

# PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA NA *Artocarpus heterophyllus* Lam.<sup>1</sup>

Dhiéssica dos Santos Ribeir<sup>2</sup>

Vanessa Neres Santana<sup>3</sup>

Romário Alves Santana<sup>4</sup>

Baraquizio Braga do Nascimento Junior<sup>5</sup>

## Resumo

Os resíduos gerados na agroindústria representam um recurso biotecnológico de baixo custo que pode gerar produtos de importante valor econômico, como por exemplo, as enzimas. Com o reaproveitamento destes resíduos há uma redução significativa dos mesmos, reduzindo a poluição ambiental. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção enzimática na casca da *Artocarpus heterophyllus* Lam. para avaliar a presença de enzimas no resíduo in natura e fermentado, que possam valorizar esse subproduto. Foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken com 3 níveis. As variáveis estudadas foram concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação. Os resultados demonstraram a presença das enzimas amilase ( $0,009 \pm 0,023$  U/mL), celulase ( $0,095 \pm 0,006$  U/mL) e lipase ( $0,667 \pm 0,012$  U/mL) no extrato da casca da jaca mole (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) sem fermentar e após fermentação foi encontrado a presença majoritária da enzima lipase ( $36,35 \pm 0,06$  U/mL) no ponto central. O substrato utilizado apresentou um grande

1 Projeto de pesquisa de Pós - Graduação (Mestrado) - Capes

2 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.  
E-mail: dhiessicaquimica@gmail.com;

3 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.  
E-mail: nsnessa@hotmail.com;

4 Mestrando de Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB.  
E-mail: romario13mv@hotmail.com;

5 Docente do Programa de Pós - Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB.  
E-mail: baraquizio@gmail.com;

---

potencial para produção de enzimas de baixo custo, visto que os valores das atividades não foram ruins em relação a outros trabalhos utilizando outros substratos e ainda fazendo o uso de aditivos, sendo assim, o extrato obtido é multienzimático podendo ser aplicado no setor industrial.

**Palavras-chave:** Resíduos, Extrato multienzimático, Amilase, Celulase, Lipase.

## Introdução

Os resíduos gerados no setor agroindustrial, em geral, não são reaproveitados. Dentre os resíduos sólidos, provenientes das indústrias processadoras de frutas, as cascas e sementes descartadas não recebem devida atenção, em decorrência da falta de valor comercial agregado a estes resíduos. Dessa forma, os mesmos podem atuar como fonte de poluição, devido à elevada carga orgânica descartada no meio ambiente. A partir desses substratos, o crescimento de microrganismos pode ser viabilizado e ajuda a mitigar os impactos gerados pela ação industrial (CORREA et al, 2009). Um exemplo de subproduto da agroindústria são os resíduos da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

No Brasil a floração da jaqueira ocorre entre dezembro e abril, os frutos são considerados os maiores do mundo, segundo (GOSWAMI & CHACRABATI, 2016, p.317).

Uma jaqueira pode produzir vários frutos, podendo chegar até 700 por ano, e o fruto pode chegar a 50 Kg em massa. A fruta da jaca é composta por parte externa, casca e partes internas como os bagos ou polpa, mesocarpo, pedúnculo e as sementes. Geralmente as partes consumidas são as sementes cozidas e as bagas *in natura* ou desidratada (SWAMI et al, 2012).

As enzimas são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As enzimas que são provenientes de microrganismos apresentam algumas vantagens sobre as demais, entre as quais se destacam o menor tempo de produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. Essas biomoléculas possuem ampla aplicação biotecnológica como produção de biossurfactantes, medicamentos, reagentes clínicos, cosméticos, produção de biodiesel, tratamento de efluentes e a indústria de laticínios são alguns exemplos da versatilidade de aplicação e propriedades dessas biomoléculas, obtidas pela produção em massa no segmento industrial (WANDERLEY et al, 2011).

No entanto, mesmo com uma vasta variedade de aplicações, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é limitado, em função dos elevados custos de sua produção. Por esse motivo, estudos sobre a utilização de diferentes microrganismos, suplementos e substratos para a produção de enzimas podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obtê-las, com altos rendimentos, utilizando substratos alternativos e condições operacionais que possibilitem a redução dos custos do processo em escala industrial. A produção de enzimas

pode ser incrementada através de processos em estado sólido, como a fermentação em estado sólido – (FES), que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas sólidas, sem excesso de líquido, com uso de fungos filamentosos (NOVAKI et al, 2010).

Os fungos filamentosos vêm atuando junto à FES devido aos baixos níveis de água no sistema e por sua capacidade de crescimento nestas condições. Os microrganismos mais utilizados são *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspegillus*, os quais podem ser utilizados na produção de enzimas ou em enriquecimento proteico (SCHMIDELL et al, 2001). Aproximadamente 90% da produção de enzimas por microrganismos é realizada através da fermentação submersa. No entanto, a fermentação em estado sólido ainda é considerada vantajosa por apresentar maior produtividade dos extratos enzimáticos e maior estabilidade das enzimas como, por exemplo, à variações de temperatura (ZÚÑIGA et al, 2011).

Existem também outras características que torna o processo de grande interesse, como simplicidade no preparo do meio de fermentação, emprego de resíduos, maiores rendimentos e alta concentração do produto, baixo consumo de água, condições de crescimento similar às condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos, menor produção de resíduos, entre outras.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de três enzimas (amilase, celulase e lipase) no extrato sem fermentar e no extrato bruto obtido após a fermentação em estado sólido, utilizando como substrato alternativo, a casca da jaca mole (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), fazendo o uso do fungo filamentoso *Penicillium Camemberti* e otimizar a produção das enzimas em estudo.

## Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório Farmacotécnica, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizado na cidade de Jequié – BA.

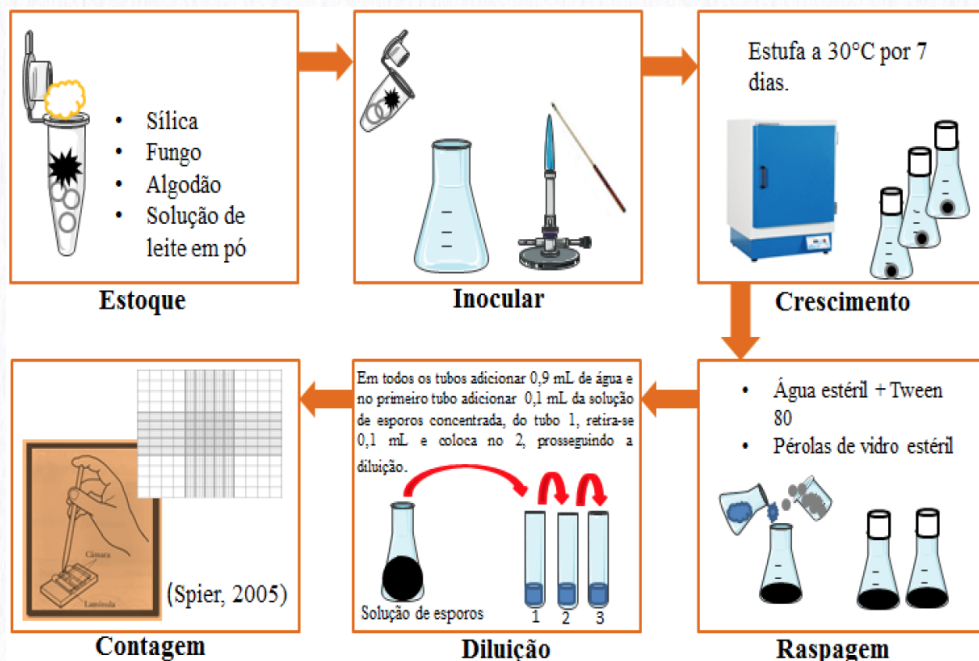
### Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Penicillium Camemberti*, armazenado em sílica, a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

## Preparo do inóculo

O *Penicillium Camemberti* foi inoculado a 30°C, por dez dias, em meio de cultura Potato Dextrose Agar (HIMEDIA). A cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC), a 0,01%. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e observada em microscópio binocular (BIOVAL), (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrado do inóculo do *Penicillium Camemberti*, crescimento e procedimentos utilizados para obtenção da solução de esporos.



Fonte: RIBEIRO, 2017

## Obtenção e preparação do resíduo

O resíduo foi cedido pelos donos de um sítio, localizado no cajueiro na cidade de Jequié – Ba. Posteriormente, as bagas da fruta foram retiradas para consumo e o substrato (resíduo) foi higienizado em água, seco em estufa de secagem com circulação de ar (SOLAB), a 50°C, por 48 horas. A matéria seca (MS) obtida após a secagem do resíduo foi estabelecida a 95,75%. O resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Wiley, com granulometria de 2 mm.

Figura 2. Fruto coletado, higienizado na estufa de secagem com circulação de ar e triturado.



Fonte: Autora

### **Obtenção do extrato do substrato sem fermentar**

Em erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substrato foram adicionadas 25 mL de água destilada, o mesmo foi adicionado a um shaker (SOLAB), a 30°C, 150 rpm, por 30 minutos. Em seguida a mistura foi prensada manualmente para a obtenção do extrato, que foi centrifugado em centrífuga (TECNAL) a 6000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade enzimática.

### **Determinação das condições ótimas para produção das enzimas**

Para otimizar a produção das enzimas amilase, celulase e lipase, através da fermentação em estado sólido utilizando a casca da jaca como substrato e o fungo *Penicillium Camemberti*, foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken 3 níveis. As variáveis independentes analisadas foram concentração de esporos ( $10^x$ /grama de substrato), temperatura (°C) e tempo de fermentação (dias), sob 13 ensaios. O experimento foi realizado em triplicata no ponto central, totalizando 15 ensaios. Na análise dos resultados, os mesmos foram submetidos a metodologia de superfície de resposta (MSR) a qual demonstra a relação entre as variáveis estudadas. O software utilizado para análise dos dados foi o STATISTICA 7 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Matriz do planejamento Box-Behnken para avaliação das condições ótimas na produção das enzimas estudadas quanto à concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação.

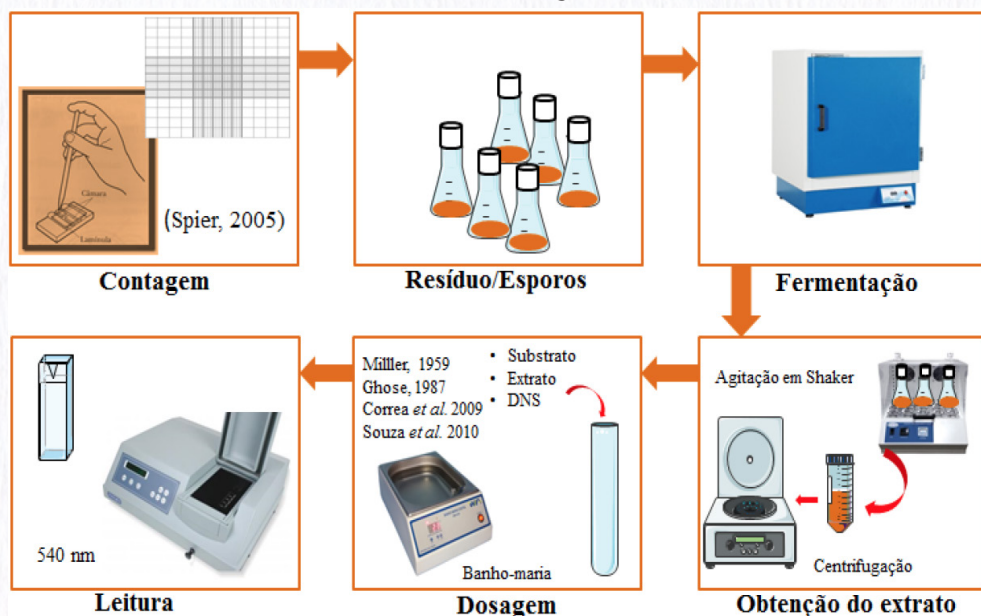
Ensaio	Concentração de esporos	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
1	$10^5$	35	5
2	$10^7$	35	10
3	$10^7$	35	10
4	$10^9$	35	15
5	$10^5$	30	5
6	$10^5$	30	5
7	$10^7$	30	10
7	$10^7$	30	10
7	$10^7$	30	10
8	$10^9$	30	15
9	$10^9$	30	15
10	$10^5$	25	5
11	$10^7$	25	10
12	$10^7$	25	10
13	$10^9$	25	15

### **Processo de fermentação e obtenção do extrato enzimático bruto**

Foram empregados erlenmeyers (250 mL) como biorreatores, com 5 g do substrato. Os erlenmeyers foram autoclavados a 1,0 atm por 15 minutos. Após o resfriamento, inoculou-se a suspensão de esporos na concentração específica para cada ensaio de acordo com planejamento experimental (Tabela 1), variando a concentração de esporos ( $10^5$  a  $10^9$ ). As fermentações foram conduzidas em estufa (SOLAB), variando temperatura (25 a 35 °C) e tempo (5 a 15 dias), a umidade utilizada foi 60%.

Ao final da fermentação foi adicionado 5 mL de água destilada por grama de torta fermentada. A extração enzimática foi realizada em um shaker (SOLAB), a 30°C, 150 rpm, por 30 minutos. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado em centrífuga (TECNAL) a 6000 rpm, por 10 minutos, para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática (Figura 3).

Figura 3. Esquema ilustrando a fermentação em estado sólido, obtenção do extrato enzimático bruto e a dosagem enzimática.



Fonte: RIBEIRO, 2017

## Determinação da atividade enzimática

A atividade das enzimas amilase e celulase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise de cada substrato, diluído previamente em solução tampão acetato de sódio (100 mM), pH 5,0 utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por MILLER, (1959).

O substrato utilizado para determinação da atividade da enzima amilase foi o amido solúvel a 1% (p/v). A avaliação foi conduzida em tubos de ensaio com 100  $\mu$ L de extrato enzimático e 100  $\mu$ L de solução de amido solúvel 1% (p/v). O ensaio branco continha 100  $\mu$ L de água e 100  $\mu$ L de solução tampão. Foi necessário fazer tudo controle devido a coloração do extrato enzimático, contendo 100  $\mu$ L de extrato enzimático e 100  $\mu$ L de água destilada. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria (Cientec CT-266), a 50°C, durante 10 minutos. Para interromper a reação foi adicionado 200  $\mu$ L da solução de DNS (ácido-3,5 dinitrosalicílico), seguida pela submersão dos tubos em banho-maria (SOLAB) a 100°C, por 5 minutos e posterior adição de 2,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (BEL



Photonics SP 2000 UV), conforme metodologia adaptada de (CORREA et al,2009). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  de produto.

Os mesmos procedimentos citados acima foram utilizados para a enzima celulase mudando apenas o substrato. A atividade da enzima celulase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise do, carboximetilcelulose (CMC)a 1% (p/v), metodologia adaptada de (GHOSE, 1987).

Para determinação da atividade da enzima lipase preparou-se duas soluções chamada A e B. A solução A continha em sua composição 60 mg de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) (Sigma-Aldrich), e 20 mL de álcool isopropílico (Synth). Já a solução B apresenta em sua composição 4 g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,4 g de goma arábica (Synth) e 200 mL de tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 7 (Sigma-Aldrich). Em tubos de ensaio foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução A, 1,8 mL da solução B e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. O branco continha 100  $\mu\text{L}$  da solução A, 1,8 mL da solução B e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Os tubos foram incubados a 50 °C por 10 minutos, em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio 1 M (Sigma-Aldrich), posteriormente foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 410 nm, (FERREIRA et al, 2017) com adaptações. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  de produto.

## Resultados e discussão

De acordo com os dados obtidos no extrato sem fermentar, descritos na tabela 2, o mesmo apresenta uma baixa atividade enzimática das enzimas amilase, celulase e lipase. Por este motivo pode-se concluir que o aumento da atividade dessas enzimas após a fermentação em estado sólido será devido ao microrganismo utilizado, pois o mesmo terá acesso aos nutrientes presentes no substrato utilizado, iniciando o processo de fermentação, secretando as enzimas que estão sendo estudadas.

**Tabela 2.** Atividade das enzimas em estudo no extrato da casca da jaca mole (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) sem fermentar.

Enzima	U/mL
Amilase	0,009 $\pm$ 0,023
Celulase	0,095 $\pm$ 0,006
Lipase	0,667 $\pm$ 0,012

Realizou-se um planejamento experimental Box-Behnken 3 níveis para a otimização da produção das enzimas amilase, celulase e lipase, com o intuito de avaliar os principais efeitos das variáveis concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação. A matriz foi descrita na Tabela 1.

O maior valor obtido para a atividade enzimática da amilase ( $20,89 \pm 0,067$  U/mL) é visualizada no ensaio 6, com uma concentração de esporos  $10^5$ , temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e tempo de 5 dias (Tabela 3). Para a celulase ( $22,84 \pm 0,025$  U/mL) no ensaio 5, com uma concentração de esporos  $10^5$ , temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e tempo de 5 dias (Tabela 4) e lipase no ensaio 7, como era o ponto central foi calculada a média da atividade enzimática ( $36,35 \pm 0,06$  U/mL), com uma concentração de esporos  $10^7$ , temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e tempo de 10 dias como pode ser observado na Tabela 5.

**Tabela 3.** Atividade enzimática após fermentação de acordo com planejamento experimental para a enzima amilase.

Ensaio	Concentração de esporos	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Tempo (dias)	Amilase (U/mL)
1	$10^5$	35	5	$17,23 \pm 0,005$
2	$10^7$	35	10	$17,77 \pm 0,015$
3	$10^7$	35	10	$16,69 \pm 0,021$
4	$10^9$	35	15	$15,91 \pm 0,010$
5	$10^5$	30	5	$23,05 \pm 0,037$
6	$10^5$	30	5	$20,89 \pm 0,067$
7	$10^7$	30	10	$13,98 \pm 0,025$
7	$10^7$	30	10	$14,93 \pm 0,026$
7	$10^7$	30	10	$14,45 \pm 0,025$
8	$10^9$	30	15	$17,47 \pm 0,009$
9	$10^9$	30	15	$18,68 \pm 0,029$
10	$10^5$	25	5	$15,23 \pm 0,013$
11	$10^7$	25	10	$14,09 \pm 0,011$
12	$10^7$	25	10	$16,87 \pm 0,039$
13	$10^9$	25	15	$17,41 \pm 0,027$

**Tabela 4.** Atividade enzimática após fermentação de acordo com planejamento experimental para a enzima celulase.

Ensaio	Concentração de esporos	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Celulase (U/mL)
1	10 <sup>5</sup>	35	5	15,23 ± 0,010
2	10 <sup>7</sup>	35	10	19,10 ± 0,027
3	10 <sup>7</sup>	35	10	18,15 ± 0,018
4	10 <sup>9</sup>	35	15	18,72 ± 0,000
5	10 <sup>5</sup>	30	5	22,84 ± 0,025
6	10 <sup>5</sup>	30	5	21,95 ± 0,010
7	10 <sup>7</sup>	30	10	17,53 ± 0,009
7	10 <sup>7</sup>	30	10	16,76 ± 0,013
7	10 <sup>7</sup>	30	10	17,14 ± 0,011
8	10 <sup>9</sup>	30	15	18,49 ± 0,015
9	10 <sup>9</sup>	30	15	17,94 ± 0,023
10	10 <sup>5</sup>	25	5	17,70 ± 0,004
11	10 <sup>7</sup>	25	10	13,39 ± 0,002
12	10 <sup>7</sup>	25	10	14,17 ± 0,009
13	10 <sup>9</sup>	25	15	22,28 ± 0,017

**Tabela 5.** Atividade enzimática após fermentação de acordo com planejamento experimental para a enzima lipase.

Ensaio	Concentração de esporos	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Lipase (U/mL)
1	10 <sup>5</sup>	35	5	14,39± 0,017
2	10 <sup>7</sup>	35	10	13,21± 0,024
3	10 <sup>7</sup>	35	10	14,39± 0,000
4	10 <sup>9</sup>	35	15	19,11± 0,010
5	10 <sup>5</sup>	30	5	19,58± 0,011
6	10 <sup>5</sup>	30	5	20,56± 0,019
7	10 <sup>7</sup>	30	10	34,28± 0,044
7	10 <sup>7</sup>	30	10	38,43± 0,028
7	10 <sup>7</sup>	30	10	36,35± 0,036
8	10 <sup>9</sup>	30	15	15,90± 0,017
9	10 <sup>9</sup>	30	15	13,12± 0,037
10	10 <sup>5</sup>	25	5	22,72± 0,018
11	10 <sup>7</sup>	25	10	18,18± 0,016
12	10 <sup>7</sup>	25	10	19,09± 0,044
13	10 <sup>9</sup>	25	15	14,83± 0,032

Para a produção das enzimas amilase, celulase e lipase, utilizando apenas a casca da jaca mole como substrato, a literatura ainda se encontra carente, visto que dos trabalhos encontrados com a jaca apenas um utiliza as sementes como substrato na fermentação para produção de enzimas (MARQUES et al, 2018). Os resultados encontrados demonstram que o substrato utilizado no presente trabalho pode ser utilizado na fermentação em estado sólido para a obtenção de um extrato multienzimático, visto que o mesmo apresentou atividade de três enzimas.

(CORREA et al, 2009) produziram amilase e celulase com tempo de fermentação de quatro dias, utilizando a mistura da casca do maracujá com o farelo de arroz, para a enzima amilase a atividade máxima encontrada foi 5,5 U/100 g e para a celulase uma atividade de aproximadamente 4,7 U/100g. Muito inferior a que foi encontrada no presente trabalho, visto que a U/g para transformar em U/mL é só dividir por 10, o resultado demonstra que pode-se obter bons resultados utilizando apenas a casca da jaca como substrato.

(SANTOS et al, 2016) encontraram como tempo ótimo aproximadamente três dias, para a produção de celulase, utilizando a palma como substrato. O tempo ótimo de fermentação encontrado na literatura não coincide com o resultado destacado no presente trabalho. No entanto, ressalta-se que as condições utilizadas nos ensaios fermentativos deste trabalho não fizeram uso de aditivos ou suplementos para potencializar a secreção da atividade enzimática encontrada e obteve-se um bom resultado no ensaio 5, descrito na tabela 4, apresentando um tempo de 5 dias.

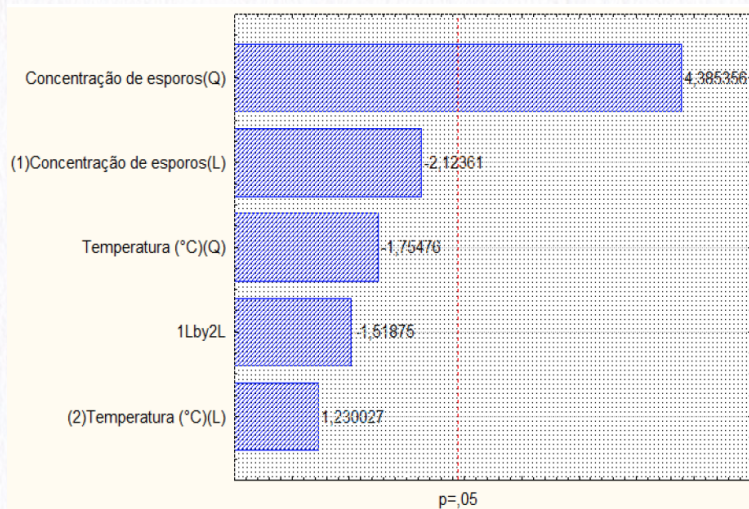
(PENHA et al, 2016) encontraram uma atividade máxima de 72,57 U/g (7,257 U/mL) de lipase, utilizando resíduos de dendê como substrato na fermentação em estado sólido no tempo de dois dias, o presente trabalho encontrou uma resultado melhor em dez dias, no ponto central, descrito na tabela 5.

Devido aos valores de fibra em detergente ácido (38,96%), lignina (15,23%) e celulose (23,73%), aliado aos mecanismos intracelulares que o microrganismo dispõe, possibilitou ao mesmo aproveitar os nutrientes presentes no substrato da casca da jaca mole, permitindo com que houvesse a produção das enzimas citadas. Com isso vale ressaltar que o substrato utilizado no processo de fermentação em estado sólido apresenta potencial para ser aplicado na produção de biomoléculas que são de grande importância industrial.

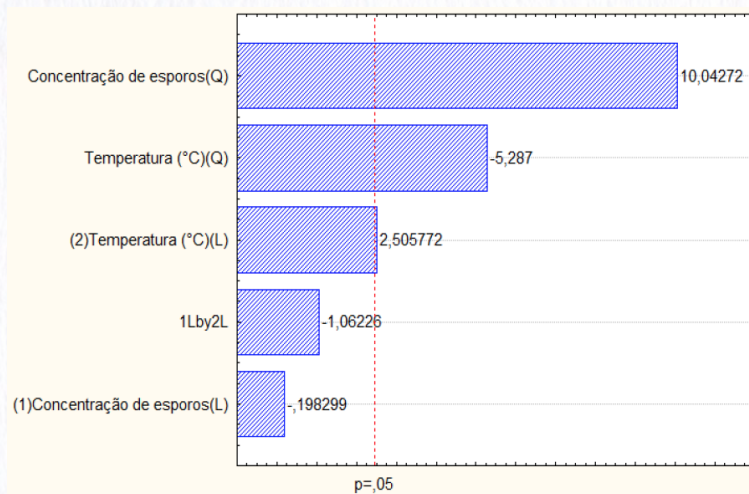
A análise de Pareto com 95% de confiança revelou que os termos estatisticamente considerados significativos para amilase (Figura 4) foi concentração de esporos no modelo quadrático. Para a celulase (Figura

5), concentração de esporos e a temperatura, ambas no modelo quadrático foram significativas e para a lipase (Figura 6), apresentou a contração de esporos e a temperatura significativas no modelo quadrático e temperatura no modelo linear.

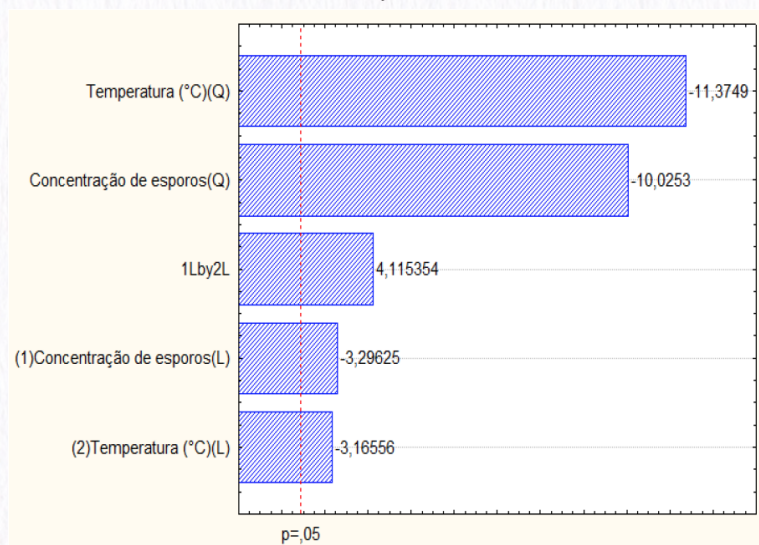
**Figura 4.** Diagrama de Pareto para concentração de esporos 10x, temperatura (°C) e tempo (dias) para otimização da obtenção de amilase por *Penicillium Camemberti* através da fermentação em estado sólido.



**Figura 5.** Diagrama de Pareto para concentração de esporos 10x, temperatura (°C) e tempo (dias) para otimização da obtenção de celulase por *Penicillium Camemberti* através da fermentação em estado sólido.



**Figura 6.** Diagrama de Pareto para concentração de esporos  $10^x$ , temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (dias) para otimização da obtenção de lipase por *Penicillium Camemberti* através da fermentação em estado sólido.



A qualidade do modelo pode ser verificada através do coeficiente de variância  $R^2$ . Quanto mais próximo do valor 1 significa que o modelo matemático se ajustou bem aos dados. Também deve ser avaliado ainda o teste de Fisher (F). Na regressão, o F calculado deve ser maior que o F tabelado e na falta de ajuste o F calculado deve ser menor que o F tabelado.

A Tabela 6 descreve os dados obtidos da ANOVA para a amilase, onde revela que o F calculado foi menor que o tabelado na regressão e a falta de ajuste foi significativa, apresentando um  $R^2$  de 0,47, indicando que 74% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado. O modelo não foi estatisticamente significativo, a 95% de confiança e não foi possível a visualização das condições ótimas.

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) pela Matriz Box-Behnken em 95 % de intervalo de confiança, para a amilase.

	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	42,21090	5	8,442179595	1,646299401	3,481659
Resíduos	46,15176	9	5,127973437		
Falta de ajuste	38,20224	3	12,73408	9,61120	4,75706
Erro puro	7,94953	6	1,32492		
Erro total	88,36266	14			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

A Tabela 7 descreve os dados obtidos da ANOVA para a celulase, onde revela que o F calculado foi menor que o tabelado na regressão e a falta de ajuste foi significativa, apresentando um  $R^2$  de 0,36 indicando que apenas 36% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado, isso pode ser justificado pelo fato de trabalhar com microrganismo devido a outras variáveis além da concentração de esporos, temperatura e tempo influenciar na produção de enzimas, e uma solução seria utilizar outro planejamento.

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) pela Matriz Box-Behnken em 95 % de intervalo de confiança, para a celulase.

	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	38,4205	5	7,684090881	1,03252544	3,481659
Resíduos	66,9783	9	7,442035402		
Falta de ajuste	65,3834	3	21,79448	81,9919	4,7570627
Erro puro	1,5949	6	0,26581		
Erro total	105,3988	14			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

A Tabela 8 descreve os dados obtidos da ANOVA para a lipase, onde revela que o F calculado foi menor que o tabelado e a falta de ajuste foi significativa, apresentando um  $R^2$  de 0,58 indicando que 58% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado.

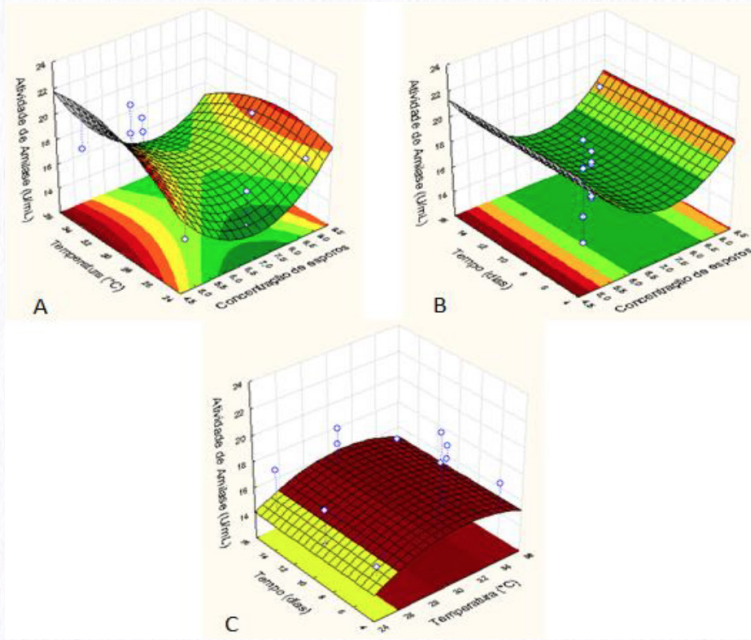
**Tabela 8.** Análise de variância (ANOVA) pela Matriz Box-Behnken em 95 % de intervalo de confiança, para a lipase.

	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	592,142	5	118,4285	2,54976226	3,481659
Resíduos	418,022	9	46,44688		
Falta de ajuste	403,952	3	134,6508	28,7112	4,757063
erro puro	14,069	6	2,3449		
erro total	1010,164	14			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

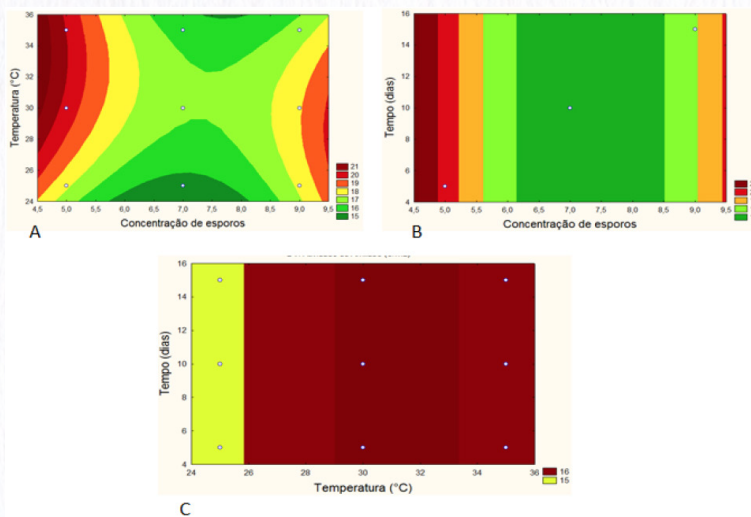
Como para a enzima amilase a única variável significativa foi a concentração de esporos, na Figura 7 e 8, não foi possível avaliar as condições ótimas para obtenção da enzima, nesse caso é necessário fazer modificações no planejamento utilizado ou mudar de planejamento.

Figura 7. Superfície de resposta para obtenção de amilase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.



Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).

Figura 8. Curva de nível para obtenção de amilase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.

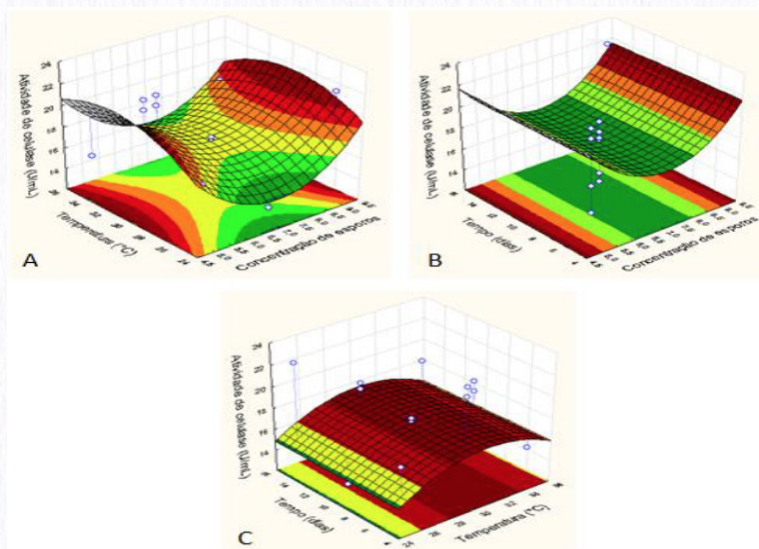


Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).



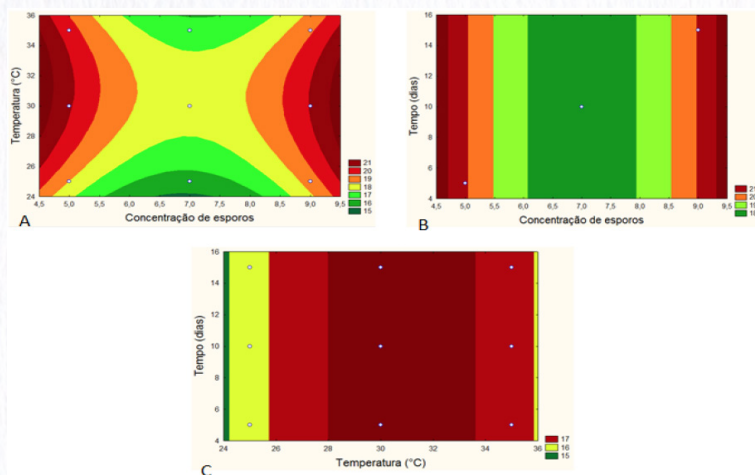
Para otimização da enzima celulase também não foi possível visualizar as condições ótimas para produção da mesma (Figuras 9 e 10), sendo o mesmo ocorrido com enzima amilase.

Figura 9. Superfície de resposta para obtenção de celulase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.



A: Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).

Figura 10. Curva de nível para obtenção de celulase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.

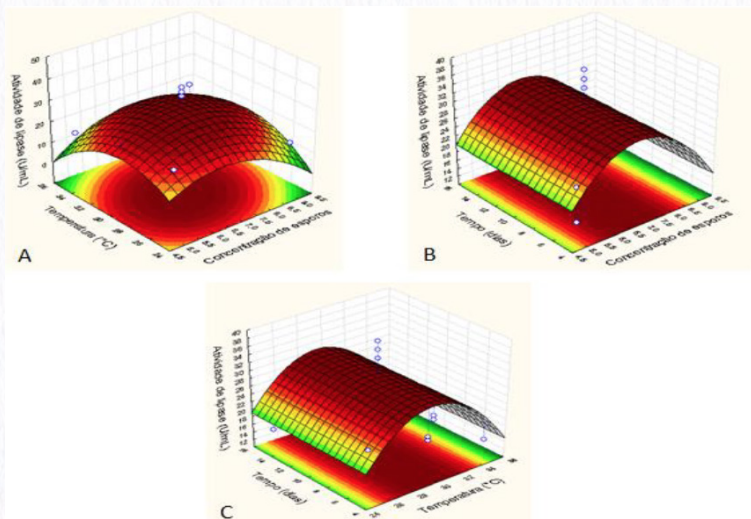


Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).

As figuras 11 e 12 demonstram que a concentração de esporos e a temperatura foram variáveis significativas para a produção da enzima lipase, nesse caso foi possível visualizar a região ótima para produção da enzima. A concentração de esporos apresentou uma faixa ótima de  $10^6$  a  $10^{7,5}$ , nesse caso o ideal é trabalhar com a concentração  $10^7$ , a faixa de temperatura foi de 26 a 31 °C.

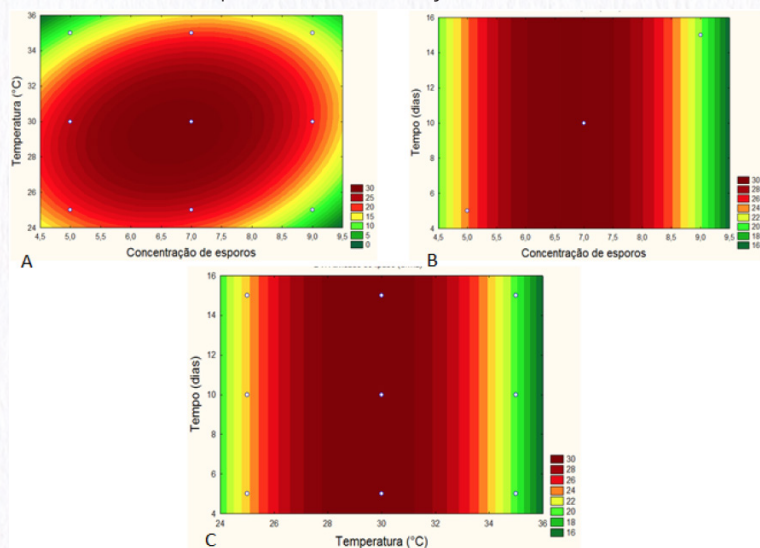
Os microrganismos são induzidos a produzir metabólitos através de substratos específicos. Segundo (BON, 2008), a presença de amido no meio é estimulada a produção da enzima amilase. A celulose será hidrolisada pela enzima celulase, para que o microrganismo venha consumir a glicose. A lipase tem a capacidade de quebrar a molécula de lipídeos.

Figura 11. Superfície de resposta para obtenção de lipase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.



Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).

Figura 12. Curva de nível para obtenção de lipase por *Penicillium Camemerti*, a partir de casca da jaca mole.



Concentração de esporos x Temperatura (°C); B: Concentração de esporos x Tempo (dias); C: Temperatura (°C) x Tempo (dias).

Mesmo que não foi possível otimizar a produção das enzimas, os resultados apresentados demonstram que o substrato casca de jaca mole utilizado juntamente com o microrganismo *Penicillium Camemberti* na fermentação em estado sólido se torna uma alternativa para a produção de extratos multienzimáticos, que podem ser aplicados no setor industrial, como por exemplo, para a fabricação de detergentes. As enzimas obtidas no presente trabalho podem ser aplicadas na indústria de detergentes, na retirada de manchas (HEMLATA et al, 2016).

## Considerações finais

De acordo com os dados apresentados, a fermentação em estado sólido, empregando como substrato a casca da jaca mole e o fungo *Penicillium Camemberti*, demonstrara que o substrato pode ser utilizado nesse tipo de processo para a produção de enzimas, processo que faz o aproveitamento de um resíduo, podendo ser considerado de baixo custo. E a produção foi realizada apresentando bons valores de atividade enzimática mesmo sem o uso de aditivos na fermentação. Os resultados obtidos no planejamento experimental Box-Benhken para as enzimas amilase e celulase não se ajustaram bem ao modelo matemático. Já os

---

dados obtidos para a enzima lipase, mesmo que o  $R^2$  foi de 0,58, houve a visualização da região ótima considerando as variáveis significativas, concentração de esporos e temperatura. O trabalho contribui e confirma que, tecnologias alternativas como a fermentação em estado sólido, viabilizam a produção de biocompostos de alto valor agregado, como as enzimas que podem ser obtidas a partir de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais e que apresentam importância no setor industrial.

## Referências

BON S. P. E. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado. **Universidade Federal do Rio de Janeiro** – Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Portugal, 2008.

CORREA S.L.; ROCHA P.C.; FILHO C. U.; CARDOZO L. V. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. dos S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. de O.; DE FREITAS, J. S.; VALASQUES JUNIOR, G. L.; FRANCO, M. NASCIMENTO JUNIOR, B. B. Production of lipase from *Penicillium* sp. Using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, 2017, VOL. 204, NO. 10, 1167–1173. Doi: 10.1080/00986445.2017.1347567.

GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. Pure Andamp; **Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOSWAMI, C.; CHACRABATI, R. Jackfruit (*Artocarpusheterophylus*).In Preed, V. R.; Simmonds, M. S. J (Org.). Nutritional composition of fruit cultivars, E.U.A.: **Elsevier**, Cap. 14, 2016, p. 317-335.

HEMLATA, B.; UZMA, Z.; TUKARAM, K.Substrate kinetics of tiol activated hyperthermostable alkaline lipase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in bio-detergent formulation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (2016), pp.104-111.

MARQUES, G.L.; SILVA, T.P.; LESSA, O. A.; DE BRITO, A.R.; REIS, N.S.; FERNANDES, A.G. DE A.; FERREIRA, M.L.O.; OLIVEIRA, J.R. ; FRANCO, M. Producción de xilanasa y endoglucanasa por fermentación em estado sólido del residuo de yaca. **Manuscrito sometido a la Revista Mexicana de Ingeniería Química**, 2018.

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

---

NOVAKI A.; HASAN M. D. S.; KADOWAKI K. M.; ANDRADE D. Produção de Invertase por Fermentação em Estado Sólido a partir de Farelo de Soja. **Engevista**, V. 12, n. 2.p. 131-140, 2010.

PENHA, E, M; VIANA, L, A, N; GOTTSCHALK, L, M, F; TERZI, S, C; SOUZA, E, F; De FREITAS, S, C; SANTOS, J, O; SALUM, T, F, C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.46. n.4. p.755-761. 2016.

RIBEIRO, D. dos S.; Obtenção de enzimas a partir da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). **Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, p. 24 e 29, 2017.

SANTOS C. T.; FILHO A. G.; BRITO R. A.; PIRES V. J. A.; BONOMO F. C. R.; FRANCO M. Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus Niger* and *Rhizopus SP.* by Solid State Fermentation of Prickly Pear. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222 – 233, jan. – mar, 2016.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONI, E.; BORZANI W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, EdgardBlücherLtda, vol.2, 2001.

SWAMI, S. B. S.; THAKOR, N. J.; HALDANKAR, P. M.; KALSE, S. B. Jackfruit and its man functional components as related to human health: A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.11, p. 565-576, 2012.

WANDERLEY D. M.; NEVES E.; ANDRADE J. C. Aspectos da Produção Industrial de Enzimas. **Revista Citino**, Vol. 1, N° 1, 2011.

ZÚÑIGA, R. F. U.; FARINAS S. C.; NETO B. V.; COURI S.; CRESTANA S. Produção de celulasas por *Aspergillusniger*por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.