

## **Produção de lacase utilizando planejamento fatorial em meios contendo resíduos agroindustriais**

### **Lacase production using factory planning in means containing agribusiness residues**

Tiago Lira Melo<sup>1</sup>

Vanessa Assis Melo<sup>2</sup>

Carlos Alberto Alves<sup>3</sup>

---

**Resumo:** Os resíduos agroindustriais representam vasta fonte de carbono para indução da produção de enzimas microbiológicas. Dentro deste contexto foram realizados experimentos com o fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* sp UCP SIS – 14, isoladas no semi-árido de Pernambuco com a identificação e catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) registradas no World Federation Culture for Collection-WFCC. Para obtenção de Lacase fúngica utilizando resíduos agrícolas, os experimentos foram produzidos por intermédio da fermentação submersa com variação dos resíduos lignocelulósicos (casca de laranja, cascas de uva, casca de café e melaço) como fonte de carbono, ocorreram em shaker rotacional a 150 rpm a 28 °C por 120 horas. Foram testados a eficiência dos substratos lignocelulósicos como alternativa na produção da enzima lacase. A determinação da atividade enzimática, pH e biomassa foram efetuadas em intervalos de 24 horas, durante 5 dias.

**Palavras-chave:** Produção enzimática, *Aspergillus*, Meios alternativos.

---

<sup>1</sup> UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

<sup>2</sup> UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

<sup>3</sup> UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

**Abstract:** The agro-industrial residues represent vast source of carbon trim induction of microbial enzymes. Within this context experiments were performed with the filamentous fungus of the genus *Aspergillus* sp UCP SIS - 14, isolated in semi-arid of Pernambuco with the identification and cataloged in Crop Bank of the Catholic University of Pernambuco (UNICAP), located at the Research Center for Environmental Sciences (NPCIAMB) recorded in the World Federation Culture Collection for-WFCC. To obtain fungal laccase using agricultural waste, the experiments were produced through submerged fermentation with variation of lignocellulosic residues (orange peels, grape houses, coffee hulls and molasses) as a carbon source, occurred in rotational shaker at 150 rpm to 28 °C for 120 hours. We tested the efficiency of lignocellulosics as an alternative in the production of the laccase enzyme. The determination of enzymatic activity, pH and biomass were taken at 24 hour intervals for 5 days.

**Keywords:** Enzimatic production, *Aspergillus*, Alternative medium

---

## 1. Introdução

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais (Pandey, 1999; Reddy, 2003). O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza.

Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substrato, para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (Tamanini, Haully, 2004; Bustamante *et al.*, 2010; Nigam, Singh, 2011; Menezes *et al.*, 2012; Shamala *et al.*, 2012; Nigam, 2013; Virmond *et al.*, 2013; Abdelmoez *et al.*, 2013).

As comunidades microbianas desempenham um papel significativo para a manutenção e equilíbrio ecológico dos ecossistemas. Esses micro-organismos possuem a capacidade de secretar enzimas (Gams, 2007; Monteiro, 2012; Elizei *et al.*, 2014).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana. Os gêneros de fungo filamentosos comumente encontrados são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium*, e *Alternaria*. (Paques, Macedo, 2006; Wolski, 2008; Lima, Silva, Pinotti, 2014).

O gênero *Aspergillus* é dos mais importantes dentro da biotecnologia microbiana, pois a maioria apresentam habilidades na produção de compostos de importância biotecnológica (Lopes, 2011; Subhash, Mohan, 2011; Monteiro, 2012; Gottschalk *et al.*, 2013; Oliveira, 2013).

O Brasil tem sua economia baseada na produção agrícola (Graminha *et al.*, 2007), e produziu em 2012 cerca de 180 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2012) gerando, por ano, cerca de 1,06 x 10<sup>10</sup> toneladas de resíduos de composição ligninocelulósica (Sánchez, 2009; Ferreira-Leitão *et al.*, 2010), a agroindústria gera como resíduos sólidos principalmente materiais orgânicos, tais como restos e cascas de vegetais. Entretanto quando manejados corretamente, podem ser fonte de nutrientes para a produção de alimentos e obtenção de matérias primas que apresentam um alto valor agregado (Carvalho, Brochier, 2008; Carvalho *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2014).

A utilização de recursos matemáticos, como os planejamentos fatoriais nos processos fermentativos, tem facilitado e diminuído a quantidade de experimentos realizados, pois os resultados obtidos podem selecionar as melhores condições de produção, através da influência das variáveis estudadas (Park *et al.*, 2002; Burket *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2013; Ayeni *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2014).

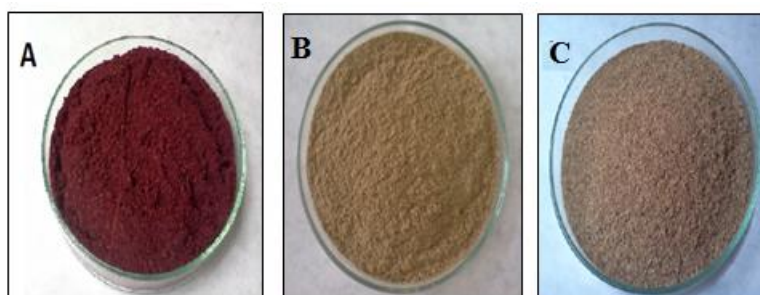
## 2. Material e Métodos

### 2.1 Micro-organismo

Foram usadas amostras do gênero *Aspergillus* sp UCP (14), isoladas no semi-árido de Pernambuco com a identificação e catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) registradas no World Federation Culture for Collection-WFCC. As culturas foram mantidas em Meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 4 °C e aclimatadas em meio SDA suplementado com tween 20 (0,02%), durante 72 horas, a 28 °C, pH 7,0.

### 2.2 Meios Alternativos de Produção

Foram utilizados para formulação dos meios alternativos melão e resíduos de cascas de café, laranja e uva (Figura 1 A-B-C), previamente tratados, lavados com água destilada e seca em estufa a 40°C, no período de 48 a 72 horas. Em seguida o material foi triturado e peneirado para se obter uma consistência mais homogênea, facilitando, assim, a sua dissolução no meio de produção.



**Figura 1 . A- Farelo de uva, B- Farelo de laranja, C- Farelo de Café**

### 2.3 Cinética de Produção de Lacase em Fermentação Submersa

Para produção da enzima lacase foram utilizando resíduos agrícolas, cascas de laranja, cascas de uva, casca de café e melão. Foram testados: cada resíduo isoladamente, cada resíduo adicionado com o Twenn 20 como indutor e cada resíduo adicionado com o melão.

Um grama de cada resíduo foram colocados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. Os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121 °C. Os experimentos foram produzidos por intermédio da fermentação submersa, ocorreram em shaker rotacional a 150 rpm a 28 °C por 120 horas.

## 2.4 Planejamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os principais efeitos e interações das variáveis concentrações: laranja, café e uva. Com 4 pontos centrais e níveis + 1 e - 1, (Tabela 1) com apoio de um Software Statistica 7.0 da Stat Soft.

**Tabela 1.** Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial  $2^3$

Variáveis (g/L)	-1	0	+1
Laranja	6	4	2
Café	3	2	1
Uva	4	3	2

## 2.5 Determinação do pH

Foi realizada por potenciometria em todas as amostras coletadas.

## 2.6 Determinação da Biomassa

O peso seco foi determinado a partir das amostras de 10 mL coletadas dos processos fermentativos. Os ensaios foram filtrados em papel filtro e secos através da liofilização das amostras.

## 2.7 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto utilizado 2,2'-azino-bis etilbentiazoline (ABTS) em mistura de reação de 1 mL contendo 0,3mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e 0,6 mL de fonte enzimático. A mistura de reação foi inoculada, por 5 minutos, a 37 °C e a oxidação do ABTS foi medida pelo aumento da absorbância a 420 nm (Buswell; Cai; Chang, 1995). O branco foi feito com todos os componentes da mistura da reação substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto ( $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) por mg de proteína. A atividade cinética de produção das enzimas foi calculada seguindo a equação descrita por Aguiar Filho (2008).

$$UI/L = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde,

Abs= absorbância

$\varepsilon$ = coeficiente de absorção molar

R= quantidade de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L =Unidade Internacional, onde internacional significa  $\mu\text{mol min}^{-1}$

### 3. Resultados e Discussão

Foram realizados testes de produção da enzima lacase por fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais alternativos (cascas de laranja, uva e café e melão). *Aspergillus sp* UCP -14 cresceu e produziu lacase em todos os meios agroindustriais testados. A influência da utilização dos substratos agroindustriais na produção de lacase está descrita na tabela 2 e Figura 2.

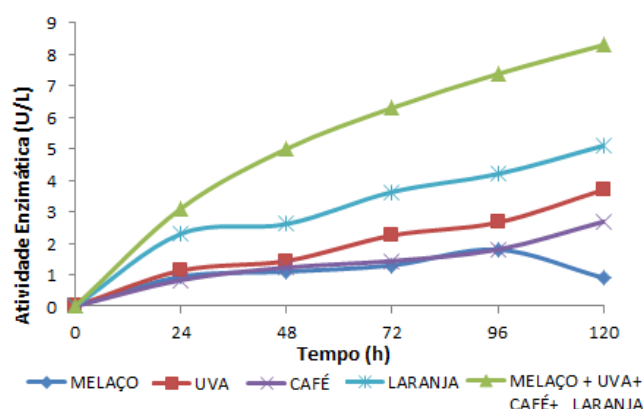
Os resultados mostram que a cultura de *Aspergillus sp* UCP -14 obteve uma maior produção em 120 horas no meio contendo melão adicionado com a uva, o café e a laranja simultaneamente, destacando-se estatisticamente em comparação à produção da mesma enzima pelos demais meios.

A tabela 2 mostra a produção enzimática em 120 horas de fermentação, demonstrando que o meio contendo melão, uva, café e a laranja apresentou maior produção de lacase 8,3 U/L.

**Tabela 1.** Atividades enzimáticas, produção de biomassa e pH inicial (pHI) e pH final (pHF) durante 120 horas de cultivo em resíduos alternativos por *Aspergillus sp*

Resíduos Alternativos	Atividade enzimática (U/L)	Biomassa (g/L)	pHI -pHF
Melaço	0,9	0,05	5,16 - 4,0
Melaço + Tween 20	2,3	0,042	5,4 - 3,9
Melaço + Uva+ Café+ Laranja	8,3	0,59	4,1 - 5,81
Café	2,69	0,14	6,6 - 7,25
Café + Tween 20	5,4	0,19	6,3 - 7,35
Café + Melaço	5,6	0,46	5,9 - 6,46
Uva	3,7	0,15	5,0 - 6,13
Uva+ Tween 20	3,77	0,17	4,8 - 6,1
Uva+ Melaço	3,3	0,21	4,9 - 4,41
Laranja	5,1	0,3	4,5 - 6,87
Laranja + Tween 20	6,5	0,16	4,6 - 6,95
Laranja + Melaço	5,2	0,31	4,45 -7,05

Verifica-se também que a maior biomassa foi obtida no meio que continha simultaneamente melaço, café, uva e laranja (0,59 g/L) quando comparadas nos diferentes processos de produção, além de analisar que todos os resíduos testados através da elaboração de meios alternativos produziram a enzima estudada.



**Figura 2.** Variação da atividade lacásica nos meios alternativos de produção do *Aspergillus sp*, 150 rpm, 28°C.

O baixo custo dos resíduos, associado à capacidade de crescimento dos microorganismos sem necessidade de qualquer suplementação, suporta o uso de resíduos agroindustriais como substrato para crescimento e produção de enzimas.

A utilização de ensaios contendo planejamentos fatoriais reduzem a quantidade de experimentos que envolvem a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, pois os planejamentos simulam condições diferenciadas no mesmo experimento, favorecendo assim a obtenção da melhor condição obtida nos ensaios.

A partir da variação enzimática dos resíduos agroindustriais testados anteriormente para detecção da enzima lacase, foi selecionado o meio com o resíduo que obteve melhor condição e realizado um planejamento fatorial (2<sup>3</sup>).

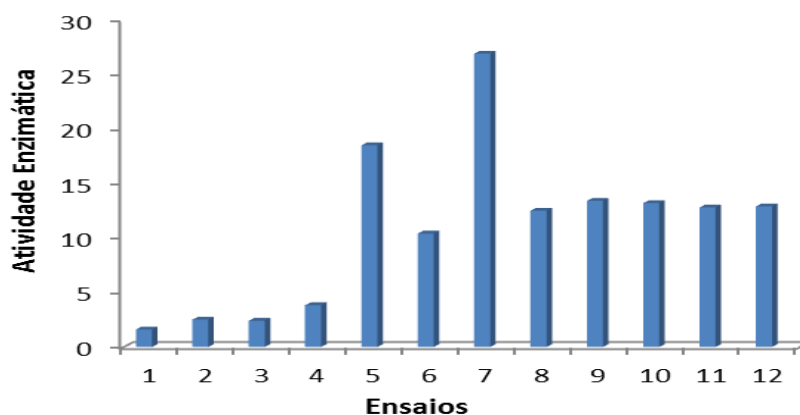
A fermentação ocorreu em shaker orbital à 150 rpm, a 28°C durante 120 horas e suplementado com 0,02% de Tween 20 como indutor. Na tabela 3 encontra-se a matriz decodificada contendo as variáveis: biomassa, pH e também a atividade lacásica dos processos alternativos de produção da enzima estudada nos diferentes ensaios. Verifica-se que a máxima atividade lacásica ocorreu no ensaio 7, que apresentou um valor inicial de laranja (2,0 g/L), café (3,0 g/L) e uva (4,0 g/L) , obtendo assim uma atividade enzimática de 26,9 U/L maior valor obtido nos 12 ensaios realizados.

**Tabela 2.** Produção de Biomassa, pH, e atividade lacásica dos ensaios para as concentrações de Laranja, Café e Uva em 72 horas de cultivo a 28°C a 150 rpm.

Ensaio	Laranja	Café	Uva	Biomassa (g/L)	pH	Lacase (U/L)
1	2,0	1,0	2,0	0,8	5,06	1,6
2	6,0	1,0	2,0	1,6	4,35	2,5
3	2,0	3,0	2,0	0,84	5,15	2,4
4	6,0	3,0	2,0	1,54	4,5	3,83
5	2,0	1,0	4,0	1,62	4,45	18,5
6	6,0	3,0	4,0	1,91	4,0	10,4
<b>7</b>	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>	<b>4,0</b>	<b>1,88</b>	<b>5,25</b>	<b>26,9</b>
8	6,0	3,0	4,0	1,69	4,06	12,5
9	4,0	2,0	3,0	1,7	4,17	13,4
10	4,0	2,0	3,0	1,48	4,35	13,2
11	4,0	2,0	3,0	1,67	4,45	12,8
12	4,0	2,0	3,0	1,57	4,5	12,9

É verificado também que no ensaio 7 foi obtida uma biomassa de 1,88 g/L e o pH final atingido foi de 5,25, sendo assim a melhor condição obtida de produção da lacase descritas na tabela 3 e Figura 3.





**Figura 3.** Figura demonstra que todos os ensaios houve a produção de Lacase, sendo evidenciado a maior produção no ensaio 7.

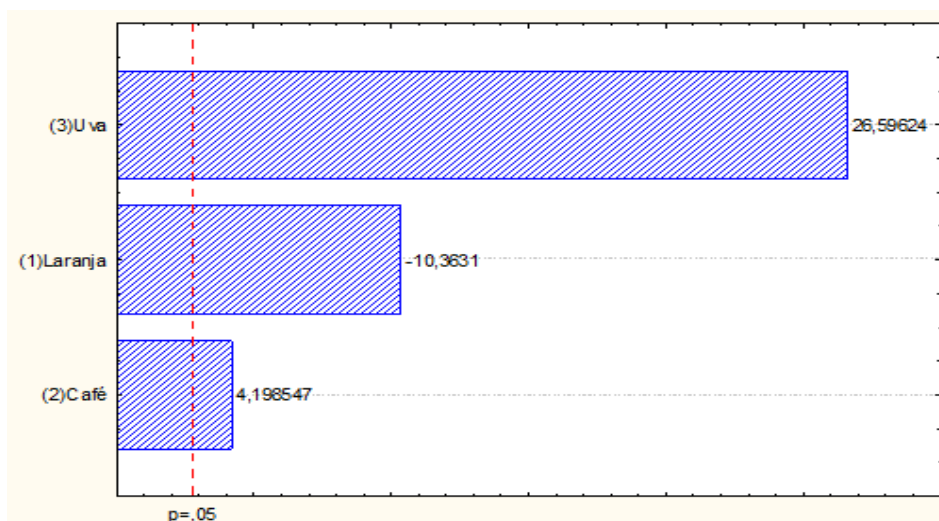
Talon, Montel, Berdague (1996) e Abreu (2013) demonstraram que a concentração de enzima ativa, começa a aumentar ao final da fase do crescimento exponencial e atinge seu máximo durante a fase estacionária.

Ruel *et al.* (1999) sugerem que o metabolismo primário, na ausência de indutores, produz pequenas concentrações de lacase e que a produção de enzimas lenhínicas está associada com o metabolismo secundário. Portanto, a produção de lacase em elevadas concentrações parece ser resultado do metabolismo secundário do fungo, que não é dependente do seu crescimento, mas sim de algum estímulo externo (Moreira *et al.*, 1998).

Os meios alternativos que continham o tween 20 como indutores apresentaram maiores produções de lacase, quando comparados aos demais meios agroindustriais sem a presença do mesmo (Figura 2), o que confirma Pointing *et al.*, (2000), afirmando que a produção de lacase pode ser estimulada pela adição do Tween.

Segundo Pozdnyakova *et al.*, (2004), surfactantes não iônicos como o Tween 20 tem sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos

Os resultados expressos nos diagrama de Pareto (Figura 4) apresenta a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de  $p = 0,05$ . As seguintes variáveis independentes: Laranja, Café e Uva, influenciaram para a produção de lacase. Sendo que a uva e a laranja as variáveis independentes mais relevantes para a produção da enzima, por ambas estarem muito acima dos valores de  $p$ .

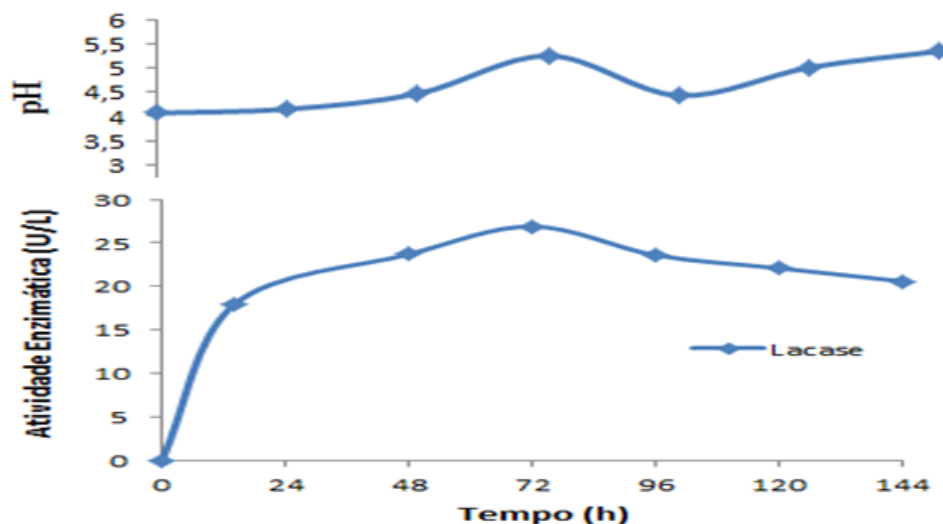


**Figura 4.** Diagrama de Pareto mostrando os principais efeitos das variáveis independentes no processo de produção de Lacase por *Aspergillus sp* UCP 14 a 72 horas de fermentação a 28°C. (1) Laranja, (2) Café, (3) Uva.

A pesquisa de enzimas ligninocelulolíticas revelou a presença da enzima lacase, destacando-se a amostra de *Aspergillus sp* (SIS 14) com as atividades de 26,9 U/L em 72 horas (Figura 5). Trabalhos realizados por Kumaran e colaboradores (1997), apresentaram para o fungo *Pleurotus sajor caju* 10,6 U/L de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico. Baptista 2011, obtiveram atividade de lacase por *Aspergillus terreus* variando de 4,35 a 4,62 U/L em caldo Sabouraud acrescido com óleo diesel.

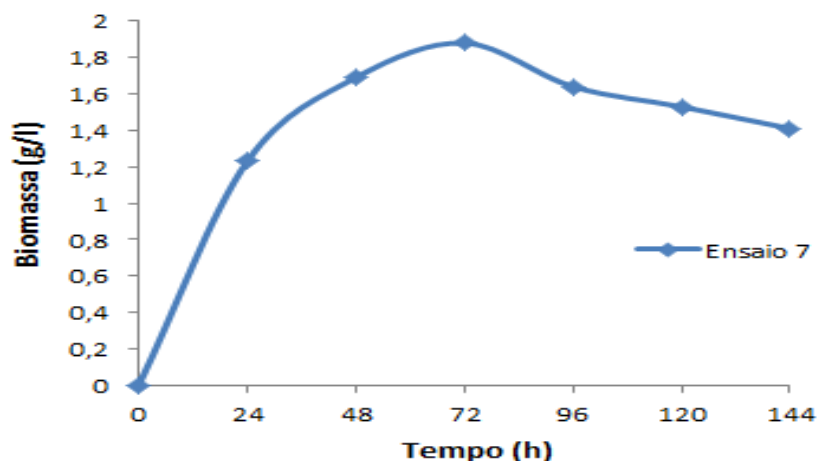
Para Quarantino *et al.* (2008), a produção de lacase por *Panus trigrinus* (linhagem 577.79) variou de 0,024 U/mL e 2,04 U/mL. Téllez -Téllez *et al.* (2008), em ensaios de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, obteve 162U/mg de proteína. Maciel *et al* (2010) relataram que a melhor produção de lacase, 290 U/L, foi observada pelo fungo *Penicillium sp.*(F33), contudo os resultados aqui descritos foram superiores, 26,9 U/L.

As enzimas são específicas e requerem certas condições para aproveitar ao máximo seu desempenho. Essas condições são: pH, temperatura, dose e compatibilidade com os componentes da formulação (Martinez, 2011). Os fungos podem crescer sob uma larga faixa de pH, sendo que a maioria tolera uma escala de pH de 4 a 9 (Papagianni, 2004). O pH ótimo para os fungos segundo Magenta (2011) é o ácido. Para os fungos crescidos isoladamente obteve-se o pH entre 7,0 a 4,5, atingindo o pH ácido sendo assim considerado bom. A variação da faixa do pH estudado durante o perfil de crescimento ocorreu numa faixa de 4,0 a 5,35 verificado na Figura 5.



**Figura 5** - Atividade enzimática do ensaio 7 com a amostra de *Aspergillus sp* (SIS 14)

Os resultados obtidos na produção de biomassa no ensaio 7 com a amostra de *Aspergillus sp* (SIS 14) está descrito na figura 6. Quarantino *et al.* (2008), demonstraram uma produção de biomassa de 1,8 g/L em ensaios de produção de lacase por *Panus tigrinus*. Téllez-Téllez (2008), observou 55 g/L de biomassa, utilizando glicose como fonte de carbono para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Giesse *et al.*, (2004) demonstraram que a produção de biomassa aumentou em 24% (1,4 U/mL) na presença de 0,5g/L de Tween-20 pelo *Botryosphaeria sp*.



**Figura 6.** Valores de biomassa do ensaio 7 com a amostra de *Aspergillus sp* (SIS 14), durante 144 horas.

Estes resultados de enzimas ligninolíticas provindos da utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono para os fungos testados foram muito promissores.

Os resíduos agroindustriais têm sido bastante utilizados na elaboração de meios de produção considerados alternativos, pois são uma alternativa viável, e a maioria desses resíduos

apresenta um elevado valor nutricional, que pode ser assimilado por diversos microrganismos produtores de metabólitos (Novaki et al.,2010; Murugan et al., 2011; Stroparo et al., 2012).

#### 4. Conclusão

Esses estudos de produção enzimática revelam o elevado potencial biotecnológico dos fungos isolados do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco. Os resultados demonstram a importância do uso dos resíduos agroindustriais na elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado surge como uma alternativa viável, para minimizar os custos de produção e também para evitar o descarte de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

Da seleção de meios alternativos produtores de lacase me fermentação submersa, o meio contendo simultaneamente uva, laranja e café se destacou-se como bom produtor apresentando uma atividade enzimática de 8,3 U/L em 120 horas

No planejamento fatorial 2<sup>3</sup> utilizando meios alternativos, tendo como variáveis, uva, laranja e café, verificou-se que o ensaio 7, cujas condições foram 2,0 (g/L) de laranja, 3,0 (g/L) de café e 4,0 (g/L) de uva na composição do meio obteve 26,9 U/L de atividade lacásica em 72 horas de cultivo a 28°C a 150 rpm .

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA-CNPq pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

#### 6. Referências

- ABDELMOEZ, W., MOSTAFA, N. A., & MUSTAFA, A. 2013. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*, v.59, p.290-297.
- ABREU, L. 2013. Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipase por *staphylococcus warneri* ex 17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicas. 57 f. Dissertação (Mestrado Curso de Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- AYENI, A. O., BANERJEE, S., OMOLEYE, J. A., HYMORE, F. K., GIRI, B. S., DESHMUKH, S. C., & MUDLIAR, S. N. 2013. Optimization of pretreatment conditions using full factorial design and enzymatic convertibility of shea tree sawdust. *Biomass and Bioenergy*, v.48, p.130-138.
- BAPTISTA, N.M.Q. 2011. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. Monografia (Especialização em Micologia) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

- BOCCO, A., CUVELIER, M. E., RICHARD, H. & BERSET, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 6, p. 2123-2129.
- BURKERT, J. F. M., MAUGERI, F., & RODRIGUES, M. I. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v.91, n.1, p.77-84.
- BUSTAMANTE, M.A., SUÁREZ-ESTRELLA, F., TORRECILLAS, C., PAREDES, C., MORAL, R., & MORENO, J. 2010. Use of chemometrics in the chemical and microbiological characterization of composts from agroindustrial wastes. *Bioresource Technology*, v.101, p.4068–4074.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y. J.; & CHANG. S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.128, n. 15, 0. 81-87.
- CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2011. Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Café. Brasília. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>. Acesso em 10/08/2014
- CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2012. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_01\\_09\\_17\\_44\\_20\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf)> Acesso em 24/01/2013
- DJEKRIF-DAKHOUCHE, S. , GHERIBI-AOULMI, Z., MERAIHI, Z. & BENNAMOUN, L. 2006. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.*, v. 73, n. 2, p. 190-197.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L., Molinari, GARZON, C. G. & HOURS, R. A. 1992. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid state culture. *Biores. Technol.*, v. 39, n. 1, p. 93-95.
- GIESSE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F.H.; & BARBOSA, E. M. 2004. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.*
- GOTTSCHALK, L.M F; SOUZA, E. F; VIANA, L.A.N.; & TERZI, S.C. 2013. Comparação da produção das enzimas xilanase e feruloil esterase em fermentação em estado sólido e submersa pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, p.01-04.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; & GOMES, E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 1-22.
- GUERRERO, C. C. & BRITO, J. C. 1995. Re-use of industrial orange wastes as organic fertilizers. *Bior. Technol*, v. 53, n. 1, p. 43-51.
- IBGE. Banco de dados agregados. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf). Acesso em 17 de maio de 2012.
- LOPES, F. C., TICHOTA, D. M., SAUTER, I. P., MEIRA, S. M., SEGALIN, J., ROTT, M. B. & BRANDELLI, A. 2013. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annals of Microbiology*, v.63, n.2, p.771-778.
- MA, E.; CERVERA, Q. & SANCHEZ, G. M. M. 1993. Integrated utilization of orange peel. *Biores. Technol.*, v. 44, n. 1, p. 61-63.
- MACIEL, C. C. S., SOUZA, M. A. GUSMÃO, N. B., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactado por petroderivados. *Exacta*, São Paulo. 8(2): 133-144.
- MARGENTA, M. *Fungos – Reino Fungi*. Disponível em: <http://www.mundovestibular.com.br/>. Acessado: 02 de abril de 2014.
- MARTÍNEZ, H. O Fascinante Mundo das Enzimas. Disponível em: [http://www.freedom.inf.br/artigos\\_tecnicos/03072006-1/mundo\\_enzimas.asp](http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/03072006-1/mundo_enzimas.asp). Acessado em: 03 de dezembro de 2014

- MELO, A.G., PEDROSO, R.C.F., GUIMARÃES, L.H.S., ALVES, J.G.L.F., DIAS, E.S., RESENDE, M.L.V. & CARDOSO, P.G. 2014. The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation. *Advances in Microbiology*, v.4, p. 143-150.
- MENEZES, J.D.S., DRUZIAN, J.I., PADILHA, F.F. & SOUZA, R.R. 2012. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.8, n.8, p. 1761-1776.
- MOLINARI, H. B. C. & BOM, E. P. S. 2010. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste Biomass Valor*, 1, 65–76.
- MONTEIRO, M. C. 2012. Identificação de Fungos dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras Mg, Lavras Mg.
- MOREIRA, M.T.; PALMA, C.; FEIJOO, G.; & LEMA, J.M. 1998. Strategies for the continuous production of lignolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 66:27-39.
- NAIDU, G. S. N. & PANDA, T. 1998. Production of pectolytic enzymes – a review. *Bioproc. Eng.*, v. 19, n. 4, p. 355-361.
- NIGAM, P.S. & SINGH, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.37, p.52-68.
- OLIVEIRA, A. C. D. 2010. Otimização da produção de lipases por *penicillium* sp. Através de fermentação submersa. *Bioresource Technology*, Paraná, v. 8, n. 3, p.01-04.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R. & NIGAM, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, v. 77, n. 2, p. 149-162.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. ; NIGAM, P. BRAND, D.; MOHAN, R. & ROUSSOS, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, p. 153–162.
- PAPAGIANNI, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. *Biotechnology Advances*, London, v. 22, p. 189-259.
- PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S. & KIM, S. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, n.6, p.761-766.
- REDDY, G. V. et al.2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor caju*). *Proc. Biochem.*, v. 38, n. 10, p. 1457-1462.
- REDDY, J. B. & HENDRIX, C. M. 1993. In: *Fruit Juice Processing Technology*. NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. (eds). Ag. Science, Florida.
- RODRIGUES, C. 2006. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. 93 f. Dissertação (Mestrado Processos Biotecnológicos) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ROSALES, E.; COUTO S. R. & SANROMÁN, M. A. 2005. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *J. Food Eng.*, v. 66, n. 4, p. 419-423.
- RUEL, K.; ZHANG, H.; NIKU-PAAVOLA, M.; SOLOHEIMO, M.; MOUKHA, S. & JOSELEAU, J.P.1999. *In situ* hybridization and immunocytochemistry in electron microscopy to study the expression of lignolytic enzymes in fungi growing in wood, *10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Yokohama, Japão, 1:534-538.
- SÁNCHEZ, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185–194.
- SHAMALA T. R.; VIJAYENDRA S.V.N. & JOSHI G.J. 2012. Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and -amylase by *Bacillus* sp. cfr-67. *Brazilian Journal of Microbiology*, p.1094-1102.
- SUBHASH, G. V. & MOHAN, S. V. 2011. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresource Technology*, India, v. 28, n. 2, p.9286-9290.



- TAMANINI, C. & HAULY, M.C.O. 2004. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, v.25, n.4, p. 315-330.
- TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. J.; MONTIEL-GONZÁLES, A. M.; SÁNCHEZ, C. & DIAZ-GODINEZ, G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 675-679.
- VILLAS-BÔAS, S.L.; ESPOSITO, E. & MITCHELL, D. A. 2002. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v. 98, n. 1, p. 1-12.
- VIRMOND, E., ROCHA, J. D., MOREIRA, R. F. P. M. & JOSÉ, H. J. 2013. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.30, n.2, p.197-230.
- ZHU, M. J., CHENG, J. R., CHEN, H. T., DENG, M. C. & XIE, W. H. 2013. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, n.60, v.3, p.336-342.