

Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café

R. O. Gusmão¹; Ferraz, L. M.¹; Rêgo, A. P. B.¹; Assis, F. G. V.²; P. L. Leal^{1*}

¹Instituto Multidisciplinar em Saúde/Laboratório de Enzimologia e Microbiologia Industrial/Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, 45029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

²Departamento de Microbiologia/Laboratório de Anaeróbios/Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil

*lealpat@yahoo.com.br

(Recebido em 15 de julho de 2014; aceito em 31 de outubro de 2014)

O emprego de resíduos agroindustriais como matéria prima em bioprocessos representa uma alternativa econômica e de balanço ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de amilase, CMCCase, avicelase e pectinase por três linhagens de *Aspergillus* spp. (LEMI 1, LEMI 2 e LEMI 3) cultivados sob fermentação em estado sólido em casca de café, ao longo de 21 dias. Os resultados indicaram que todos os isolados fúngicos foram hábeis em produzir todas as enzimas avaliadas. Maior atividade de amilase foi registrada aos 12 dias de fermentação (178,36 nKat.g⁻¹) para o isolado LEMI 3. Este isolado apresentou também os melhores resultados para CMCCase (63,34 nKat.g⁻¹), porém em um tempo menor de fermentação (3 dias). Para avicelase e pectinase, o isolado LEMI 2 foi o que proporcionou maior atividade destas enzimas, aos 21 dias de fermentação (36,67 e 103,35 nKat.g⁻¹, respectivamente). Independente dos isolados fúngicos, o tempo de fermentação influenciou a atividade de todas as enzimas, sendo que para amilase e CMCCase, maiores atividades foram registradas nos tempos iniciais de fermentação enquanto, para avicelase e pectinase, maiores atividades enzimáticas foram verificadas nos tempos finais de fermentação.

Palavras Chave: Atividade enzimática, fungos filamentosos, resíduos agroindustriais

Production of enzymes by *Aspergillus* spp. under solid state fermentation in coffee husk

The use of agro-industrial waste as raw material in bioprocesses is an economic alternative and natural balance. The aim of this study was to evaluate the production of amylase, CMCCase, avicelase and pectinase by three strains of *Aspergillus* spp. (LEMI 1, LEMI 2 and LEMI 3) cultivated on solid state fermentation in coffee husk, for 21 days. The results indicated that all the fungal isolates were able to produce all enzymes. Higher amylase activity was recorded at 12 days of fermentation (178,36 nKat.g⁻¹) for strain LEMI 3. This isolate also showed the best results for CMCCase (63,34 nKat.g⁻¹), but in a shorter fermentation time (3 days). To avicelase and pectinase, the LEMI 2 isolate showed higher activity of these enzymes, at 21 days of fermentation (36,67 and 103,35 nKat.g⁻¹, respectively). Regardless of fungal isolates, the fermentation time influenced the activity of all enzymes, whereas for amylase and CMCCase, highest activities were recorded at initial days of fermentation while for avicelase and pectinase, higher enzymatic activities were found at final times of fermentation.

Keywords: Enzymatic activity, filamentous fungi, agro-industrial waste

1. INTRODUÇÃO

O mercado cafeeiro é um dos mais importantes no mundo e o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial da produção desta cultura agrícola. A partir do tratamento das cerejas de café, são gerados dois importantes resíduos: a polpa, no tratamento por via úmida, e a casca, na via seca [1]. Além disso, 80% do café produzido no Brasil é proveniente da via seca, e portanto, estima-se que o país produza, todos os anos, aproximadamente, 30 milhões de sacas de casca, uma quantidade muito similar da produção nacional de grãos, segundo Soccol [1]. A casca do

café é um subproduto fibroso mucilagenoso com considerável quantidade de cafeína e taninos, o que o torna tóxico quando disposto na natureza na forma *in natura*, resultando em problemas de descarte. Tradicionalmente, a casca de café possui aplicações limitadas, sendo utilizada, especialmente, como fertilizantes, ração animal e biocomposto. No entanto, por apresentar altos teores de matéria orgânica e boa quantidade de açúcares fermentescíveis, sugere-se que a casca de café seja uma fonte de carbono alternativa e promissora para o cultivo de micro-organismos em diferentes bioprocessos industriais [2].

A aplicação de resíduos agroindustriais não apenas representa um substrato alternativo para os processos fermentativos, mas também ajuda a reduzir custos de fabricação de produtos, com elevado valor agregado, e a resolver problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos [3, 4]. Segundo Santos et al. [5], a produção de enzimas, a partir de técnicas de conversão biológica com a utilização de resíduos agroindustriais, tem sido cada vez mais estudada devido à sua aplicabilidade em diferentes setores industriais, nos quais se destacam indústrias de alimentos e bebidas, têxteis, papelarias e farmacêuticas.

A fermentação em estado sólido (FES), que se caracteriza pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, na ausência ou baixo teor de água livre [6], tem merecido a atenção de indústrias produtoras de enzimas. Isso se deve às vantagens relatadas para FES, quando comparada a outras tecnologia de fermentação, como a maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas à variações de temperatura e Ph [7,8]. Dentre as várias enzimas produzidas por FES, podem ser citadas a celulase [9], amilase [10], lipase [11], protease [12] e invertase [13].

Por outro lado, limitações do processo de FES também são reconhecidas, especialmente ao que se refere à habilidade dos micro-organismos em crescer sob condições de baixa umidade [14]. Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um bom crescimento em concentrações elevadas de açúcar e sal, ou seja, em substratos com baixo teor de atividade de água e por isso, este gênero microbiano tem sido indicado para cultivo sob FES. Apesar de vários grupos de micro-organismos conhecidos apresentarem sistemas enzimáticos bem caracterizados e alguns deles já serem utilizados em escala industrial, pesquisas em todo o mundo têm demonstrado que as atividades enzimáticas de novos isolados podem ser até superiores à das estirpes tradicionais [15].

Sendo assim, a busca por matérias primas de baixo custo e novas fontes de enzimas utilizadas em processos fermentativos têm merecido crescente atenção dos setores industriais. Esta necessidade conduz ao desenvolvimento de estudos envolvendo a triagem de micro-organismos, que vêm sendo realizados através da bioprospecção de atividades metabólicas de enzimas [16]. Ecossistemas naturais, especialmente de países tropicais como o Brasil,

representam uma fonte interminável de micro-organismos com potencial biotecnológico, abrangendo uma microbiota desconhecida e de interesse industrial ideal [15].

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar três linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus*, isolados do semi-árido do Estado da Bahia, quanto à produção de amilase, endoglucanase (CMCase), exoglicosidase (avicelase) e pectinase, ao longo de 21 dias, sob fermentação em estado sólido, contendo casca de café como única fonte de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Os fungos filamentosos utilizados foram isolados de diferentes espécies vegetais oriundas do semi-árido do Estado da Bahia e pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Enzimologia e Industrial, da Universidade Federal da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista. Todos os isolados foram classificados como *Aspergillus* spp. e receberam os códigos de LEMI 1, LEMI 2 e LEMI 3. A reativação destes isolados foi realizada mediante o cultivo em placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (PDA HIMEDIA pH 5,02), por 48 horas.

Ensaio de fermentação em estado sólido contendo casca de café como substrato para obtenção de enzimas amilase, CMCase, avicelase e pectinase

A casca de café utilizada como substrato no processo fermentativo foi cedida como resíduo por uma agroindústria de beneficiamento, localizada na região Sudoeste da Bahia. O resíduo foi autoclavado, a fim de eliminar a microbiota nativa do material, e não foi realizada a trituração das mesmas, sendo mantidas, portanto, as cascas inteiras.

A fermentação em estado sólido foi estabelecida em frascos Erlenmeyers de 500mL, nos quais foram adicionados 100g da casca de café autoclavada. A inoculação dos isolados fúngicos (*Aspergillus* spp. LEMI 1, *Aspergillus* spp. LEMI 2 e *Aspergillus* spp. LEMI 3) foi realizada com pequenos discos de meio de cultura contendo micélio fúngico, segundo metodologia de Sena et al. [17].

Após inoculação, as amostras contidas em cada Erlenmeyer foram suplementadas com extrato de levedura nas concentrações de 0,0, 6,0 ou 12,0g/L e sais nas concentrações fixas de 6,0g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0g/L de KH_2PO_4 e 0,6g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [18]. A proporção final de substrato em relação a meio aquoso foi de 70%. O cultivo dos fungos, nestas condições, foi realizado em estufa, a 30°C, por 21 dias.

Alíquotas de cada tratamento foram coletadas, em intervalos de 36 horas, misturadas com 40mL de água destilada, homogeneizadas, centrifugadas a 10.000rpm, por 5 minutos e filtradas à vácuo, utilizando papel filtro qualitativo com gramatura de 80g/m². Os sobrenadantes obtidos foram utilizados como extrato bruto das enzimas para determinação das atividades enzimáticas [19,20].

Atividade enzimática de amilase, CMCCase, avicelase e pectinase

Os extratos brutos foram submetidos às análises de atividades enzimáticas de amilase, CMCCase, exoglicosidase (Avicelase) e pectinase, utilizando o método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Siqueira et al. [21].

Para avaliar as atividades enzimáticas, utilizou-se 50µL da alíquota retirada de cada meio fermentativo, contendo o coquetel enzimático dos fungos, e 100µL de substrato enzimático correspondente a cada enzima (solução de 1%), reagindo por 30 minutos, a 50°C. Após este período, foram adicionados 300µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS), previamente preparada. A mistura foi fervida por 10 minutos e, ao fim, adicionou-se 9,0mL de água destilada seguida de homogeneização. A atividade enzimática foi obtida a partir da leitura em espectrofotômetro, a 540nm de absorbância.

A unidade das atividades enzimáticas (nKat.g⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de produto (açúcares redutores) por segundo por grama de amostra (polissacarídeos), nas condições de reação, utilizando como curva padrão o monômeros de glicose (amilase, CMCCase, ácido galacturônico e avicelase).

Análises estatísticas

Os resultados das atividades enzimáticas obtidas para cada isolado fúngico foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas de Fisher, sendo os fungos filamentosos, dois a dois, comparados entre si, quanto à atividade das enzimas de interesse. Para isso foi utilizado o software estatístico Action (© Copyright 1997-2011 Estatcamp) desenvolvido sob plataforma R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados fúngicos foram capazes de produzir pectinase, CMCCase, amilase e avicelase, ao longo de 21 dias, sob fermentação em estado sólido (FES), contendo casca de café

como única fonte de carbono (Tabela 1). Estes resultados indicaram que a casca de café trata-se de uma fonte de carbono alternativa e promissora para ser empregada como substrato em processos fermentativos, conforme relatado por Pandey et al. [22] e Macedo et al. [23]. Segundo estes autores, a casca de café contém grande quantidade de nutrientes, cafeína, taninos e polifenóis, o que faz deste material viável para a aplicação em bioprocessos e para a produção de uma série de produtos como enzimas.

De acordo com resultados apresentados na Tabela 1, pode-se também inferir que os isolados fúngicos foram hábeis para se adaptarem às condições de cultivo impostas no presente trabalho. De acordo com Silva *et al.* [24], fungos filamentosos, diferentemente da maioria dos micro-organismos, se mostram bastante tolerantes às condições ambientais impostas pelo processo de fermentação em estado sólido, cujo teor de água no substrato é bastante limitante.

Tabela 1: Atividade das enzimas amilase, CMCase, avicelase e pectinase produzidas por isolados fúngicos cultivados sob fermentação em estado sólido, contendo casca de café como única fonte de carbono, ao longo de 21 dias

Isolados Fúngicos	Enzimas	Atividade enzimática (nKat.g ⁻¹)						
		Tempo de Fermentação (dias)						
		3	6	9	12	15	18	21
LEMI 1	Amilase	96,69	46,68	81,68	60,01	46,68	33,34	48,34
	CMCase	58,35	50,68	14,00	18,67	13,17	9,50	11,84
	Avicelase	13,34	20,00	26,67	21,67	33,34	36,67	33,34
	Pectinase	15,0	1,67	55,01	35,01	46,68	51,68	78,35
LEMI 2	Amilase	161,70	155,03	131,69	88,35	66,68	45,01	71,68
	CMCase	60,01	56,68	26,67	15,00	20,00	11,67	30,00
	Avicelase	11,67	13,34	16,67	21,67	30,01	16,67	36,67
	Pectinase	0,0	18,34	23,34	55,01	100,02	101,69	103,35
LEMI 3	Amilase	136,69	138,36	143,36	178,37	108,36	68,35	91,69
	CMCase	63,35	6,67	31,67	15,00	25,01	11,67	16,67
	Avicelase	8,34	11,67	15,00	20,00	21,67	101,69	16,67
	Pectinase	0,0	56,68	33,34	50,01	58,35	68,35	91,69

Neste sentido, o gênero *Aspergillus* é considerado um bom agente biológico em processos fermentativos para a obtenção de enzimas [24, 25, 26]. No entanto, Fernandes [27] ressalta que a atividade de enzimas obtidas por processos fermentativos podem variar em relação ao isolado fúngico e ao tempo de fermentação. Esta evidência foi constatada em nosso estudo, uma vez que, a atividade enzimática de todas as enzimas avaliadas variou entre os isolados fúngicos e em relação ao tempo de fermentação (Tabela 1).

Segundo Rodriguez-Zuñiga [24], o tempo de 3 dias de fermentação em estado sólido para o cultivo de fungos é interessante, tendo em vista os fins comerciais quanto à produção de enzimas, em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos. No entanto, nossos estudos indicaram que a atividade de amilase foi maior aos 12 dias de fermentação ($178,37 \text{ nKat.g}^{-1}$) para o isolado LEMI 3. Novamente, este isolado apresentou os melhores resultados também para CMCase ($63,34 \text{ nKat.g}^{-1}$), porém em um tempo menor de fermentação (3 dias). Para avicelase e pectinase, o isolado LEMI 2 foi o que proporcionou maior atividade destas enzimas, aos 21 dias de fermentação ($36,67 \text{ nKat.g}^{-1}$ e $103,35 \text{ nKat.g}^{-1}$, respectivamente). Tais atividades máximas podem ser consideradas satisfatórias, quando comparadas às encontradas por outros autores: Chandra et al. [28] relataram valores máximos de CMCase de $54,01 \text{ nKat.g}^{-1}$ utilizando o farelo de trigo como substrato. Também utilizando farelo de trigo como substrato para fermentação, Saha [29] obteve valores máximos de amilase iguais a $120,85 \pm 0,25 \text{ nKat.g}^{-1}$, $237,54 \pm 0,24 \text{ nKat.g}^{-1}$, e $225,04 \pm 0,75 \text{ nKat.g}^{-1}$, respectivamente, para 24, 48, e 72 horas. Menezes et al. [30] registraram valores máximos de $0,08 \text{ U.mL}^{-1}$ para avicelase a partir de FES em bagaço de cana. Rizzato [31] obteve valores máximos de pectinase de $159,36 \text{ nKat.g}^{-1}$ a partir de bagaço de laranja como substrato.

Independente dos isolados fúngicos, o tempo de fermentação influenciou a atividade de todas as enzimas (Figura 1). Para amilase e CMCase, maiores atividades foram registradas nos tempos iniciais de fermentação (Figura 1A e B), diferentemente do observado para avicelase e pectinase, quando maiores atividades enzimáticas foram verificadas nos tempos finais de fermentação (Figuras 1C e D). Segundo Whitaker [32], valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares simples. Por outro lado, o tempo excessivo de fermentação pode acarretar na inibição do fungo, devido, especialmente, à extrapolação do nível do teor de água ideal, o que promove inibição na excreção enzimática, reduzindo a atividade enzimática

[33]. Diferenças significativas foram observadas entre os isolados fúngicos quanto às atividades enzimáticas obtidas, independente do tempo de fermentação (Figura 2).

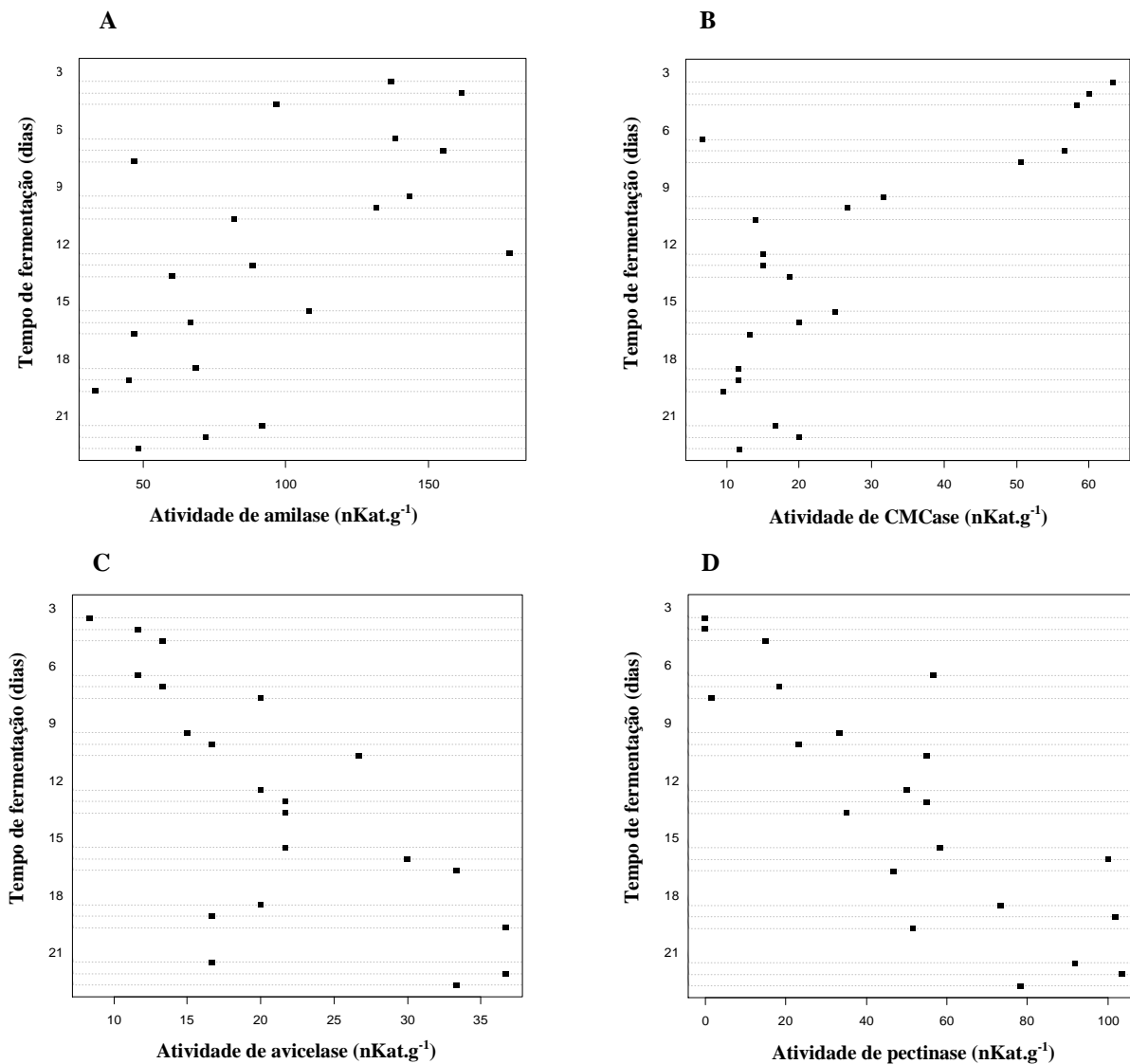


Figura 1: Efeitos do tempo de fermentação, contendo casca de café como única fonte de carbono, sobre as atividades das enzimas amilase (A), CMCCase (B), avicelase (C) e pectinase (D), independente do isolado fúngico inoculado.

Isto significa que a seleção do agente biológico, para aplicação em processos fermentativos, visando à produção de enzimas, deve ser considerada, conforme afirmado por Fernandes [34]. Para as atividades enzimáticas de amilase e avicelase, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados LEMI 1 e 2, LEMI 1 e 3 e LEMI 2 e 3 (Figura 2A e C). Para atividade de pectinase, diferença significativa ($p < 0,05$) ocorreu entre os isolados LEMI 1 e 2 (Figura 2D). Apenas para a atividade de CMCCase não foram verificadas diferenças significativas entre os isolados fúngicos (Figura 2B). Embora estes isolados pertençam ao mesmo gênero, a eficiência quanto a produção de enzima pode variar entre espécies e mesmo,

entre linhagens da mesma espécie, conforme verificado por Baratto et al. [35] que constataram diferenças na atividade de enzimas hidrolíticas empregando diferentes isolados do gênero *Aspergillus*. Isto se deve à versatilidade genética e metabólica que os micro-organismos podem apresentar, frente às diferentes condições ambientais. A espécie *Aspergillus niger*, por exemplo, tem a capacidade de produzir diferentes tipos de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato.

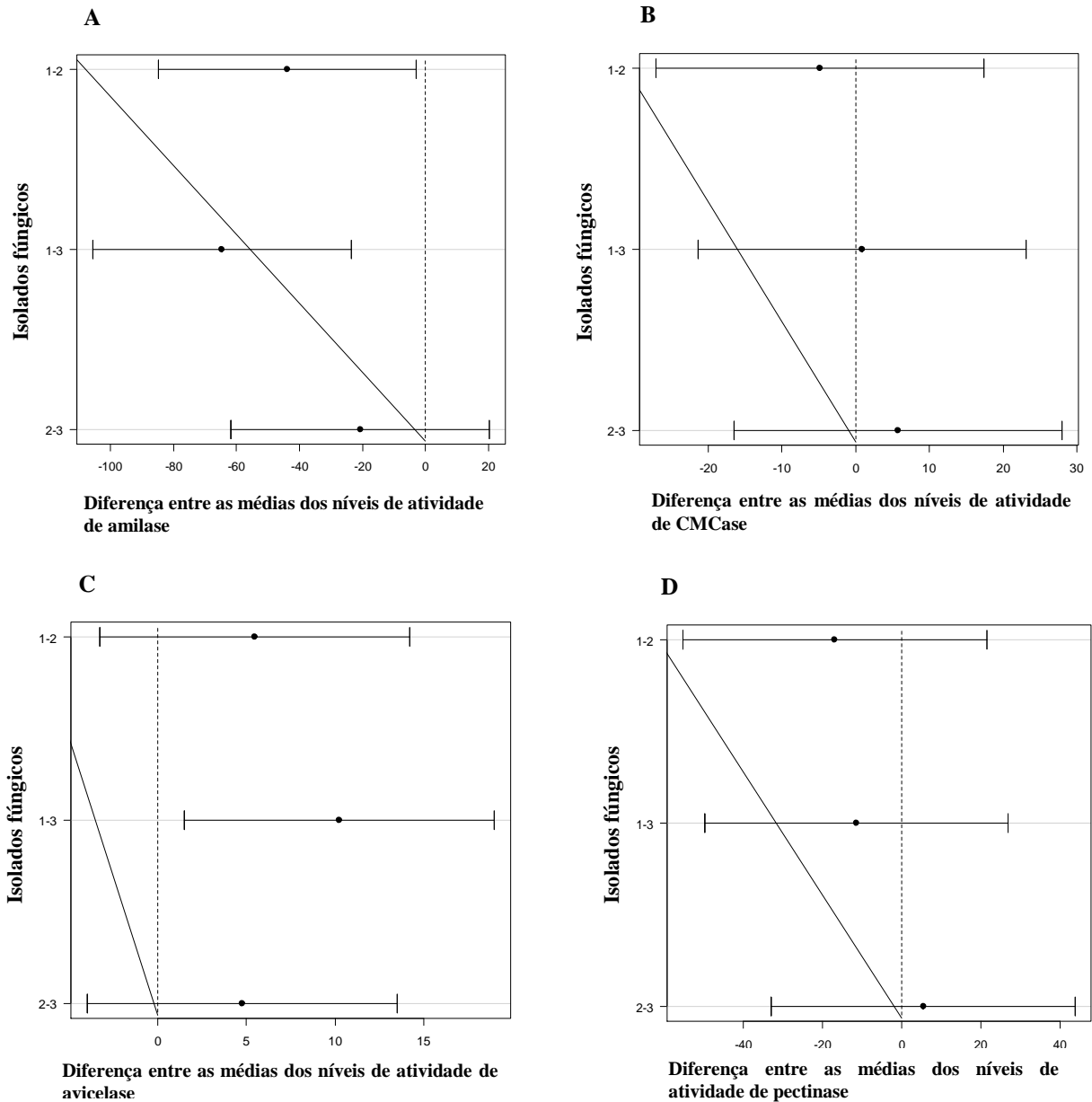


Figura 2: Efeitos dos isolados fúngicos, comparados dois a dois, sobre as atividades das enzimas amilase (A), CMCase (B), avicelase (C) e pectinase (D), independente do tempo de fermentação, contendo casca de café como única fonte de carbono. Sendo 1:LEMI 1; 2: LEMI 2; 3: LEMI 3.

4. CONCLUSÃO

Levando-se em conta as características desejáveis que um micro-organismo deve apresentar para ser empregado em processos fermentativos para produção de enzimas, os isolados LEMI 1, 2 e 3 foram considerados promissores agentes biológicos com aplicação industrial, uma vez que estes fungos apresentaram satisfatória eficiência na conversão do substrato em produto, sendo alguns deles capazes de liberar rapidamente o produto para o meio. Além disso, os isolados fúngicos exigiram condições de processo pouco complexas e foram hábeis, metabolicamente, para utilizar casca de café como única fonte de carbono. Apesar de o presente estudo ter sido realizado em escala de bancada, os resultados obtidos são entendidos como ponto de partida para o escalonamento do processo, além de indicar para uma viabilização de rota tecnológica que permite o aproveitamento de biomassa carbônica proveniente de resíduos agroindustriais, tornando possível a diversificação das fontes de matéria-prima para a produção de enzimas.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo financiamento de estudos e projetos.

-
1. Soccol C, Ricardo. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. Pesquisa dos cafés do Brasil. Brasília: Embrapa, p.83-98, 2002.
 2. Pandeya A, Soccolb CR, Nigamc P, Brandb D, Mohanb R, Roussosd S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. 2000; 6:153-162.
 3. Botella C, Diaz A, Ory I, Webb C, Blandino A. Xilanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. Process Biochemistry. 2007; 42(1):98-101.
 4. Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). Bioresource Technology. 2008; 99:5602-5609.
 5. Santos TC dos, Filho GA, Rocha TJH, Ferreira AN, Diniz GA, Franco M. Produção e quantificação de celulasas por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. Scientia Agraria Paranaensis. 2013; 12(2):115-123.
 6. Rahardjo YSP, Tramper J, Rinzema A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. Biotechnology Advances. 2006; 24:161-179.
 7. Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advance ment and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology. 2010; 46:541-549.
 8. Hölker U, Höfer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 2004; 64:175-186.
 9. Gao J, Weng H, Zhu D, Yuan M, Guan F, Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermo acidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of cornstover. Bioresource Technology. 2008; 99:7623-7629.

10. Guandalini NC. Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhiziumanisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Disponível em: http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?Did=383 Consultado em 25 de Abril de 2014.
11. Azeredo LAI, Gomes PM, JR GLS, Castilho LR, Freire DMG. Production and regulation of lipase activity from *Penicilliumrestrictum* submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*.2007; 54:361-365.
12. Li Q, Harvey LM, Mcneil B. The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillusniger* B1-D. *Appl. Microbiol. Biotechnol*.2008; 78:333-341.
13. Shaheen I, Bhatti HN, AshrafT. Production, purification and thermal characterization of invertase from a new lysolated *Fusarium* sp. under solid-statefermentation. *International Journal of Food Science and Technology*.2008; 43:1152–1158.
14. Mahadik ND,Puntambekar US,Bastawde KB,Khire JM,Gokhale DV. Production of acidic lipase by *Aspergillusniger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*.2002; 38:715-721.
15. Silva R, Lago ES, Merheb CW, Macchione MM, Park YK, Gomes E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascusaurantiacus* MIEHE. *Brazilian Journal of Microbiology*.2005; 36:235-241.
16. Romero CM, Baigori MD, Pêra LM. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillusniger* MYA 135. *Applied Microbiology and Biotechnology*.2007; 76(4):861-866.
17. Sena AR, Koblitz MGB, Goes Neto A, Uetanabaro APT. Selecao de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*.2006; 35:91-98.
18. Santiago PA. Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromycesmarxianus*. Uberlândia, 2002. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
19. Sant'anna JR, G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A; AQUARONE, E.; BORZANI, W. & SCHIMIDELL, W. (Coord.), *Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: EdgardBlücher, 2001, p. 351-366.
20. Nizamuddin S,Sridevi A, Narasimha, G. Production of beta-galactosidase by *Aspergillusoryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*.2008; 7:1096-1100.
21. Siqueira FG, Siqueira EG, Jaramillo PMD, Silveira MHL, Andreus J, Couto FA, Batista LR, Filho, EXF. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulases from filamentous fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*.2010; 64:20-26.
22. Pandey A,Soccol CR, Mitchel D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. *Process Biochemistry*.2000; 35: 1153-1169.
23. Macedo GA, Matsuda LK, Battestin V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciênc. agrotec*. 2005; 29(4): 833-838.
24. Rodriguez-Zuniga, UF, Farinas CS, Neto VB, Couri S, Crestana S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesq. agropec. bras*. 2011; 46(8).
25. Castro MA, Pereira jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrolise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*.2010; 33: 181-188.
26. Singh A, Singh N,BishnoI NR. Production of Cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*. 2009; 1(1).
27. Fernandes AP. Aproveitamento de resíduos de processamento via seca e via úmida do café para obtenção de pectinases. 2014. 135 p. Tese (Doutorado em Aproveitamento de Resíduos Agrícolas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
28. Chandra MS,ViswanathB, Reddy BR. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid sate fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*.2007; 47:323-328.
29. Saha BC,Iten LN, Cotta MA, Wu YV. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, an fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnonol Prog*. 2005; 21(3): 816-22.

30. Menezes CR, Silva ISE, Durrant LR. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos*.2009; 5(1): 68-78.
31. Rizzatto ML. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de Laranja industrializado. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas,89 p. 1999.
32. Whitaker JR. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Segunda Edição. Dekker, 1994.
33. Dantas BF. Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao alagamento. 2002. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.
34. Fernandes MLM, Saad EB, Meira JA, Ramos LP, Mitchell DA, Krieger N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*.2006; 263: 8-13.
35. Baratto CM, Salamoni SP, Costa R, Oliveira CB, Locatelli GO. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência*.2011; 11(2): 15-28.
36. Basu BR, Banik AK, Das M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fishscale. *World Journal of Microbiology Biotechnology*.2008; 24:449-455.