

Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais

TAMIRES CARVALHO DOS SANTOS*; GEORGE ABREU FILHO; THIAGO JOSÉ HONÓRIO ROCHA; ADRIANA NASCIMENTO FERREIRA; GLEIZA ALVES DINIZ; MARCELO FRANCO

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BR 415, KM 03, S/N, CEP 45700-000, Itapetinga/BA. E-mail: tamicarvalhods@gmail.com. *Autor para correspondência

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar e quantificar a atividade das enzimas endoglucanase (CMCase) e celulases totais (FPase), produzidas por meio da fermentação em estado sólido dos resíduos do processamento do cacau, manga e seriguela, usando a espécie fúngica *Aspergillus niger* como inoculante. Para determinar o efeito da produção de enzimas, foi conduzido um experimento em esquema fatorial 3 X 5, com três níveis de teor de água (40%, 50% e 60%) e cinco níveis para o tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas). A fermentação foi realizada a 30 °C em estufa bacteriológica refrigerada. Foi possível observar que os resíduos agroindustriais possuem eficácia na produção enzimática a partir da fermentação em estado sólido, com destaque para produção de endoglucanase a partir do resíduo de manga, que atingiu a atividade de 9,32 U/mL, e celulases totais produzidas com a fermentação do resíduo de seriguela, com atividade enzimática quantificada a 11,62 U/mL.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, biotransformação, modelos matemáticos significativos.

ABSTRACT

Production and quantification of cellulases from solid-state fermentation of agroindustrial residues

This study aimed to analyze and quantify the activity of the enzymes endoglucanase and total cellulases produced from solid-state fermentation of waste from processing of cocoa, mango and hog plum, using the fungus *Aspergillus niger* as inoculant. In order to determine the effects of enzyme production, an experiment was arranged in a factorial combination (3 x 5), with three levels of water content (40%, 50% and 60%) and five levels of fermentation time (24, 48, 72, 96 and 120 h). Fermentation was produced in a bacteriological incubator refrigerated at 30 °C. It was found that the industrial residues are effective in the production of enzymes from solid-state fermentation, especially the endoglucanase from the fermentation of mango waste, which had enzymatic activity of 9.32 U/mL, and total cellulases from the fermentation of hog plum waste, which had enzymatic activity of 11.62 U/mL.

Keywords: *Aspergillus niger*, biotransformation, significant mathematical models.

INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira tem se mostrado como o mais dinâmico setor da economia, cresce ano a ano, supera barreiras fitossanitárias e cambiais e consolida-se como grande vetor de desenvolvimento do país. Nos últimos anos, aumentou sua área em níveis inéditos na história, ampliando suas fronteiras em direção à região Nordeste, em que condições de luminosidade, umidade relativa e temperatura são muito mais favoráveis do que nas regiões Sul e Sudeste, onde até então eram desenvolvidas (AGRIANUAL, 2008). Estima-se que provenientes da fruticultura

aproximadamente 40% são considerados resíduos agroindustriais compostos de restos de polpa, casca, caroços ou sementes.

A busca pelo desenvolvimento de novas tecnologias veio acompanhada da exploração dos recursos naturais, que desencadeou uma série de desequilíbrios no meio ambiente. Porém, no que diz respeito às tecnologias do setor agroindustrial, muitas práticas e tecnologias ultrapassadas, que são ainda adotadas no beneficiamento de produtos de determinadas culturas, geram quantidades significativas de resíduos deste setor.

Avanços no processo biotecnológico vêm sendo desenvolvidos em diversos segmentos, para a transformação destes resíduos em produtos de interesse comercial e industrial, de modo a agregar valor aos referidos resíduos (SANTOS et al., 2011). A bioconversão de resíduos agroindustriais se dá através de diversas técnicas, e cita-se aqui, a fermentação em estado sólido (FES), de fácil operacionalização, pois não exige que os resíduos sejam previamente tratados o que, do ponto de vista industrial, torna-se um aspecto interessante.

O cultivo no estado sólido oferece vantagens sobre o cultivo líquido, especialmente para culturas fúngicas. Devido à natureza dos substratos ricos em celulose, hemicelulose e lignina, a aeração tende a requerer pressões menores que as necessárias para os cultivos líquidos, e a agitação vigorosa é dispensável, o que pode evitar em grande parte a ruptura celular. Os metabólitos obtidos são geralmente mais concentrados e os procedimentos de purificação são mais baratos (SANTOS et al., 2011).

Entre diversos insumos produzidos a partir de técnicas de conversão biológica com a utilização de resíduos agroindustriais, a produção de enzimas tem sido cada vez mais estudada devido a sua aplicabilidade em diferentes setores industriais, nos quais se destacam indústrias de alimentos e bebidas, têxteis, papelerias e farmacêuticas (PANDEY et al., 2000). As reações enzimáticas acontecem em condições de temperatura e pH relativamente brandas, o que implica, para as indústrias, em redução nos custos operacionais. A produção de enzimas, por processos fermentativos é bastante conhecida e é realizada, frequentemente, por fungos que se utilizam das fontes de nutrientes ainda presentes nos resíduos (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

As celulasas são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004). Nesse sentido, os custos das celulasas podem ser reduzidos por meio de microrganismos e do uso de resíduos como matéria prima, com conseqüente aumento da especificidade enzimática (MAEDA et al., 2011; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de celulasas pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* através da fermentação em estado sólido dos resíduos de cacau (*Theobroma cacao*), manga (*Mangifera indica*) e seriguela (*Spondias purpurea*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os resíduos foram cedidos por uma agroindústria de beneficiamento de alimentos localizada na Região Sudoeste da Bahia, secos em estufa de ventilação forçada de ar (SOLAB) a 70 °C por 24 horas e triturados moinho tipo Willey (ACB LABOR) com granulometria aproximada de 2 mm. O microrganismo utilizado na fermentação foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). A umidade inicial dos resíduos após o processo de secagem foi 3,4% para o resíduo de cacau, 5,8% para o resíduo de manga e 2,9% para o resíduo de seriguela, a umidade inicial foi obtida através de determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200). A espécie fúngica foi cultivada em batata-dextrose-ágar (PDA HIMEDIA pH 5,02), e a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 VETEC a 0,01%, onde foi efetuada a contagem do número de esporos em suspensão de 10^8 utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000) (SANTOS et al. 2011).

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers contendo 10 g de cada resíduo a este foi adicionando a suspensão de 10^8 esporos por grama de substrato, na seqüência foram

adicionados volumes de água estéril até que o teor de água representasse 40%, 50% e 60% de umidade. Os ensaios foram realizados em incubadora refrigerada com ventilação forçada de ar a 30 °C. Após o processo fermentativo, foi adicionado 10 mL da solução tampão de citrato de sódio com pH 4,8 a 50 mM, logo após a adição da solução tampão a biomassa seguiu a extração mecânica por filtração do extrato enzimático.

A atividade da enzima endoglucanase foi quantificada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio. No controle da reação foram adicionados 0,5 mL da solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O branco da análise continha 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e 0,5 mL de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 50 °C por 10 minutos. Após esse tempo as reações foram interrompidas com a adição de 0,5 mL da solução de DNS. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorvância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

A atividade de celulasas total foi determinada por meio da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 x 6,0 cm. Foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto que no controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro. Após 1 hora de incubação em estufa foram adicionados 3 mL de solução de DNS aos tubos reações e controles, com posterior fervura em banho-maria. A posterior medição de absorvância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

A curva de calibração padrão para determinação enzimática foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g L⁻¹ pelo método do DNS (MILLER, 1959). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática foi expressa em U g⁻¹ de resíduo fermentado. A absorvância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

A otimização da produção de enzimas foi realizada analisando duas variáveis independentes à atividade enzimática e teor de água, com três repetições amostrais. Para determinar o efeito dessas variáveis sobre a produção de enzimas, foi conduzido um experimento em esquema fatorial 3 X 5, no qual três níveis de teor de água (40%, 50% e 60%) e cinco níveis para o tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas). Os dados foram ajustados a um modelo quadrático completo (todos os efeitos linear e quadrático principal e todas as interações de duas vias).

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²). O efeito constante no processo foi elaborado sobre o modelo de regressão não linear ajustado sobre os dados experimentais encontrados. O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*[®] (SAS) versão 8.0, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software gráfico *Sigma Plot*[®] versão 11.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi determinado pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²). Neste tipo de planejamento é possível, por meio da análise de regressão dos pontos experimentais, gerar

modelos quadráticos, resultando em superfícies de resposta curvas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, por equações matemáticas, os balanços de massa, associados às transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam. O *Aspergillus niger* demonstrou capacidade para produzir as enzimas celulolíticas, conforme afirma Santos et al. (2011). Na Tabela 1 são apresentados os modelos matemáticos para as enzimas endoglucanase e celulases para os resíduos de cacau, manga e seriguela.

TABELA 1. Modelos de ajustes de dados obtidos a partir da ANOVA. Equações quadráticas obtidas através de regressão não linear que representam a atividade enzimática em cada situação.

CACAU					
Umidade	Equação	R ²	F	P	CV%
Endoglucanase					
40%	$0,5347 + 0,0309x - 0,000022x^2$	0,8904	8,7703	0,0006	7,43
50%	$0,0053 + 0,0317x - 0,0001x^2$	0,9970	9,9272	0,0003	6,91
60%	$1,7102 + 0,0255x + 0,000067x^2$	0,9643	8,2421	0,0007	9,53
Celulases Totais					
40%	$0,6738 + 0,1813x - 0,0012x^2$	0,8757	11,3568	0,0003	4,92
50%	$0,2251 + 0,2211x - 0,0014x^2$	0,9707	7,3295	0,0003	5,98
60%	$1,6384 + 0,1320x - 0,0010x^2$	0,9238	9,0999	0,0002	9,87
MANGA					
Umidade	Equação	R ²	F	P	CV%
Endoglucanase					
40%	$-0,9145 + 0,1321x - 0,0009x^2$	0,9126	10,4414	0,0004	7,82
50%	$-3,584 + 0,306x - 0,0021x^2$	0,9612	12,2066	0,0008	5,98
60%	$-4,0730 + 0,2617x - 0,0017x^2$	0,9967	11,9199	0,0003	4,74
Celulases Totais					
40%	$-0,5824 + 0,0334x - 0,0002x^2$	0,9414	13,1805	0,0006	9,35
50%	$0,2296 + 0,0236x + 0,00002x^2$	0,8387	16,2002	0,0003	9,22
60%	$-0,8606 + 0,0547x - 0,0004x^2$	0,7887	18,7322	0,0003	7,43
SERIGUELA					
Umidade	Equação	R ²	F	P	CV%
Endoglucanase					
40%	$-1,233 + 0,0891x - 0,0005x^2$	0,8570	11,9953	0,0001	9,28
50%	$0,0457 + 0,0631x - 0,0003x^2$	0,8591	19,9333	0,0009	5,12
60%	$-0,7036 + 0,0719x - 0,0004xx^2$	0,9871	12,1958	0,0009	4,67
Celulases Totais					
40%	$-0,0261 + 0,1014x - 0,0007x^2$	0,9595	11,9369	0,0005	12,87
50%	$-4,2435 + 0,3190x - 0,0021x^2$	0,9223	10,0933	0,0007	3,81
60%	$-2,9514 + 0,2407x - 0,0015x^2$	0,8156	14,6017	0,0004	9,23

Os valores experimentais das atividades enzimáticas estão representados nas Figuras 1, 2 e 3. A quantificação das atividades enzimáticas foi representada em relação à média considerando o desvio padrão (\pm) de três determinações amostrais.

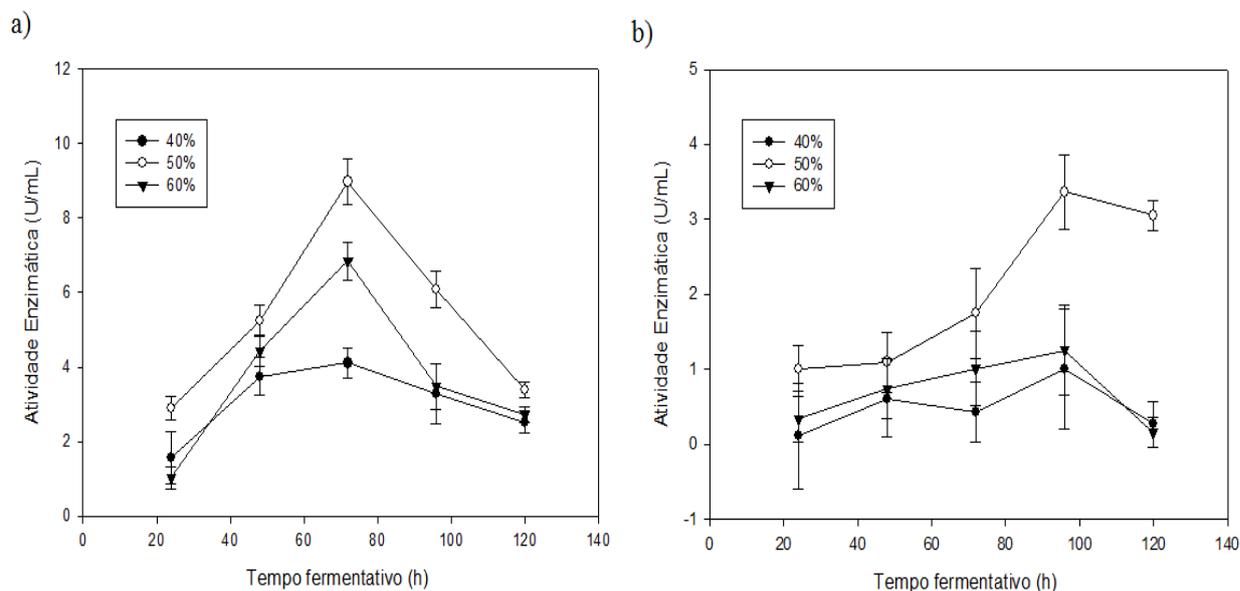


FIGURA 1 - Atividade enzimática da enzima endoglucanase (a) e celulases totais (b) em função do tempo, a partir da fermentação em estado sólido do resíduo de cacau.

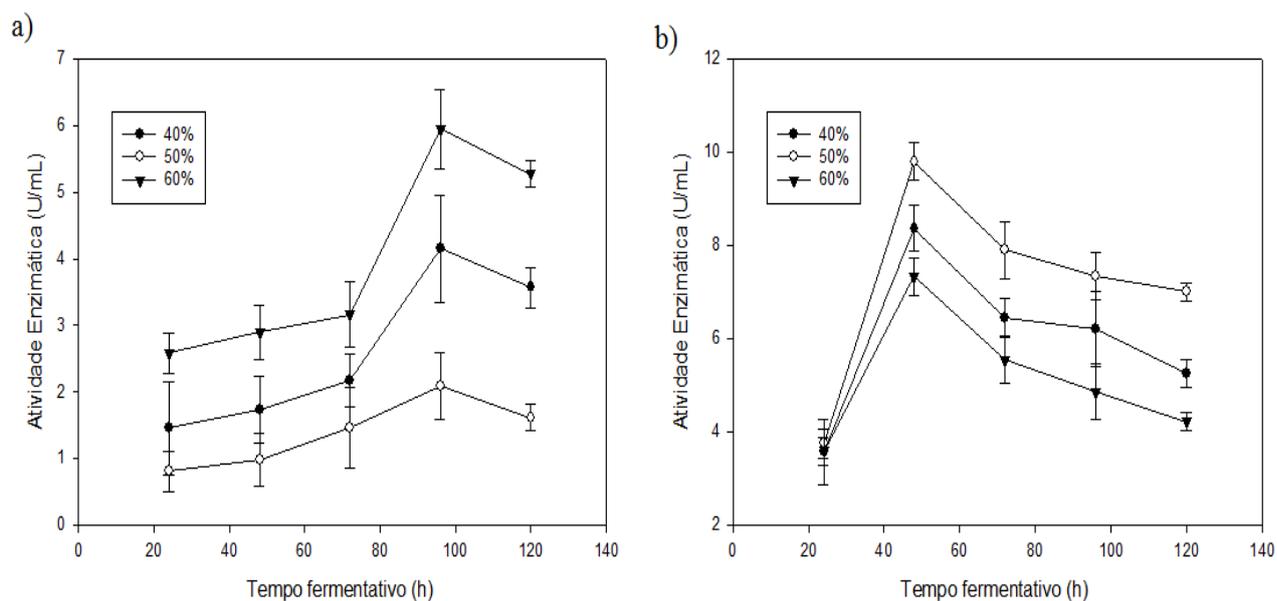


FIGURA 2 - Atividade enzimática da enzima endoglucanase (a) e celulases totais (b) em função do tempo, a partir da fermentação em estado sólido do resíduo de manga.

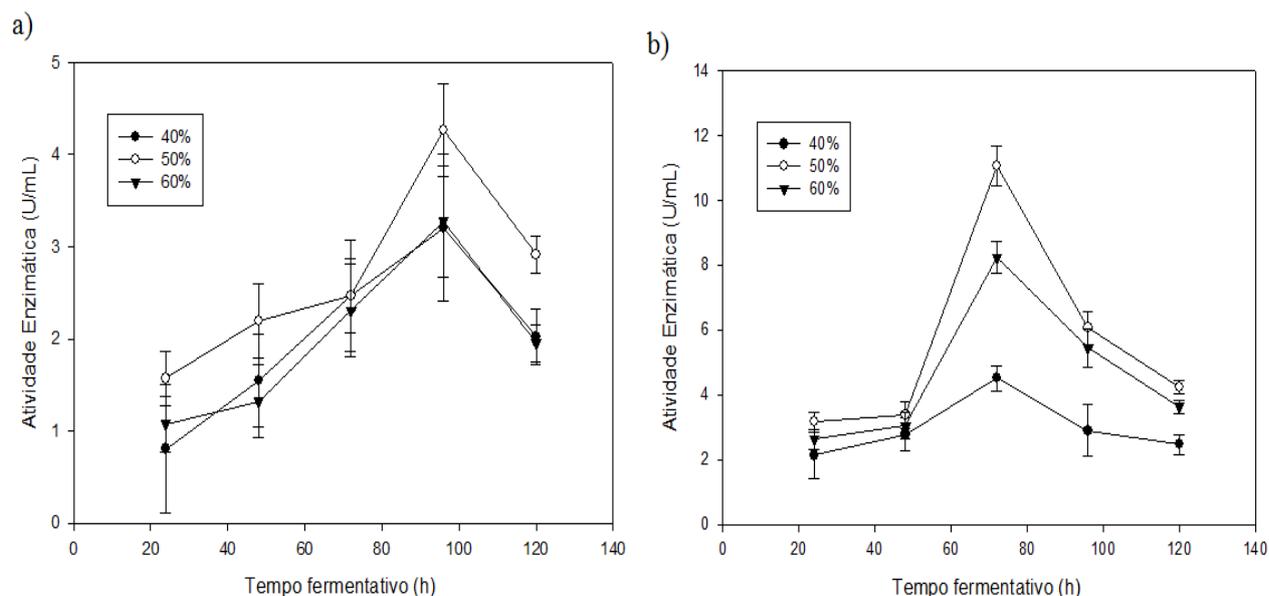


FIGURA 3 - Atividade de endoglucanase (a) e celulases totais (b) em função do tempo, a partir da fermentação em estado sólido do resíduo de seriguela.

Foi possível notar a diferença entre os resultados nos diferentes resíduos, o que demonstra que nem todos os substratos possuem o mesmo potencial para a produção de diferentes enzimas. Dos resíduos agroindustriais testados na seleção de meios de cultivo, o processo fermentativo realizado com o resíduo de manga obteve destaque na produção de endoglucanases alcançando o índice de $9,32 \text{ U mL}^{-1}$, para celulases totais o resíduo de seriguela apresentou melhor desempenho com $11,62 \text{ U mL}^{-1}$. Na Tabela 2, são apresentados os valores enzimáticos maiores valores obtidos para cada resíduo.

TABELA 2. Maiores valores obtidos durante o processo fermentativo.

Enzimas	Tempo de Fermentação (h)	Teor de água (%)	Atividade Enzimática (U/mL)
CACAU			
Endoglucanase	93,21	60,00	4,56
Celulases totais	51,32	50,00	7,08
MANGA			
Endoglucanase	71,87	50,00	9,32
Celulases totais	98,34	50,00	4,45
SERIGUELA			
Endoglucanase	106,34	50,00	4,87
Celulases totais	48,43	50,00	11,62

Durante o processo fermentativo as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular. As endoglucanases clivam as ligações β -(1-4)- glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas. Das celulasas totais, a enzima mais atuante é a exoglucanase, responsável por iniciar a hidrólise nas extremidades da cadeia. Esse comportamento pode explicar os valores otimizados em relação à variação de tempo, que para a endoglucanases foram encontrados valores menores do que as atividades encontradas para as celulasas totais, o que pode constituir que a atuação desta enzima é importante para a posterior atuação das celulasas totais.

Outro fator também observado durante o processo fermentativo foi que em teores de água de 40% e 60%, todos os resíduos demonstraram índices mais baixos na indução de enzimas, fato que pode estar relacionado com a inibição do fungo, marcado pela extrapolação do nível de água ideal para o desenvolvimento da linhagem selecionada, o que de acordo Santos et al. (2011), poderia estar influenciando no metabolismo responsável pela produção da enzima. Esta redução pode estar associada às propriedades estruturais e cinéticas da enzima produzida em cada fungo, ou ainda, a variações no conjunto de enzimas que fazem parte do complexo celulolítico (SILVA, 2003).

A umidade é considerada um fator crítico para o crescimento dos fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, ao contrário da fermentação submersa, onde há um grande excesso, o controle do nível de umidade é essencial à otimização do processo em fermentação sólida. Um alto teor de umidade diminui a porosidade, a difusão de oxigênio, a eliminação de dióxido de carbono e aumenta o risco de contaminação por bactérias. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento (GEORGE et al. 2001; SANCHES, 2009). Observando os dados obtidos é possível perceber que existe uma relação entre a umidade ideal com a melhor atividade enzimática, onde a maior parte dos resultados apontam melhor condição ao teor de água intermediário (50%) quanto as demais umidades possuem baixa atividade, com exceção da atividade de endoglucanase produzida a partir do resíduo do cacau com maior valor a 60% de umidade.

Enzimas normalmente têm um mecanismo de controle de expressão que pode ser estimulado ou inibido por produtos do meio. Os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores de enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Este mecanismo é conhecido como a realimentação negativa (SANTANA et al., 2012). Biazus et al. (2006), trabalhando com malte de milho, observaram que na produção de enzimas o início é lento, em seguida, acelera até atingir o seu valor máximo; depois disso, a concentração de produtos gerados são inibidos e a sua atividade é reduzida, o que também foi observado no presente estudo para todos os resíduos testados.

Omemu et al. (2005) obtiveram rendimentos mais elevados de hidrólise do amido de mandioca por *Aspergillus niger*, após 72 horas de fermentação, que concorda com Alva et al. (2007), que também relataram maior atividade enzimática por *Aspergillus*. A diminuição da atividade com aumento do tempo de incubação pode ser devido à produção de subprodutos resultante do metabolismo microbiano, bem como nutriente esgotamento, que inibem o crescimento de fungos e formação de enzimas (SHAFIQUE et al., 2009).

A literatura mostra a produção de endoglucanases por actinomicetos, *Streptomyces*, em particular em diferentes substratos. A estirpe de *Streptomyces* T3-1 produziu atividade de 40,3 U mL⁻¹ em carboximetilcelulose (CMC) a 1,5% e sulfato de amônio, uréia e peptona (JANG & CHEN, 2003), mas estes nutrientes não foram utilizados com os substratos de baixo custo como neste trabalho. *Streptomyces* sp. foi cultivado em uma solução contendo peptona, 1,0% de Tween 80 em celulose cristalina e produziu 11,8 U mL⁻¹ de endoglucanase (ALANI et al., 2008), no entanto, *Thermomonospora* sp. (GEORGE et al., 2001), quando cultivada em pó de papel contendo celulose médio, extrato de levedura e Tween 80, mostrou um pico de 23 U mL⁻¹, enquanto que quando cultivada em de farelo de trigo foi de 8,5 U mL⁻¹.

Jorgensen & Olsson (2006) trabalhando com *Penicillium brasilianum* IBT em um biorreator de extrato de levedura contendo madeira de pinho submetido a explosão de vapor, obtiveram valores para celulases totais de 0,59 U mL⁻¹. *Trichoderma viride* NCIM 1051 em 1,0% da cana bagaço tratado com NaOH resultou em atividade de celulases totais de 0,4 U mL⁻¹ (ADSUL et al., 2004). *Aspergillus niger* IZ9 em meio de cana de açúcar contendo bagaço tratado com hidróxido de sódio (NaOH) mostrou maior atividade de 0,2 U mL⁻¹ (AGUIAR & MENEZES, 2000).

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a estirpe *Aspergillus niger* é bastante promissora, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulósicas. Os resíduos agroindustriais mostraram-se grande eficácia na produção de enzimas a partir da fermentação em estado sólido. O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além dos resíduos e água em diferentes concentrações, demonstrando que é uma enzima constitutiva.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, Bromsgrove, v.57, n.1, p.67-72, 2004.

AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira. **Produção de frutas no Brasil**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v.18, n.1, p.57-70, 2000.

ALANI, F.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalo tolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v.30, n.1, 123-126, 2008.

BIAZUS, J.P.M.; SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.787-792, 2006.

CASTRO, A.M. de; CARVALHO, M.L. de A. de; LEITE, S.G.F.; PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, n.1, p.151-158, 2010.

GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO, M.B. Studies on carboxymethyl cellulose reduced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v.77, p.171-175. 2001.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, n.1, p.257-268, 1987.

JANG, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.2, p.263-268, 2003.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n.3-4, p.381-390, 2006.

MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M. de; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, n.1, p.1196-1201, 2011.

OMEMU, A.M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M.O.; TENIOLA, O.D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.19-25, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.1, p.81-84, 2000).

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

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

SANTANA, R.M.; GONÇALVES, Z.S.; BONOMO, R.C.F.; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, n.1, p.188-193, 2012.

SANTOS, T.C.; CAVALCANTI, I.S.; BONOMO, R.C.F.; SANTANA, N.B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2210-2216, 2011.

SILVA, E.M. da. **Análise do crescimento Micelial e das atividades lignocelulolíticas produzidas durante o cultivo de *Lentinula edodes* em resíduo de *Eucalyptus saligna***. 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2003.