

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

RAIANE VIEIRA CHAVES

**SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO
DE AMILASE MICROBIANA**

**IMPERATRIZ
2018**

RAIANE VIEIRA CHAVES

**SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO
DE AMILASE MICROBIANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adriana Crispim de Freitas

**IMPERATRIZ
2018**

**Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA**

Vieira Chaves, Raiane.

Subprodutos do coco babaçu como substrato para a produção de amilase microbiana / Raiane Vieira Chaves. - 2018.

31 f.

Orientador(a): Adriana Crispim de Freitas.

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz-MA., 2018.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Fungo filamentoso. 3. Planejamento experimental. 4. Resíduo agroindustrial. I. Crispim de Freitas, Adriana. II. Título.

RAIANE VIEIRA CHAVES

SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE
AMILASE MICROBIANA

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Maria Alves Fontenele (Membro)
Universidade Federal do Maranhão

MSc. Djany Souza Silva (Membro)
Universidade Federal do Maranhão

A DEUS, pelo dom da vida e sabedoria, que me guiou a todo instante e me encorajou para enfrentar as barreiras e estar aqui hoje.
Aos meus avós, Otacílio e Jacira (in memoriam) que sempre acreditaram e contribuíram para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e principalmente, a Deus, por me dar forças para superar cada dificuldade e desafios, sem medo de tropeçar.

A toda minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso, em especial ao meu padrinho Jean Pierr, que sempre me incentivou e batalhou para que eu pudesse ter a oportunidade de uma vida melhor.

A minha mãe, Alzenira Vieira, por sempre me acalmar nas horas em que mais precisei, com palavras de amor e carinho.

A minha querida orientadora, Adriana Crispim, que desde o início desta caminhada tem me ensinado a ser uma pessoa melhor em todos os sentidos, toda a minha admiração e amor por você.

A Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de realizar a minha formação acadêmica nesta instituição de ensino.

A todos os professores que tive a oportunidade de conviver durante a graduação, pois os seus ensinamentos foram de suma importância para a minha formação.

Ao grupo PET- Conexões de Saberes, pois foi onde tudo começou e que eu tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, entre elas, a minha orientadora. Agradeço imensamente a cada integrante do grupo pela receptividade e vivência enquanto petiana.

Aos amigos e companheiros do LABIOP, Iago Hudson, Ludimila Araújo, Cristian Neres, Gleyce Kelly e Thalyne Mariane, muito obrigado por todos os momentos de aprendizados vividos e troca de experiências.

As amigas que a UFMA me deu, Denise Pereira e Suzane Karine, por todas as vezes que rimos juntas dos nossos próprios problemas e assim, tudo se tornou mais fácil.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte deste período da minha vida, muito obrigada!

RESUMO

A fermentação em estado sólido é considerada uma ferramenta importante na produção de enzimas de origem microbiana. O fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* possui destaque na produção de enzimas por sua capacidade de excreção de grande variedade de enzimas. O crescente interesse em processos biotecnológicos, empregando resíduos agroindustriais é justificado, por serem fontes de nutrientes baratas, disponível e podendo agregar valor a estes resíduos. O objetivo do estudo foi analisar a concentração e as combinações de substratos e tempo de fermentação na síntese de amilase por *Aspergillus oryzae*. Endocarpo, mesocarpo e borra de babaçu, sozinhos ou em combinações, foram utilizados como substratos para a produção de amilases por fermentação em estado sólido utilizando planejamento experimental do tipo simplex-lattice. A maior produção de amilase ocorreu após 48 horas de fermentação em meio contendo endocarpo (1/3), mesocarpo (1/3) e borra do babaçu (1/3). Contudo, foi no período de 24 horas que a produtividade foi maior. O efeito sinérgico foi observado nas misturas binárias de endocarpo e mesocarpo, e mesocarpo e borra de babaçu onde obteve-se as melhores respostas para a produção de amilase. Os resultados sugerem que a aplicação dos delineamentos de misturas é um método que melhora a produção de amilase e identifica formulações ótimas usando diferentes substratos.

Palavra-chave: Fermentação em estado sólido. Resíduo agroindustrial. Fungo filamentosso. Planejamento experimental.

ABSTRACT

Solid-state fermentation is an important tool in the production of enzymes of microbial origin. The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is prominent in the production of enzymes due to its ability to excrete a great variety of enzymes. Increased interest in biotechnological processes, using agro-industrial waste is justified by these sources of low-cost nutrients, in addition to being able to add value to these wastes. The objective of this study was to analyze the concentration and combinations of substrates and fermentation time in the amylase synthesis by *Aspergillus oryzae*. Endocarp, mesocarp and babassu pie, either alone or in combination, were used as substrates for the production of amylases by solid-state fermentation using a simplex-lattice type experiment. Further production of amylase is obtained after 48 hours of fermentation in medium containing endocarp (1/3), mesocarp (1/3) and babassu pie (1/3). However, it was within the 24 hour period that productivity was higher. The synergistic effect was observed in the binary mixtures of endocarp and mesocarp, and the mesoarp and the pie were obtained as the best responses for amylase production. The results obtained are an application of the mix designs, which is a method that improves amylase production and identifies optimal formulations for different substrates.

Keywords: Solid-state fermentation. Agroindustrial waste. Filamentous fungus. Experimental planning.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Materiais e métodos.....	12
2.1 Substratos.....	12
2.2 Caracterização físico-química dos substratos.....	13
2.3 Agente de fermentação.....	13
2.4 Seleção do substrato e formulação do meio de fermentação.....	13
2.5 Planejamento Composto Central Rotacional.....	14
2.6 Determinação da atividade enzimática.....	14
3. Resultados e discussão.....	14
3.1 Caracterização da composição centesimal dos substratos.....	14
3.2 Delineamento de mistura do tipo Simplex-Lattice.....	15
3.3 Delineamento composto rotacional central.....	19
4. Conclusão.....	21
Referências.....	22
Anexos.....	25

SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE AMILASE MICROBIANA

Raiane Vieira CHAVES^a; ¹Adriana Crispim de FREITAS^a

^aDepartamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Avenida da Universidade S/N, Imperatriz, Maranhão, Brasil, raianeufma@gmail.com, adrianaufma@gmail.com.

RESUMO

A fermentação em estado sólido é considerada uma ferramenta importante na produção de enzimas de origem microbiana. O fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* possui destaque na produção de enzimas por sua capacidade de excreção de grande variedade de enzimas. O crescente interesse em processos biotecnológicos, empregando resíduos agroindustriais é justificado, por serem fontes de nutrientes baratas, disponível e podendo agregar valor a estes resíduos. O objetivo do estudo foi analisar a concentração e as combinações de substratos e tempo de fermentação na síntese de amilase por *Aspergillus oryzae*. Endocarpo, mesocarpo e borra de babaçu, sozinhos ou em combinações, foram utilizados como substratos para a produção de amilases por fermentação em estado sólido utilizando planejamento experimental do tipo simplex-lattice. A maior produção de amilase ocorreu após 48 horas de fermentação em meio contendo endocarpo (1/3), mesocarpo (1/3) e borra do babaçu (1/3). Contudo, foi no período de 24 horas que a produtividade foi maior. O efeito sinérgico foi observado nas misturas binárias de endocarpo e mesocarpo, e mesocarpo e borra de babaçu onde obteve-se as melhores respostas para a produção de amilase. Os resultados sugerem que a aplicação dos delineamentos de misturas é um método que melhora a produção de amilase e identifica formulações ótimas usando diferentes substratos.

Palavra-chave: fermentação em estado sólido; resíduo agroindustrial; fungo filamentosso; planejamento experimental

¹Autor correspondente: Adriana Crispim de Freitas, Universidade Federal do Maranhão, Curso de Engenharia de Alimentos, Avenida da Universidade, s/n, Bairro Dom Afonso Felipe Gregory – Imperatriz/MA, CEP: 65915-060, Fone: (99)981719890, e-mail: adrianaufma@gmail.com.

1. Introdução

As enzimas são proteínas que realizam reações químicas e são largamente utilizadas em diversas áreas, desde processos industriais, como na produção de alimentos, biocombustíveis e tecidos, até aplicações terapêuticas mais complexas, como biofármacos. O mercado global de enzimas é crescente, estimativas indicam que ela deva atingir US\$ 5,4 bilhões em 2020. Atualmente, os fabricantes de detergentes são os maiores consumidores desses insumos e o principal fator que leva a este aumento é a alta demanda de bens de consumo, biocombustíveis, necessidade de redução de custos e otimização de recursos no processo de produção (Canal, 2018; Market e Market, 2015).

As principais enzimas utilizadas na indústria de alimentos são: hidrolases, oxidoreduções e transferases. Como parte do grupo das hidrolases, as enzimas amilolíticas são as mais utilizadas em processos de produção de alimentos, responsáveis por catalisar a hidrólise de α -1,4 e α -1,6 de ligações glicosídicas que fazem parte da estrutura do amido. As amilases microbianas são amplamente utilizadas na hidrólise completa do amido, em processos na indústria têxtil e estão comercialmente disponíveis (Coelho et al., 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é uma ferramenta importante na obtenção de enzimas de origem microbiana. O processo fermentativo ocorre com o crescimento do microrganismo no interior ou superfície do substrato sólido ausente de água livre aparente. A FES é uma técnica que possui diversas características vantajosas, sendo a principal característica a utilização de baixa atividade de água nos substratos tornando o ambiente de crescimento de microrganismos muito semelhante ao habitat natural, sendo um processo considerado vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos. Ademais, proporciona maior facilidade de obtenção de esporos, maior estabilidade das enzimas a mudanças de temperatura, pH e maior produtividade de extratos enzimáticos, quando comparada a outras técnicas. Outra particularidade desta metodologia é a possibilidade de utilização de subprodutos agroindustriais como substratos fermentativos, servindo como fonte de energia e carbono para produção de substâncias de alto valor agregado (Ractz, 2015; Freitas et al., 2013).

Variadas espécies de fungos filamentosos têm sido exploradas em processos industriais para a produção de metabólitos e enzimas. O *Aspergillus oryzae* é um fungo muito utilizado no setor industrial por sua capacidade de excreção de grande variedade de enzimas. Na literatura é citado por sua capacidade de secretar grande número de proteínas quando cultivado em FES,

além de sua vasta aplicação em processos fermentativos utilizando como substratos subprodutos agroindustriais (Freitas et al. 2013; Penha et al. 2016).

A escolha de um substrato sólido é considerada um fator crítico para o aumento da produtividade enzimática. No Brasil, subprodutos agroindustriais estão presentes em abundância devido à grande produção industrial, baixo custo comercial e, em alguns casos sendo comumente descartados e contribuindo para a poluição ambiental. O babaçu, *Orbignya sp.*, é uma palmeira robusta relacionada ao extrativismo vegetal, com altura de até 20 metros e diâmetro variando de 25 a 44 centímetros, produzindo mais de 1000 frutos cada árvore. Estes frutos são lenhosos, ovais alongados, com polpa fibrosa-farinácea, denominados de coco babaçu, apresenta uma composição de 12-18% de epicarpo (material-fibroso), 17-22% de mesocarpo (material amiláceo), 52-60% de endocarpo constituído por vários minerais e 6-8% de amêndoa oleaginosa, a parte que é extraído o óleo, resultando na borra que é um subproduto (Ractz, 2015; Brandão et al., IBGE, 2013; Teixeira, 2008).

O Brasil possui em cerca 25 bilhões de árvores com capacidade para produzir 7 bilhões de toneladas de óleo por ano. A extração do óleo da amêndoa é seu único aproveitamento, enquanto o restante do fruto tem pouca ou nenhuma aplicação industrial significativa. O uso dos subprodutos do coco babaçu como substratos no desenvolvimento de processos biotecnológicos, como a produção de enzimas por estado sólido é um exemplo promissor de se obter biomoléculas com alto valor agregado de baixo custo (Portal, 2018; Ractz, 2015; Brandão et al., IBGE, 2013; Teixeira, 2008).

Diversos estudos para produção de enzimas microbianas utilizando diferentes substratos são encontrados na literatura. Porém, há poucos estudos que utilizem ferramentas estatísticas para avaliar as interações das variáveis de processo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo analisar a concentração e combinações de substratos e tempo de fermentação na síntese de amilases por *Aspergillus oryzae*.

2. Materiais e Métodos

As análises e experimentos realizados neste estudo, foram realizadas na Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz-MA.

2.1. Substratos

Os substratos utilizados foram o mesocarpo, endocarpo e a borra de babaçu provenientes da extração do óleo de coco babaçu. O mesocarpo e a borra de babaçu foram obtidos na

Associação de Quebradeiras de coco da cidade de Cidelândia, Maranhão, Brasil. O endocarpo foi cedido pela indústria Tobasa Bioindustrial de Babaçu localizada na cidade de Tocantinópolis, Tocantins, Brasil. Para a obtenção do meio de fermentação a borra do babaçu passou por um tratamento adicional, onde a mesma passou pelo processo de secagem em estufa a 40° C por 16 horas.

2.2. Caracterização físico-química dos substratos

Foram realizadas as determinações de proteínas, lipídios, umidade, atividade de água, cinzas e carboidratos totais realizadas para o mesocarpo, endocarpo e borra do babaçu de acordo com as metodologias do Instituto Adolfo Lutz 2008.

2.3. Agente de fermentação

A linhagem do fungo filamentosso utilizado neste trabalho foi *Aspergillus oryzae* CCBP001, pertencente a coleção da Embrapa Agroindústria Tropical. Os esporos do *A. oryzae* estocado em solo estéril e sob condições de congelamento (-18°C) foram periodicamente subcultivadas e mantidas em ágar batata dextrose inclinado. Para a produção dos esporos fúngicos, o microrganismo foi inoculado em um meio composto por 10 g de farelo de trigo e 4 ml de uma solução contendo NaHPO₄ a 1,7% (m/v) e (NH₄)₂SO₄ a 2,0% (m/v) e incubados 30° C por 5 dias. Após a esporulação em farelo de trigo, o inóculo foi conservado a 4° C. Os esporos dos fungos foram suspensos em solução estéril Tween 80 (0,3%) para ser utilizado nas fermentações. A concentração do inóculo utilizado foi de 10⁷ esporos/g de meio determinada através da contagem em câmara de Neubauer.

2.4. Seleção do substrato e formulação do meio de fermentação

Foi realizado um estudo de formulação do meio de fermentação e cinética de produção enzimática amilolítica, através de delineamento experimental de mistura tipo Simplex Lattice. Os três componentes para a mistura foram analisados nas seguintes proporções: 1 (100%), 0 (0%), 1/3 (33,33%) e 2/3 (66,67%) de um total de 20 gramas de substrato para cada reator, visando a obtenção de maior atividade amilolítica. A formulação foi composta por meios individuais, misturas binárias e ternárias dos substratos mesocarpo, endocarpo e borra de babaçu nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, totalizando 40 ensaios. O extrato bruto foi obtido a partir da adição de 50 ml de água, seguida de incubação a 30 °C por 1 hora e filtrado em papel

filtro qualitativo para obter uma solução enzimática livre de qualquer material sólido. Após a definição das condições otimizadas de meio, umidade e tempo de fermentação a partir dos delineamentos experimentais novos ensaios de FES foram realizados, totalizando 40 ensaios estudados nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.

Para obtenção do delineamento experimental, análise de dados e construção do modelo foi utilizado o software *Statistica*TM 10 da Statsoft Inc. (Tulsa, Oklahoma, USA).

2.5. Etapa de otimização

Com o intuito de otimizar o processo anterior realizou-se um planejamento de experimentos Planejamento Composto Central Rotacional, afim de construir modelos preditivos com poucos fatores. Os níveis utilizados deste planejamento estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Codificação e distribuição das variáveis utilizadas no DCCR

Variáveis	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Temperatura	22,95	25	30	35	37,05
Suplementação	0,59	1	2	3	3,41

2.6. Determinação da atividade enzimática

Em banho termostático a 37° C foi aclimatado 1 ml de solução de amido 2%, em seguida 1 ml do extrato enzimático amilolítico reagiu com a solução de amido durante 15 minutos. A reação foi paralisada por meio da adição de 0,5 ml de NaOH 1N, conseguinte a isto, levou-se 1 ml da solução resultante para ser misturado a 1ml de DNS. Esta solução foi aquecida em banho maria a 100° C por 5 minutos. A determinação da atividade amilolítica foi realizada através da leitura das soluções em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, os valores das absorbâncias foram relacionados as respectivas curvas padrões de DNS. Uma unidade de atividade amilolítica (U) corresponde a 1 µmol de glicose liberado por ml, por minuto nas condições de reação.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da composição centesimal dos substratos

A Tabela 2 apresenta os resultados da composição centesimal dos subprodutos mesocarpo, endocarpo e borra do babaçu. O mesocarpo e endocarpo obtiveram altos valores de carboidratos totais (83,74 e 81,43%) e teores de umidade (13,16 e 11,14%) e atividade de água semelhantes quando comparados aos da borra do babaçu. O teor de lipídios e proteínas da borra foram superiores aos valores obtidos aos demais substratos. Os resultados obtidos para o mesocarpo são análogos aos apresentados por Silva 2011. A composição centesimal da borra do babaçu corrobora com os valores estabelecidos pelo Dossiê Técnico de Cultivo e Extração do Óleo, com exceção aos teores de umidade e lipídios que ultrapassaram o valor máximo estabelecido de 12%, para ambos (Carvalho, 2007).

Tabela 2 - Valores médios da composição centesimal do mesocarpo, endocarpo e borra do babaçu.

Componentes químicos	Mesocarpo	Endocarpo	borra do Babaçu
Atividade de água	0,68	0,59	0,99 [*]
Umidade	13,16%	11,14%	62,68% [^]
Proteínas	0,35%	0,69%	2,00%
Cinzas	1,11%	4,24%	1,44%
Lipídios	1,67%	2,50%	17,77%
Carboidratos Totais	83,74%	81,43%	16,56%

*Matéria prima antes do processo de secagem

3.2. Delineamento de mistura tipo simplex-lattice

A Tabela 4 apresenta os valores referentes a composição do meio e os resultados de atividade amilolítica obtidos para cada ensaio.

Tabela 3 - Delineamento experimental de misturas tipo Simplex-Lattice e suas respectivas respostas nos tempos fermentativos, sendo A: endocarpo, B: mesocarpo e C: borra do babaçu

Ensaio	Atividade amilolítica (U/g ⁻¹)						
	A	B	C	24h	48h	72h	96h
1	100%	0%	0%	27,35	31,45	31,82	28,58
2	0%	100%	0%	26,33	29,28	24,03	22,98
3	0%	0%	100%	21,03	26,66	29,74	28,36
4	33%	67%	0%	25,76	29,92	27,53	26,04
5	33%	0%	67%	23,29	29,52	23,04	17,20
6	0%	33%	67%	27,16	31,86	25,56	24,51
7	67%	33%	0%	26,28	30,33	29,70	22,58
8	67%	0%	33%	24,51	26,54	21,03	19,39
9	0%	67%	33%	28,75	31,42	28,12	26,39
10	33%	33%	33%	20,29	31,89	28,23	24,14

A maior atividade amilolítica encontrada foi de 31,89 U/g após 48 horas de processo fermentativo em meio contendo endocarpo (1/3), mesocarpo (1/3) e borra do babaçu (1/3). A produção de amilase nesse ensaio é creditada pela presença do amido presente nos substratos como o mesocarpo do babaçu, com 65% de amido em sua composição (Carraza, 2012).

Outros ensaios em que o mesocarpo está presente, foi observado uma produção significativa assim como nos ensaios em que o mesocarpo se encontrava ausente. Essa explicação é dada pelo fato de que ao retirar o conteúdo oleaginoso da amêndoa o que resta são carboidratos como fibras e amido garantindo substrato para o processo fermentativo (Carraza, 2012).

De forma geral, em 48 h de fermentação foram os ensaios que obtiveram maior produção. No entanto, avaliando a produtividade, produção por hora, os ensaios de 24 horas foram os que apresentaram resultados, em média, mais satisfatórios. A média de produtividade para os ensaios de 24, 48, 72 e 96 h foram igual a 1,197 U/g.h⁻¹, 0,666 U/g.h⁻¹, 0,441 U/g.h⁻¹ e 0,297 U/g.h⁻¹, respectivamente.

Como evidenciado na Tabela 4, o modelo matemático da superfície (Eq.1) prevista representa o modelo com os substratos significativos para a produção de amilase em 24 horas de fermentação. Todas as variáveis respostas independentes foram adequadas ao modelo cúbico espacial (Rheiner et al., 2016; Kurosawa et al., 2009).

Tabela 4 - Análise de Variância (ANOVA), equação, R^2 para a produção de amilase em 24h de fermentação

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F	R	p- valor
Regressão	68, 84304	6	11, 47384	89,09378	0,9944	<0,1
Residual	0, 38635	3	0,12878			
Total	69, 22940	9	7,69216			

% variação explicada (R^2) = 99,0% ; $F_{6; 3; 0,1} = 9,78$

Os coeficientes de determinação R^2 e F test (ANOVA) foram utilizados para verificar a significância do modelo.

O valor de R^2 se encontra maior que 0,9. Este valor se encontra na faixa ideal e é significativo podendo ser usado para prever a produção de amilase a partir da mistura desses substratos.

Efeitos sinérgicos e antagônicos entre os resíduos agroindustriais utilizados na produção de amilase foi detectada em todos os tempos estudados no processo fermentativo. O resultado de 24 horas de fermentação foi estatisticamente significativo a um nível de 90% de confiança, com $R^2 = 0,99$. O ensaio 10, composto por mistura ternária, em 48 horas de fermentação apresentou maior valor de atividade, comparado ao demais, porém não significativos estatisticamente. A relação entre os diferentes subprodutos da produção de óleo babaçu e a atividade amilolítica é representada no gráfico ternário. Cada componente de mistura pura é representada em um canto do triângulo equilátero. Assim, cada ponto dentro do triângulo corresponde a uma fração diferente dos componentes de mistura. O centro do triângulo por sua vez, corresponde as proporções iguais da mistura.

A escolha do substrato sólido é de extrema importância para o processo fermentativo, uma vez que ele deve fornecer os nutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo. Portanto, a partir do delineamento experimental de misturas foi possível observar preliminarmente o meio em que houve a maior atividade amilolítica e a avaliação das matérias-primas em diferentes proporções na formulação e interação através de mistura binária e ternária durante o estudo cinético da produção enzimática.

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta ternária resultante ao modelo aplicado e ilustra o efeito dos substratos avaliados sobre a atividade amilolítica em 24 horas de fermentação.

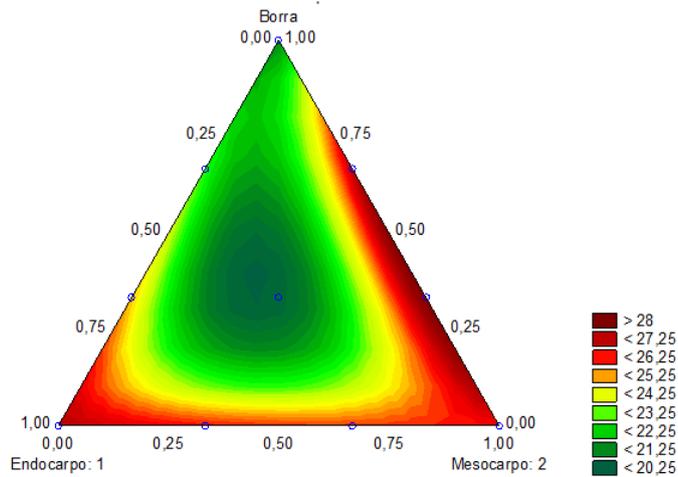


Figura 1- Superfície de resposta ternária de mistura sendo A: endocarpo, B: mesocarpo e C: borra do babaçu.

De acordo com o modelo cúbico espacial, notou-se que o mesocarpo e a borra são os substratos que possuem maior impacto dentro da produção de amilase.

A Figura 2 apresenta os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelos modelos associados às respostas. Observa-se uma boa concordância entre eles, como era de se esperar com base nos resultados das análises de variâncias.

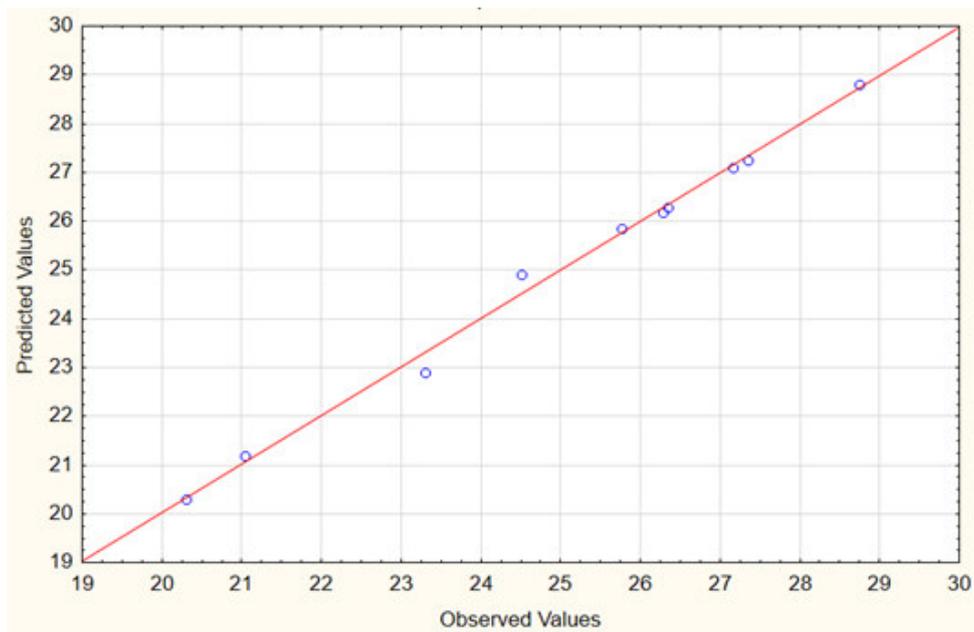


Figura 2 - valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo

(Equação 1).

Modelo cúbico espacial = $27,24*x_1 + 26,28*x_2 + 21,18*x_3 - 3,34*x_1*x_2 - 1,40*x_1*x_3 - 18,99*x_2*x_3 + 167,25*x_1*x_2*x_3 + 0$, onde x_1 = endocarpo, x_2 = mesocarpo e x_3 = borra do babaçu.

3.3. Delineamento composto rotacional central

O delineamento composto rotacional central investigou a otimização da formulação do meio fermentativo com o objetivo de elevar a atividade amilolítica com variação de temperatura e adição de suplementação (triptona) no meio. A Tabela 5 apresenta as respostas da atividade amilolítica ao delineamento estudado, em 24 horas de fermentação usando como substrato mesocarpo e borra de babaçu.

Tabela 5 - Delineamento composto central e suas respectivas respostas em 24 horas de fermentação.

Ensaio	Temperatura (°C)	Triptona(%)	A. amilolítica (U/g)
1	-1,00000	-1,00000	29,584
2	-1,00000	1,00000	22,985
3	1,00000	-1,00000	28,363
4	1,00000	1,00000	26,042
5	-1,41421	0,00000	17,202
6	1,41421	0,00000	24,514
7	0,00000	-1,41421	22,580
8	0,00000	1,41421	19,393
9	0,00000	0,00000	28,124

*Todo o ensaio formulado teve o nível de umidade ajustado para 40% de acordo com a umidade inicial

Nota-se que os resultados para atividade amilolítica variaram entre 17,20 e 29,58 U/g, sendo os que os maiores valores obtidos foram no ponto central (experimentos 1, 3 e 9). A partir dos resultados da análise estatística dos dados, apenas os termos linear e quadrático da suplementação mostraram-se significativos para a produção enzimática (p-valor = 0,09 e $r^2 = 0,71$), este valor de r^2 foi considerado bom, devido a variabilidade ao processo fermentativo.

A superfície de resposta do delineamento experimental estudado é mostrada na (Figura 3). A superfície evidencia o efeito positivo da suplementação relacionado a atividade enzimática. Neste estudo o ensaio 1 foi definido como a melhor formulação do meio otimizado sendo que 5% da suplementação faz parte da sua constituição.

(Equação 2).

Atividade enzimática = $6,654 + 0,164*x - 0,239*x^2 + 1,376*y - 1,252*y^2 + 0,060*x*y + 0,$

onde: X=suplementação e Y=temperatura.

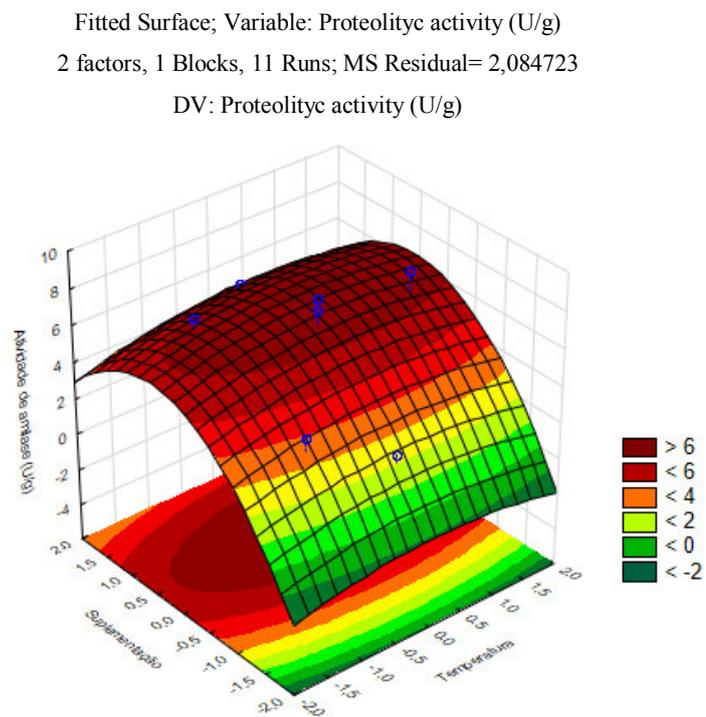


Figura 3 – Superfície de resposta do delineamento composto rotacional.

Para a atividade da amilase, representada pelo Diagrama de Pareto (Figura 4), nota-se que apenas o efeito suplementação é significativo para o nível de confiança de 95%. Observa-se que o efeito temperatura e o efeito da interação entre suplementação e temperatura não são estatisticamente significativo.

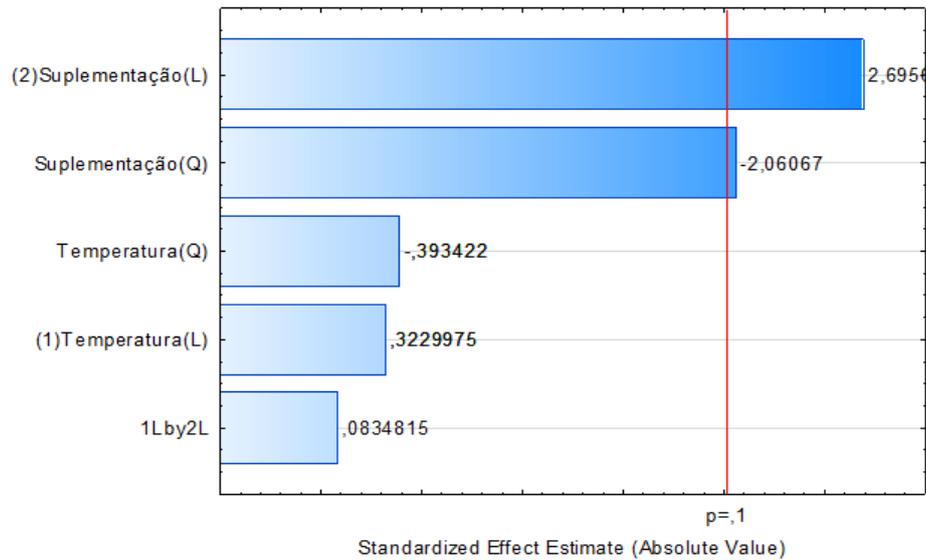


Figura 4 - Diagrama de Pareto

Esse resultado mostra que a variação de temperatura não influenciou nos resultados, assim como a interação das duas variáveis suplementação do meio e temperatura de incubação.

Rocha 2010 empregando resíduo de arroz e *A. oryzae* na produção de amilase obteve atividade de 25 U/g para 120 horas de fermentação com adição de 1% de O₂ e 10 U/g para 13 dias de processo a 0,25% de O₂ (para todos os experimentos foi adicionado agar de extrato de malte). No trabalho do autor, o valor da atividade foi próximo ao obtido neste estudo, que não foi adicionado oxigênio em menor de tempo de fermentação.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que através do processo fermentativo em estado sólido foi possível a obtenção de amilase de *Aspergillus oryzae* CCBP001, por meio da utilização dos subprodutos do coco babaçu.

O delineamento experimental de mistura sugere que sua aplicação é um método atraente para melhorar o desempenho e encontrar formulações ótimas. O processo fermentativo obteve uma maior produtividade em 24 horas favorecendo em uma diminuição de gastos de energia e conseqüentemente custos de processo. Os substratos utilizados na composição do meio fermentativo revelaram efeitos antagônicos e sinérgicos na produção de amilase. O processo proposto mostrou a potencialidade dos meios de culturas alternativos, como substrato abundante e de baixo custo e que pode ser estendido a outros grupos de enzimas produzidos por

microrganismo, permitindo a obtenção de complexos multienzimáticos de forma simplificada na combinação de resíduos agroindustriais para aumentar a produção de enzimas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e a Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Referências

Brandão, M., Laca-Buendia, JP, Macedo, JF, 2002. Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais, primeira ed. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Canal bioenergia, 2018. Novo microrganismo produz enzima de interesse industrial com mais sustentabilidade. <http://www.canalbionergia.com.br/microrganismo-produz-enzima-de-interesse-industrial/> (acessado em 01 de dezembro de 2018).

Coelho, MAZ., Salgado, MA, Ribeiro, BD, 2008. Tecnologia enzimática, primeira ed. Rio de Janeiro.

Carraza, LR, Ávila, JCC, Silva, ML, 2012. Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto e da folha do babaçu (*Attalea spp.*). ISNP.

Carvalho, JDV, 2007. Dossiê Técnico: Cultivo de Babaçu e Extração do Óleo. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília –CDT/UnB.

Freitas, AC, Castro, RJS, Fontenele, MA, Egito, AS, Farinas, CS, Pinto, GAS, 2013. Canola cake as a potencial substrate for proteolytic enzymes production by a selected strain of *Aspergillus oryzae*: selection of process conditions and product characterization. ISRN microbiology.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Prod.Extr.Veg. e Silvic. 28, 1-69.

Instituto Adolfo Lutz, 2008. Normas analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos, quarta ed. São Paulo.

Kurozawa, LE, Hubinger, MD, Park, KJ, 2009. Influence on process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 557-566.

Market e Market, 2016. Enzymes Market. Top Markets Report. United State of America. <http://www.marketsandmarkets.com/market-reports/food-enzymes-market-800.html/> (acessado em 15 de novembro de 2018).

Penha, EM, Viana, LAN, Gottschalk, LMF, Terzi, SC, Souza, EF, Freiras, SC, Santos, JO, Salum, TSC, 2016. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Niger*. *Ciência Rural*, 46, 755-761.

Portal macaúba, 2018. As palmeiras nativas do Brasil e a produção de óleo. <http://www.portalmacauba.com.br/2018/04/as-palmeiras-nativas-do-brasil-e.html/> (acessado em 02 de dezembro de 2018).

Teixeira, MA, 2008. Babassu – A new approach for an ancient Brazilian biomass. *Biomass Bioenergy*. 32, 857-864.

Rao, PV, Baral, SS, 2011. Experimental design of mixture for the co-digestion of sewage sludge. *Chem.Eng.J*, 172, 977-986.

Ractz, JVB, 2015. Produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus Niger*. Monografia de conclusão de curso. Faculdade de Ceilândia.

Rocha, CP, 2010. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia.

Rheiner, CO, 2016. Produção de Lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando subprodutos agroindustriais, óleo de soja e glicerol. *Ciências exatas e Naturais*, 18, 98-115.

Silva, APS, 2011. Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart): subsídio para o desenvolvimento de produtos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí.

ANEXOS

GUIA PARA AUTORES – Industrial Crops and Products

ESTRUTURA DO ARTIGO

Seções numeradas

Divida o seu artigo em seções bem definidas e numeradas. Subseções devem ser numeradas 1.1 (em seguida, 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na seção de numeração). Use esta numeração também para referência cruzada interna: não basta referir-se a 'texto'. Qualquer subseção pode ser dada um título breve. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Indicar os objetivos do trabalho e fornecer uma base adequada, evitando a pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

Material e métodos

Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Métodos que já são publicados devem ser resumidos, e indicado pela referência. Se citando diretamente a partir de um método previamente publicado, usar aspas e também citar a fonte. Deve também ser descrito quaisquer modificações aos métodos existentes.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção Discussão Os resultados combinados e é frequentemente apropriado. Evite citações extensas e discussão de literatura publicada.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma seção Conclusões curtas, que pode ficar sozinho ou formar uma subseção de um Discussão ou Resultados e Discussão seção.

Apêndices

Se houver mais de um apêndice, eles devem ser identificados como A, B, etc. Fórmulas e equações em apêndices deve ser dada numeração separada: Eq. (A.1), a Eq. (A.2), etc.; em um

apêndice posterior, a Eq. (B.1) e assim por diante. Da mesma forma para tabelas e figuras: Tabela A.1; Fig. A.1, etc.

INFORMAÇÃO ESSENCIAL DA PÁGINA TÍTULO

Título. Conciso e informativo. Títulos são frequentemente utilizados em sistemas de recuperação de informação. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

Os nomes dos autores e afiliações. Por favor indicar claramente o nome dado (s) e nome (s) da família de cada autor e verificar que todos os nomes estão escritos com precisão. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio roteiro por trás da transliteração Inglês. Apresentar endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo os nomes. Indique todas as afiliações com uma letra sobrescrito lower- imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Fornecer o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de cada autor e-mail.

Autor correspondente. Indique claramente quem vai lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Esta responsabilidade inclui a responder a quaisquer consultas futuras sobre Metodologia e Materiais. **Certifique-se de que o endereço de e-mail é dado e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.**

Endereço atual / permanente. Se um autor mudou desde o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando na época, um 'endereço Presente' (ou 'Endereço permanente') pode ser indicada como uma nota de rodapé do nome desse autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o principal, endereço de filiados. Números árabes sobrescrito são utilizados para essas notas de rodapé.

RESUMO

Um resumo é um fato conciso e necessária. O resumo deve indicar sucintamente o propósito da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é muitas vezes apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as referências devem ser evitadas, mas se essencial, em seguida, citar o autor (es) e ano (s). Além disso, abreviaturas não-padrão ou incomuns deve ser evitado, mas se essencial que deve ser definido em sua primeira menção no próprio resumo.

PALAVRAS – CHAVE

Imediatamente após o resumo, proporcionar um máximo de 6 palavras-chave, utilizando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e vários conceitos (evitar, por exemplo, 'e', 'de'). Ser poupando com abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave será usado para fins de indexação.

Abreviaturas

Definir abreviações que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé para ser colocado na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas em sua primeira menção lá, bem como em nota de rodapé. Assegurar a consistência de abreviaturas ao longo do artigo. Tente não excesso de uso abreviaturas.

Agradecimentos

Agrupar reconhecimentos numa seção separada no final do artigo antes das referências e não, portanto, incluí-los na página de título, como uma nota de rodapé para o título ou outro modo. Liste aqui aqueles indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda da língua, escrita assistência ou a prova de ler o artigo, etc.).

Nomenclatura e Unidades

Siga as regras e convenções internacionalmente aceites: utilizar o Sistema Internacional de Unidades (SI). Se outras unidades são mencionados, por favor, dar o seu equivalente em SI.

Autores e Editor (s) são, por consenso geral, obrigados a aceitar as regras que regem nomenclatura biológica, tal como previsto no Código Internacional de Nomenclatura Botânica, o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, e a Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.

Todos Biotica (culturas, plantas, insetos, pássaros, mamíferos, etc.) devem ser identificados por seus nomes científicos quando o termo Inglês é usado pela primeira vez, à exceção de animais domésticos comuns.

Todos os biocidas e outros compostos orgânicos devem ser identificados por seus nomes de Genebra quando usado pela primeira vez no texto. Ingredientes ativos de todas as formulações devem ser da mesma forma identificados.

Da nomenclatura química, as convenções do União Internacional de Química Pura e Aplicada e as recomendações oficiais da IUPAC-IUB Comissão Combinada de Nomenclatura Bioquímica deve ser seguido.

Fórmulas da matemática

Fórmulas simples presente na linha de texto normal, onde possível. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Número consecutivamente quaisquer equações que têm de ser exibido separado do texto (se referido explicitamente no texto). Subscritos e sobrescritos deve ser clara. Letras gregas e outros símbolos não-romanos ou manuscritas devem ser explicados na margem onde são usados em primeiro lugar. Tome especial cuidado para mostrar claramente a diferença entre zero (0) e a letra O, e entre um (1) e a letra l.

Dê o significado de todos os símbolos imediatamente após a equação em que eles são usados em primeiro lugar. Para frações simples utilizar o solidus (/) em vez de uma linha horizontal.

As equações devem ser numerados em série no lado do lado direito em parênteses. Em apenas equações gerais expressamente referidos no texto precisa ser contados.

O uso de poderes fracionários em vez de sinais de raiz é recomendado. Também poderes e muitas vezes são mais convenientemente indicado por exp.

Os níveis de significância estatística que podem ser mencionados, sem mais explicações são as seguintes: * $P < 0,05$,

* * $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Nas fórmulas químicas, de valência dos íons deve ser administrado como, por exemplo, Ca^{2+} , não como Ca^{++} . números de isótopos deve preceder os símbolos, por exemplo, ^{18}O .

Notas de rodapé

As notas de rodapé devem ser usados com moderação. Numerá-los consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto pode construir notas de rodapé no texto, e pode ser usado esse recurso. Caso contrário, por favor, indicar a posição das notas de rodapé no texto e listar as notas de rodapé-se separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista de referências.

ARTE ELETRÔNICA

Pontos gerais

- Certifique-se de usar letras uniforme e dimensionamento de sua arte original.

- Incorporar as fontes usado se o aplicativo oferece essa opção.
- Destinam-se a utilizar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, símbolo ou usar fontes que parecem semelhantes.
- Numerar as ilustrações de acordo com sua seqüência no texto.
- Use uma convenção de nomeação lógico para os seus arquivos de arte.
- Fornecer legendas para ilustrações em separado.
- Tamanho das ilustrações perto as dimensões desejadas da versão publicada.
- Enviar cada ilustração como um arquivo separado.

TABELAS

Por favor envie tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas de cada lado do texto relevante no artigo, ou na página (s) separado no final. Tabelas de números consecutivamente de acordo com o seu aparecimento no texto e coloque todas as notas tabela abaixo do corpo da tabela. Seja poupar no uso de tabelas e garantir que os dados apresentados neles não duplicar resultados descritos em outras partes do artigo. Por favor, evite o uso de regras verticais e sombreamento nas células da tabela.

REFERÊNCIAS

Citação no texto

Certifique-se que todas as referências citadas no texto também está presente na lista de referência (e vice-versa). Todas as referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionadas no texto. Se essas referências estão incluídas na lista de referências devem seguir o estilo de referência padrão da revista e deve incluir uma substituição da data de publicação, quer com 'resultados não publicados' ou 'comunicação pessoal'. Citação de uma referência como 'in press' implica que o artigo foi aceito para publicação.

Links de referência

Aumento da descoberta de pesquisa e revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por ligações on-line para as fontes citadas. A fim de nos permitir criar links para abstrair e serviços de indexação, tais como Scopus, CrossRef e PubMed, certifique-se de que os dados fornecidos

nas referências estão corretas. Por favor, note sobrenomes que incorrectas, Periódico / títulos de livros, ano de publicação e paginação pode impedir a criação de link. Ao copiar referências, por favor, tenha cuidado, pois eles já podem conter erros. O uso do DOI é altamente incentivado.

Um DOI é garantido nunca para mudar, para que você possa usá-lo como uma ligação permanente a qualquer artigo eletrônico. Um exemplo de uma citação usando DOI para um artigo ainda não em uma questão é: VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M. (2003). continuação Aseismic da Lesser Antilles laje debaixo nordeste da Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Por favor, note o formato de tais citações devem ser no mesmo estilo como todas as outras referências no papel.

Referências da web

No mínimo, a URL completa deve ser dada e a data em que a referência era acessado pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecido (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser dada. referências da Web pode ser listadas separadamente (por exemplo, depois da lista de referência) inserida numa posição diferente, se desejado, ou pode ser incluído na lista de referência.

Referências de dados

Esta revista incentiva você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito, citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua lista de referências. referências de dados deve incluir os seguintes elementos: nome do autor (es), título do conjunto de dados, repositório de dados, a versão (se disponível), ano e identificador persistente global. Adicionar [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá em seu artigo publicado.

Referências em uma edição especial

Certifique-se de que as palavras 'esta questão' são adicionados a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos da mesma edição especial.

Formatação de referência

Não há exigências rígidas sobre referência de formatação na submissão. As referências podem ser em qualquer estilo ou formato enquanto o estilo é consistente. Quando aplicável, autor (s) nome (s), título da revista / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo de livro e no número de artigo ou a paginação deve estar presente. Uso de DOI é altamente incentivado. O estilo de referência utilizado pela revista será aplicada ao artigo aceito pela Elsevier em fase de prova. Note-se que os dados em falta serão destacadas na fase de prova para o autor para corrigir. Se você deseja formatar as referências se eles devem ser organizados de acordo com os seguintes exemplos:

Estilo de referência Texto: Todas as citações no texto devem referir-se a:

Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambigüidade) e o ano de publicação;

Dois autores: Ambos os nomes dos autores e o ano de publicação;

Três ou mais autores: Nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação. Citações pode ser feita directamente (ou entre parênteses). Grupos de referências podem ser enumerados como primeiro alfabeticamente, depois cronologicamente, ou vice-versa.

Exemplos: 'como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999) Ou, tal como demonstrado (Jones, 1999; Allan, 2000) ... Kramer et al. (2010) mostraram recentemente ...'

Lista: As referências devem ser organizadas primeira ordem alfabética e, em seguida, mais ordenados cronologicamente, se necessário. Mais do que uma referência a partir do mesmo autor (es) no mesmo ano devem ser identificados pelas letras 'a', 'b', 'c', etc, colocados após o ano de publicação.

Exemplos:

Referência a uma publicação da revista:

Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2010. A arte de escrever um artigo científico. J. Sei. Comum. 163, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Referência a uma publicação da revista com um número de artigo:

Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2018. A arte de escrever um artigo científico. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Referência a um livro:

Strunk Jr., W., Branco, EB, 2000. *The Elements of Style*, quarta ed. Longman, New York.

Referência a um capítulo em um livro editado:

Mettam, GR, Adams, LB, 2009. Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo, em: Jones, BS, Smith, RZ, *Introdução à era eletrônica* (Eds.). E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Referência a um site:

Cancer Research UK, 1975. *Câncer estatísticas relatórios para o Reino Unido*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/estatística/cancerstatsreport/> (acessado em 13 de Março de 2003).

Referência a um conjunto de dados:

[Conjunto de dados] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Os dados de mortalidade para a doença murchidão do carvalho japonês e composições florestais circundantes. *Mendeley Dados*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.