada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro Whatman n° 1 para a obtenção do extrato aquoso da enzima livre de células (YOSHIOKA *et al.*, 1981).

Determinação da Atividade Enzimática

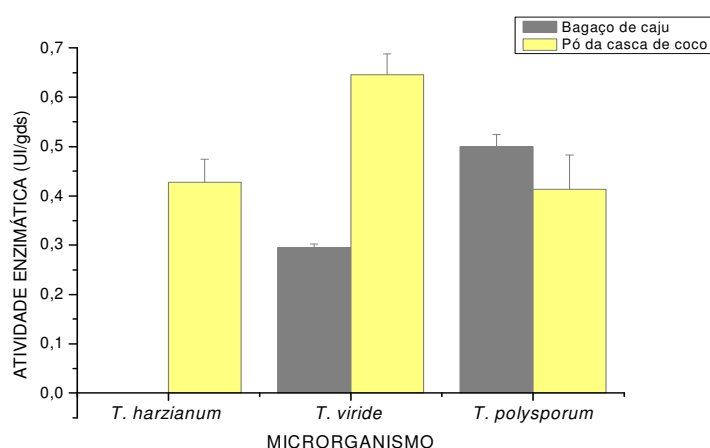
O ensaio foi realizado em triplicata. Foram adicionados 250 µL do extrato enzimático a 125 µL da solução de atividade constituída de 1% de celulose microcristalina (Avicel) dissolvida em tampão acetato de sódio (200 mM, pH 5.0). A mistura foi incubada em banho-maria por 1 hora à temperatura de 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de solução do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS).

A atividade enzimática da enzima celulase foi determinada através da quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação quantificados pelo método de DNS (MILLER, 1959) e expressa em unidades internacionais sendo 1 UI definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor (AR) por minuto nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados de atividade enzimática das linhagens de *Trichoderma*.

Figura 1- Atividade enzimática das linhagens fúngicas em bagaço de caju e casca de coco verde.



Com base nos dados experimentais apresentados, verifica-se que a linhagem *T. viride* foi o que apresentou melhores desempenhos em relação às demais quando se utilizou como substrato a casca do coco verde, uma vez que a casca do coco é composta em sua maioria de celulose e hemicelulose. Ao se utilizar o bagaço do pedúnculo do caju como substrato a atividade enzimática foi menor, uma vez que este resíduo contém uma grande quantidade de pectina.

Como o maior valor de atividade enzimática foi obtido com o *T. viride* utilizando a casca do coco como substrato, esta linhagem apresentou um melhor aproveitamento do conteúdo celulósico, assim, este microrganismo tem potencial para ser utilizado no processo de biodegradação dos resíduos celulósicos, para a obtenção da glicose e em processos industriais para obtenção de celulases.

Os resultados confirmaram que o gênero *Trichoderma* é produtor de celulase e que foi capaz de se adaptar aos diferentes substratos testados. Os meios utilizados proporcionaram, de maneira geral, boa produção de celulase pelo gênero *Trichoderma*, quando comparados com dados da literatura.

Quatro linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* cultivadas em diferentes meios de cultura apresentaram resultados que variaram de 3,9 a 16,3 U (COCHET, 1991). Todavia, melhor resultado (18,0 U mL⁻¹) foi verificado com *Trichoderma* sp. A-001 em meio contendo papel de filtro e 0,2% do surfactante Tween 80 (GASHE, 1992). Observa-se que a atividade da celulase



depende, não somente da linhagem, mas das técnicas utilizadas para sua determinação e do substrato empregado.

Substratos contendo farelo de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço do pedúnculo de caju têm sido usados com sucesso na obtenção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas microbianas. Castilho *et al.* (2000) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para a produção de poligalacturonase (PG) através de fermentação em estado sólido em meio contendo misturas de farelo de trigo e farinha de soja, obtendo produção máxima de 18 U/g. Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se considerar as diferenças de metodologia de fermentação e de dosagem de atividades usadas (MARTIN, 2006).

Os resultados deste estudo evidenciaram que a produção de celulases depende do tipo de substrato e que o uso de distintos métodos torna difícil a comparação com os resultados obtidos por diferentes autores, demonstraram também que, dentre as linhagens estudadas, *Trichoderma viride* destacou-se das demais, quanto ao potencial para produção de atividade da celulase, induzida pela casca do coco, enquanto que *T. polysporum* se destacou na produção com o bagaço do caju. Sugere-se, que estudos mais detalhados com as linhagens de *Trichoderma* deverão ser realizados, através de outros testes laboratoriais, para verificar melhor o potencial enzimático de tais linhagens.

Estudos futuros para um maior conhecimento quanto ao potencial para otimização de atividade da celulase nas condições de temperatura e pH ótimos, bem como a otimização das condições de cultivo, são ainda necessários.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, validou-se a hipótese do aproveitamento do resíduo da casca do coco verde e bagaço do pedúnculo de caju para produção de celulases pelo gênero *Trichoderma*.

Dentre as espécies estudadas a que apresentou melhor atividade enzimática foi o *T. viride* quando utilizou o pó da casca do coco e *T. polysporum* ao utilizar o bagaço do pedúnculo de caju como substrato. Estas linhagens apresentaram boa atividade enzimática sendo, portanto viáveis para uso industrial. Estudos futuros visando à otimização das condições de temperatura e pH para produção da enzima celulase bem como as condições de meio de cultura serão ainda realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ballesteros, M.; Oliva, J. M.; Negro, M. J.; Manzanares, P.; Ballesteros, I. (2004), Ethanol from lignocellulosic materials by simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 12, p. 1843-1848.



Bisset, J. (1991), A revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, v. 69, n. 11, p. 2357-2372.

Castilho, L. R.; Alves, T. L. M; Medronho, R. A. (2000), Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 45-50.

Cavalcante, R. S.; Lima, H. L. S.; Pinto, G. A. S.; Gava, C. A. T.; Rodrigues, S. (2008), Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. *Food Bioprocess Technology*, v.1, p. 100-104.

Cochet, N. (1991), Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, p. 104-109.

Coelho, M. A. Z.; Leite, S. G. F.; Rosa, M. F.; Furtado, A. A. L. (2001), Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *Boletim CEPPA*, v. 19, n. 1, p. 3342.

Freire, D. M. G. (1996), Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 174 pp.

Gashe, B. A. (1992), Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 73, p. 79-82.

Martin, N. M. (2006), Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases: produção, caracterização da poligalacturonase. Rio Claro: [s.n.], 65 f. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428.

Ruegger, M. J. S.; Tauk-tornisielo S. M. (2004), Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205-211.

Yoshioka, H.; Chavanich, S.; Nilubol, N.; Hayashida, S. (1981), Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoideis* YH-50. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, p. 579-586.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsas e a Embrapa Semi-árido pelas linhagens microbianas.



2009 IX ENPPG • IX ENICIT • III SIMPIT
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ



DETERMINAÇÃO POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS PARÂMETROS pH E TEMPERATURA DA ATIVIDADE CELULASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS NIGER* NRRL 2001 EM MEIO CONTENDO CASCA DE COCO VERDE (*COCOS NUCIFERA L.*)

Simone Lopes do R. de OLIVEIRA (1); Thatyane Vidal FONTELES(2); Tatiane Cavalcante MACIEL (3) e Sueli RODRIGUES (4).

(1) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campus do Pici. Bloco 851 - Caixa Postal 12168 – cep: 60021970 - Fortaleza, CE – Brasil, e-mail: simonezen30@gmail.com

(2) Universidade Federal do Ceará, e-mail: thaty.vidal@gmail.com

(3) Universidade Federal do Ceará, e-mail: tatianecmaciel@hotmail.com

(4) Universidade Federal do Ceará, e-mail: Sueli@ufc.br.

RESUMO

Uma das alternativas para a casca de coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. Levando em consideração o processo fermentativo, o pH do meio de cultivo e a temperatura de incubação são fatores muito importantes para o bom desenvolvimento da fermentação, pois influenciam tanto no crescimento quanto na formação do produto desejado. Em relação às enzimas líticas, a metodologia de superfície de resposta é freqüentemente utilizada para a otimização e verificação da influência dos componentes do meio de cultivo para a produção das enzimas, assim como para a otimização e a verificação da influência de parâmetros na produção enzimática. O objetivo deste trabalho foi determinar por superfície de resposta as condições ótimas de pH e temperatura da atividade celulase produzida por *Aspergillus niger* a partir da casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*). Pela análise dos resultados, obteve-se bom ajuste do modelo aos dados experimentais sendo a melhor condição para a produção de celulase por *A. niger*, nos níveis estudados, a temperatura de 40 °C e pH 5,5.

Palavras-chave: Celulase; *Aspergillus*; Resíduos e Casca de coco.

1. INTRODUÇÃO

A ampla aplicabilidade da atividade enzimática permite utilizá-la em diversos processos. Hoje o número de enzimas conhecidas e caracterizadas é grande. Entretanto, poucas são produzidas em larga escala e aplicadas industrialmente. Por isso, tornar-se necessário um estudo avançado das enzimas e suas condições ótimas de atuação. Em vista do exposto pode-se concluir que a estrutura química íntegra das proteínas com atividade catalítica é determinante para a atuação delas. No entanto, fatores externos como pH e temperatura precisam ser otimizados, pois alteram a conformação protéica e a velocidade das reações enzimáticas (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Uma das alternativas para a casca de coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. Levando em consideração o processo fermentativo, o pH do meio de cultivo e a temperatura de incubação são fatores muito importantes para o bom



desenvolvimento da fermentação, pois influenciam tanto no crescimento quanto na formação do produto desejado.

Segundo Gokhale (1986) *A.niger* pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos. Modelos matemáticos têm sido cada vez mais utilizados para ajudar a explicar respostas de reações bioquímicas. A metodologia de superfície de resposta é freqüentemente usada para determinar uma resposta ótima entre uma faixa específica de condições experimentais. Em muitos casos, a interação de parâmetros que influenciam processos fermentativos pode ser avaliada com um número reduzido de ensaios através de um planejamento experimental (THÉODORE e PANDA, 1995).

Em relação às enzimas líticas, a metodologia de superfície de resposta é freqüentemente utilizada para a otimização e verificação da influência dos componentes do meio de cultivo para a produção das enzimas, assim como para a otimização e a verificação da influência de parâmetros na produção enzimática (FLEURI e SATO, 2008). O objetivo deste trabalho foi determinar por superfície de resposta as condições ótimas de pH e temperatura da atividade celulase produzida por *A. niger* a partir da casca de coco verde (*Cocos nucifera L.*).

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do Microrganismo

Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Aspergillus niger* NRRL 2001. A cepa foi cedida pela ARS Culture Collection se encontra estocada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará - LABIOTEC (DETAL/UFC) e foi cedida pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina – PE).

2.2 Substrato Empregado para a Fermentação e o Ensaio fermentativo

Como matéria prima para o processo fermentativo foi utilizada casca de coco verde coletada no comércio local de água de coco *in natura*. As cascas de coco foram primeiramente limpas, lavadas, cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa durante 4 dias à 50 °C.

O meio de cultura utilizado para determinação da atividade enzimática na casca do coco foi composto por: 1,5 g de farelo de trigo, 1,5 g de casca de coco, 3 mL de solução salina contendo 1 g/L de NaNO₃; 1 g/L de (NH₄)₂HPO₄; 1g/L de MgSO₄.7H₂O; 1 g/L de NaCl e 3 mL de água destilada.

O meio foi colocado em frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL, inoculou-se 1.10⁶ esporos/mL de *A. niger* 2001 contados em câmara de Neubauer (FREIRE, 1996) a partir de culturas puras do fungo, mantidas em sabugo de milho, na forma esporulada a 4 °C. Os frascos foram incubados em B.O.D a temperatura de 30 ± 0.5 °C durante 48 horas. O trigo pode servir como substrato, mas sua função majoritária neste experimento foi para melhorar a retenção da umidade e deixar o meio sólido mais poroso, pois foram feitos testes utilizando somente o trigo e a atividade enzimática foi muito inferior em relação ao resultado utilizando-se trigo e casca de coco verde.

2.3 Obtenção do extrato enzimático

Após o período de incubação, adicionou-se 20 mL de tampão acetato de sódio (200 mM) com pH ajustado de acordo com o delineamento pelo planejamento experimental a cada frasco contendo o substrato-suporte fermentado, em seguida a suspensão foi agitada com bastão de vidro e filtrada em



papel de filtro Whatman nº 1 para a obtenção do extrato aquoso da enzima livre de células (YOSHIOKA et al., 1981).

2.4 Otimização das condições de determinação da atividade enzimática

Parâmetros de pH e temperatura foram avaliados com relação à otimização da determinação da atividade enzimática. O pH ótimo e a temperatura ótima da enzima produzida pela linhagem foi determinado através da metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO et al., 2002) onde foram variados o pH na faixa de 4,5 a 6,0 e a temperatura na faixa de 40 a 70 °C.

2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da incubação do extrato enzimático bruto livre de células com solução de celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 200 mM com pH e temperatura variados de acordo com o planejamento experimental. Foram adicionados 75 µL do extrato enzimático a 125 µL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado ao valor desejado, conforme planejamento fatorial, contendo 1% (p/v) de celulose microcristalina. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura do ensaio (determinada no planejamento fatorial). A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS). A atividade hidrolítica foi determinada através da quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação, quantificados pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (UI) sendo 1 UI definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor nas condições de ensaio (BINOD et al., 2007).

2.6 Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em duplicata sendo as respectivas análises realizadas em triplicata sendo calculadas a média e o desvio padrão de cada uma delas. Os planejamentos experimentais e as análises de superfície de resposta foram efetuados com o auxílio do software Statistica 7.0 v.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o planejamento experimental e os resultados obtidos de atividade enzimática de *A. niger*.

Tabela 1 – Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática de celulase produzida por *A. niger* a partir da casca de coco verde

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Atividade enzimática (UI/gds)
1	40	4,5	0,14 ± 0,11
2	60	4,5	0,22 ± 0,24



3	40	5,5	0,31 ± 0,04
4	60	5,5	0,13 ± 0,02
5	50	4,5	0,14 ± 0,09
6	50	5,5	0,17 ± 0,00
7	40	5	0,16 ± 0,07
8	60	5	0,11 ± 0,01
9	50	5	0,16 ± 0,06
10	50	5	0,15 ± 0,05
11	50	5	0,08 ± 0,11

* Valores são média ± desvio padrão

A Tabela 2 apresenta os efeitos das variáveis independentes, bem como suas interações na atividade enzimática. Observa-se que o efeito quadrático da temperatura e o efeito linear do pH e temperatura não foram significativos no intervalo de confiança considerado (95%).

Tabela 2 - Efeitos estimados das variáveis independentes para a atividade enzimática

Atividade enzimática		
Fator	Efeitos	Desvio padrão
Média	0,11*	0,01*
pH(L)	0,04	0,01
pH (Q)	0,11*	0,03*
Temperatura (L)	-0,04	0,01
Temperatura (Q)	0,07	0,03
pH x Temperatura	-0,13*	0,02*

4. * Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a atividade enzimática no planejamento experimental é expresso pela equação (1):

$$\text{Atividade enzimática (UI/gds)} = 3,46 - 1,63 \text{ pH} + 0,23 \text{ pH}^2 + 0,02 T + 0,0003 T^2 - 0,01 \text{ pH} \times T \text{ (Eq. 1)}$$



De acordo com a análise de variância (ANOVA) e o teste de F , o modelo de regressão foi significativo no nível de confiança considerado (95%), uma vez que o coeficiente de correlação obtido foi satisfatório (0,93) e o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática foi igual a 12,71, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F . Os resultados de atividade enzimática foram analisados através de gráfico de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). A Figura 1 apresenta a superfície de resposta obtida para a atividade enzimática (Eq. 1).

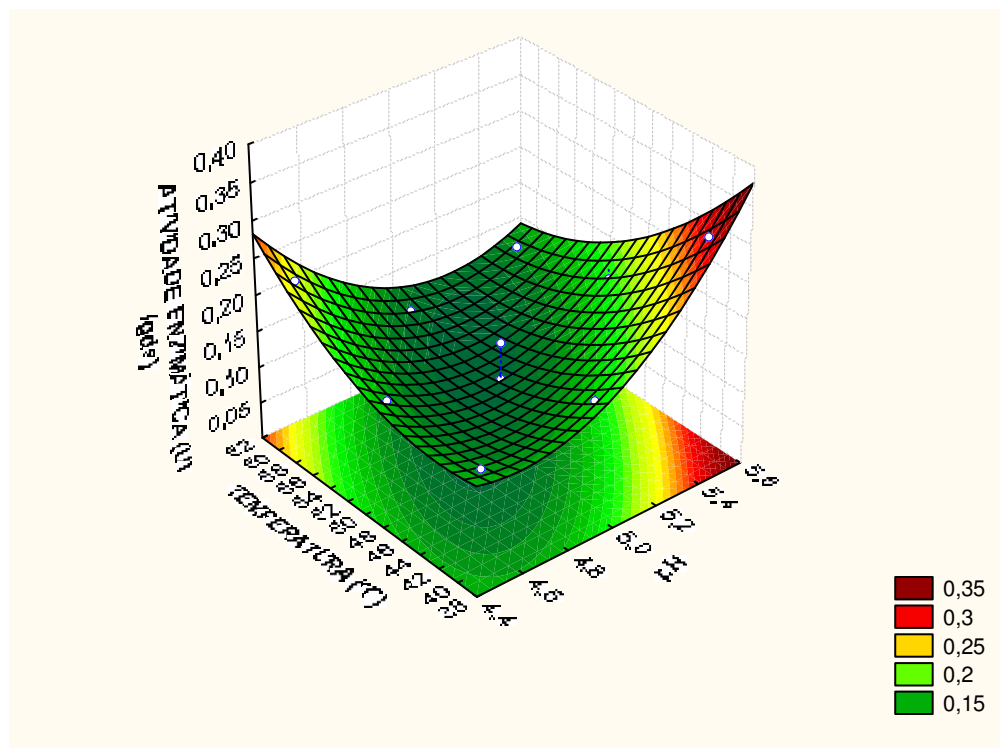


Figura 1 - Superfície de resposta da atividade enzimática de celulase em função dos valores de pH e temperatura para *A. niger*.

De acordo com a superfície de resposta obtida (Figura 1), observa-se que o pH apresentou maior influência sobre a atividade enzimática que apresenta um aumento em valores de pH a partir de 5,5. A variação de temperatura, no intervalo estudado, praticamente não apresentou influência na atividade enzimática, entretanto, a região ótima de atividade enzimática foi obtida com a combinação de valores de temperatura aproximadamente de 40 °C e pH em torno de 5,5. Nestas condições foi obtida uma atividade enzimática máxima de $0,31 \pm 0,04$, mostrando que a condição experimental que maximiza a atividade enzimática foi encontrada em pH 5,5 e temperatura de 40 °C.



4. CONCLUSÃO

Analisando os coeficientes dos modelos empíricos ajustados, verificou-se que as variáveis independentes pH e temperatura afetaram a variável de resposta estudada (atividade enzimática), entretanto, as condições que maximizam a atividade enzimática de *A. niger* a partir da casca de coco verde como substrato será em pH 5,5 e temperatura de 40 °C. A realização de um maior número de ensaios pode ser necessária para melhorar o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS NETO, B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 350 p.

BINOD, P.; SANDHYA, C.; PRADEEP, S.; GEORGE SZAK, G.; PANDEY, A. **Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin**. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 14, p. 2742-2748, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**, 2.ed. São Paulo: Editora Varela Ltda, 1995.

CAVALCANTE, R. S.; LIMA, H. L. S.; PINTO, G. A. S.; GAVA, C. A. T.; RODRIGUES, S. **Effect of Moisture on Trichoderma Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. Communication**. *Food Bioprocess Technology*, v.1, p. 100-104, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996. 174p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

GOKHALE, D. U. **Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207**. *Biotechnology Letters*, v. 8, p. 137-138, 1986

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar**. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

THÉODORE, K.; PANDA, T. **Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum***. *Enzyme Microbial Technology*, v. 17, n. 12, p. 1043, 1995.

YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N.; HAYASHIDA, S. **Producion and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50**. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, p. 579-586, 1981.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro, a Embrapa Agroindústria Tropical pelo fornecimento da casca do coco e *ARS Culture Collection* pelo microrganismo utilizado.



2009 IX ENPPG • IX ENICIT • III SIMPIT
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ

