FERMENTAÇÃO DE FARELO DE MANDIOCA, PARA A OBTENÇÃO DE XILANASE, A PARTIR DE UM FUNGO ENDOFÍTICO

Lívia Souza Freitas¹, Thamilly Moreira Silva², Marcelo Franco³, Paulo Bonomo⁴, Janaína Silva de Freitas⁴.

¹ Mestre do Programa de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Biologia, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus-BA, Brasil. E-mail: livia_freitass@hotmail.com

² Mestranda do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada do Bem-Querido, Km 04, 45031-300, Vitória da Conquista – BA, Brasil.

³ Docente da Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus-BA, Brasil.

⁴ Docentes da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Exatas Naturais, 45700-000, Itapetinga-BA, Brasil.

Recebido em: 02/10/2017 – Aprovado em: 21/11/2017 – Publicado em: 05/12/2017
DOI: 10.18677/EnciBio_2017B85

RESUMO

A biotecnologia exerce influência significativa na economia mundial no que diz respeito à produção de enzimas. Metabólitos como estes que possuem vasto campo de aplicações são produzidos por microrganismos, e podem ser obtidos através de bioprocessos como a fermentação em estado sólido. Essa técnica contribui com o desenvolvimento do mercado biotecnológico, como também minimiza impactos ambientais gerados pela produção de resíduos que são descartados de maneira inadequada contaminando o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de xilanase, a partir do fungo *Penicillium sp.*, isolado no Parque Municipal da Matinha, localizado em Itapetinga-BA. O substrato utilizado como fonte de carbono foi o farelo de Mandioca (*Manihot esculenta*). As fermentações foram realizadas em *erlenmeyers* contendo 10g do resíduo de mandioca e concentração de 10^7 de solução de esporos. O delineamento experimental utilizado foi o método estatístico Box Behnken, o qual apresentou 13 pontos fatoriais e uma repetição. Foi avaliada a influência de três variáveis: temperatura (30°C, 34°C e 38°C), umidade (45%, 55% e 65%) e tempo (72, 192 e 312 horas de cultivo). A atividade enzimática máxima de xilanase foi atingida na maior temperatura, a 38°C e umidade de 65%; com a produção de 3,3U/mL. O tempo de fermentação foi desprezado, pois não foi significativo no processo. Estatisticamente a interação da umidade e a temperatura exerceram influência significativa no processo. O isolado *Penicillium sp.* foi capaz de produzir xilanase, a partir de farelo de mandioca, sem adição de qualquer outra fonte de nutrientes.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia, Enzimas, *Penicillium*.

FERMENTATION OF CASSAVA BRAN, FOR OBTAINING XYLANASE, FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS

ABSTRACT

Biotechnology exerts a significant influence on the global economy with respect to the production of enzymes. Metabolites such as these that have a broad field of applications are produced by microorganisms, and can be obtained through bioprocesses such as solid state fermentation. This technique contributes to the development of the biotechnology market, but also minimizes the environmental impacts occasioned by the production of debris that are inadequately discarded, thus contaminating the environment. This work was intended to assess the productive capacity of xylanase, from the fungus *Penicillium sp.*, isolated in the Municipal Park of Matinha, located in Itapetinga-BA. The substrate used as a carbon source was Cassava bran (*Manihot esculenta*). The fermentations were accomplished in erlenmeyers containing 10g of Cassava debris and a concentration of 10^7 of spore solution. The experimental design was the Box Behnken statistical method, which showed 13 factorial points and one repetition. The influence of three variables was assessed: temperature (30°C, 34°C and 38°C), moisture (45%, 55% and 65%) and time (72, 192 and 312 hours of cultivation). The maximum enzymatic activity of xylanase was reached at the highest temperature, at 38°C, and 65% moisture; with the production of 3.3U/mL. The fermentation time was disregarded, since it was not significant in the process. Statistically, the interaction between moisture and temperature exerted significant influence on the process. The isolated *Penicillium sp.* was capable of producing xylanase, under Cassava bran, without addition of any other source of nutrients.

KEYWORDS: Biotechnology, Enzymes, *Penicillium*.

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos têm contribuído com diversos impactos ambientais, os quais estão associados com o aumento exponencial da população, altos índices de produção e geração de resíduos; que ocasionam contaminação do meio ambiente; além de contribuir para a disseminação de doenças. Diante desses fatos, as sociedades contemporâneas encontram uma nova realidade, na qual se faz necessário repensar o atual modelo de desenvolvimento para assegurar a qualidade de vida das gerações futuras. Dessa maneira surge a necessidade de desenvolver ações que envolvam pesquisas no sentido de minimizar esses efeitos (SACCARO JUNIOR, 2011; MENEZES et al., 2012; MENEZES; BARRETO, 2015).

Muitos resíduos agroindustriais são utilizados como fontes de carbono para o crescimento de microrganismos e consequentemente para a produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico (MENEZES; BARRETO, 2015). Santos et al. (2014) afirmam que resíduos agroindustriais como bagaços, palhas ou folhas são boas opções de matéria-prima para meios de fermentação devido ao baixo custo dos mesmos. A estrutura destes subprodutos da agroindústria é heterogênea tendo na composição celulose, hemicelulose, lignina, amido e proteínas que servem de suporte e/ou de fonte de nutrientes para o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias (PINTO et al., 2005).

Nesse cenário, o resíduo agroindustrial da mandioca tem se destacado pela produção mundial. Em 2013/2014, a geração desse substrato chegou a 276,7 milhões de toneladas. Dentre os principais países produtores, o Brasil é o quarto no

ranking mundial com 23,2 milhões de toneladas e os Estados com maior produção são Pará, Paraná e Bahia (BRASIL, 2014). O gerenciamento desse resíduo tem se revelado como subsídio para geração de tecnologia e produção de enzimas, através de processos como a fermentação em estado sólido (FES).

A bioconversão dos resíduos agrícolas tem despertado interesse crescente, uma vez que esses materiais representam recursos possíveis e utilizáveis para a elaboração de produtos úteis. Deste modo, a FES desempenha papel de destaque no aproveitamento de resíduos agroindustriais, pois através do crescimento de microrganismos, ocorre a síntese de vários compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para diversos segmentos além do elevado valor agregado (AMORIM et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Pirota et al. (2015) destacam que a FES tem apresentado vantagens em relação a Fermentação Submersa (FS), pois o crescimento dos microrganismos ocorrem mimetizando seu *habitat*, contribuindo de forma natural para o desenvolvimento. Nesta perspectiva, os fungos endofíticos têm se mostrado associados aos processos fermentativos (ALVES et al., 2016). Esses microrganismos representam um grupo diversificado e estão presentes na maioria das plantas de ecossistemas naturais. A presença desses fungos, aparentemente, não causa danos ao material vegetal, entretanto podem alterar características fisiológicas e morfológicas das plantas e produzir substâncias de interesse biotecnológico como as enzimas (ORLANDELLI et al., 2012).

A busca por microrganismos que atuem como produtores de enzimas de degradação de material vegetal tem despertado interesse, visto que esses organismos são capazes de produzir hidrolases extracelulares, como parte do seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro e/ou para obter nutrientes do solo (BORGES et al., 2009). A enzima xilanase está representada nesse cenário, pois hidrolisa o principal componente da hemicelulose vegetal, a xilana e são comumente utilizadas nas indústrias de papel, alimentos, têxtil, bebidas e ração animal (ADELA et al., 2015).

Várias pesquisas com o intuito de estudar moléculas, como as xilanases microbianas, com alto valor agregado, têm despertado reconhecido potencial biotecnológico e está inserido em um mercado em expansão (CASTRO et al., 2015; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2015). Apesar da relevância, a produção de valores significativos de proteína extracelular está associada a vários fatores (temperatura, umidade e tempo de cultivo) e ainda é restrita a alguns microrganismos. Espécies como *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens* se destacam como as mais estudadas quando se prioriza a produção de enzimas celulolíticas (HEINZ et al., 2014).

O gênero *Penicillium*, se destaca abrigando mais de 150 espécies com características desejáveis; apresentam benefícios na medicina a partir dos seus subprodutos, atuam na fabricação de queijos e ainda é um deteriorador comum de pães, bolos e outros produtos. Espécies deste gênero produzem um complexo enzimático eficiente que degradam constituintes da parede celular vegetal, podendo apresentar alta produção de celulasas e xilanases (REIS et al., 2013). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da xilanase, através da fermentação do farelo de mandioca, a partir de um isolado endofítico do gênero *Penicillium*.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo endofítico utilizado neste estudo foi coletado a partir de tronco de árvores, do Parque Municipal da Matinha (PMM) (Figura 1), no município de Itapetinga – BA, latitude 15°14'17"S e longitude 40°13'52"O (Google Earth). A reserva situa-se a margem do principal rio do município, o Catolé e dispõe de uma área de 24 hectares, sendo a metade da área composta de Mata Atlântica (NASCIMENTO, 2010).

FIGURA 1: Área do Parque Municipal da Matinha em Itapetinga-BA (linha vermelha)
Fonte: Google Earth, (2016).

Os fragmentos vegetais coletados passaram por um processo de desinfecção (CHAPLA et al., 2013). Foram imersos primeiramente em uma solução de hipoclorito a 1%, em seguida em álcool 70% e por fim em água destilada autoclavada, por um período igual a um minuto. Após esta etapa, os fragmentos foram secos em papel filtro e plaqueados em placas de petri, contendo meio de cultura Potato Dextrose Ágar - PDA (HIMEDIA), acrescido de ácido tartárico. As placas foram incubadas em estufa (SOLAB), a uma temperatura de 30°C, por um período de sete dias. Após o cultivo do microrganismo, o mesmo foi repicado e isolado para posterior identificação e estoque.

A identificação do microrganismo isolado foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (BIOVAL) a partir da chave de identificação de Dugan (2006). Foram observados esporos e estruturas reprodutivas. Para armazenamento do isolado, por longos períodos, os esporos foram ressuspensos em leite em pó, diluído a 5% (m/v) e transferidos para *Eppendorf* contendo sílica gel estéril.

O microrganismo utilizado foi repicado separadamente em três *Erlenmeyers*, contendo meio de cultura Potato Dextrose Ágar (PDA), durante sete dias, a 37°C. Foram feitas raspagens com o auxílio de pérolas de vidro e água destilada autoclavada, para preparação da solução de esporos. Essa suspensão foi preparada com Tween 80 (VETEC), a 0,1%. Retirou-se uma amostra de um mL, para realização de três diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , e 10^{-3}). Sequencialmente, realizou-se a quantificação de esporos na câmara de Neubauer. A concentração utilizada na FES foi de 10^7 esporos, por grama de resíduo (desidratado e autoclavado, previamente).

O resíduo de mandioca foi adquirido em feiras livres e mercados da cidade de Itapetinga-BA. Antes do uso, o subproduto foi lavado com água destilada e depois desidratado em estufa de secagem (SOLAB), a 70°C, por 24 horas. Posteriormente, o resíduo foi triturado em moinho tipo WILEY (ACB LABOR), com uma granulométrica aproximada de 0,2 mm. A umidade do farelo foi calculada no determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) foi desenvolvida na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Itapetinga, no Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA). As fermentações foram realizadas em *Erlenmeyers*, contendo 10 g de farelo de mandioca, com adição de 10^7 esporos, por grama de substrato seco. Os *Erlenmeyers* com o meio de cultura foram esterilizados a 121°C, durante 15 minutos, em autoclave. Após esse procedimento, o produto estéril foi incubado com microrganismo, sob variações de temperatura, umidade e tempo de cultivo.

Após o período de incubação, foram adicionados 50 mL de solução tampão citrato de sódio (50 mM) (VETEC), pH 4,8. As amostras ficaram sob agitação por 10 minutos, a 30°C, para homogeneização. O extrato bruto foi separado através de filtração (auxílio de gaze e algodão) e armazenado em tubos Falcon, previamente rotulados. Após esta etapa os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 4.000 rpm (CETRIBIO modelo 80-2B) e o sobrenadante foi utilizado no momento da análise (SANTOS et al., 2011).

A determinação da atividade enzimática da xilanase foi realizada segundo Miller (1959). A reação enzimática consiste na mistura de um mL de extrato enzimático (sobrenadante da cultura), um mL de solução de 1% xilana (SIGMA), a 50°C, por 30 minutos. Logo após, adicionou-se dois mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), em banho-maria, por cinco minutos, a 100°C. Acrescentou-se 10 mL de água destilada, ao caldo enzimático e homogeneizou-se. A leitura da absorbância foi realizada a 550 nm (GHOSE, 1987). A curva padrão para xilanase foi construída a partir da determinação de glicose, nas concentrações de 0,2 a 2,0 g/L, pelo método do DNS, segundo Miller (1959). A unidade da atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de açúcar redutor, por minuto, a 50°C. Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática é expressa em U/mL e libera um μmol de açúcar redutor.

O delineamento experimental utilizado foi o método estatístico Box Behnken, o qual apresentou 13 pontos fatoriais e uma repetição (Tabela 1). Foram avaliados a influência da temperatura, umidade e tempo de cultivo, na atividade de xilanase. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando o teste T, análise de regressão e plotagem de superfície de resposta (COMPARINI, 2009), para a obtenção do ponto ótimo de atividade enzimática, bem como as variáveis e as interações que foram significativas no processo. Os efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas foi *Statistical Analysis System®* 9.3 (SAS - Inst. Inc., Cary, NC) e o *SigmaPlot* 11.0.

TABELA 1 – Delineamento experimental baseado no método estatístico Box Benhker

Ensaio	Trat.	Tempo (dias)	T (°C)	Umid. (%)	X1	X2	X3	Repetições
1	1	3	34	45	-1	0	-1	1
2	1	3	34	45	-1	0	-1	2
3	2	8	34	55	0	0	0	1
4	2	8	34	55	0	0	0	2
5	3	8	30	45	0	-1	-1	1
6	3	8	30	45	0	-1	-1	2
7	4	3	34	65	-1	0	1	1
8	4	3	34	65	-1	0	1	2
9	5	8	38	65	0	1	1	1
10	5	8	38	65	0	1	1	2
11	6	8	38	45	0	1	-1	1
12	6	8	38	45	0	1	-1	2
13	7	13	34	45	1	0	-1	1
14	7	13	34	45	1	0	-1	2
15	8	3	30	55	-1	-1	0	1
16	8	3	30	55	-1	-1	0	2
17	9	3	38	55	-1	1	0	1
18	9	3	38	55	-1	1	0	2
19	10	8	30	65	0	-1	1	1
20	10	8	30	65	0	-1	1	2
21	11	8	38	65	0	1	1	1
22	11	8	38	65	0	1	1	2
23	12	13	38	55	1	1	0	1
24	12	13	38	55	1	1	0	2
25	13	13	34	65	1	0	1	1
26	13	13	34	65	1	0	1	2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em virtude da constituição particular dos resíduos agroindustriais, o substrato deve ser avaliado para o uso na fermentação em estado sólido. A caracterização centesimal relatada por Rivera et al. (1993), utilizando técnicas gravimétricas, encontraram no farelo de mandioca em base seca, 39,7% de fibra detergente neutro (FDN), 23,8% de fibra detergente ácido (FDA), 16,7% de hemicelulose, 15% de celulose, 4,8% de lignina e 10% de pectina. Dentre esses compostos, identifica-se a hemicelulose, e esta por sua vez apresenta a xilana como principal constituinte (KAYSERILIOĞLU et al., 2003).

Diante disso, além de atuar como um bom resíduo nos processos fermentativos que avaliam a atividade enzimática de xilanases, celulasas, pectinases (SORNYOTHA et al., 2010; NAIR et al., 2011), esta utilização contribui para a mitigação dos impactos ambientais causados pela alta produção de resíduos agroindústrias que são descartados em ambiente inadequado. O teor de umidade

contido no farelo de mandioca, selecionado para a FES apresentou 89,9% de matéria seca e 10,1% de água. Desta forma, calculou-se a quantidade de água a ser utilizada nos pontos de umidade estabelecidos para o experimento (Tabela 2).

TABELA 2: Teor de umidade do farelo de mandioca.

Umidade	Volume de água adicionado a 10g de resíduo (mL)
45%	7,28
55%	10,87
65%	16,52

O isolado endofítico *Penicillium sp.*, identificado a partir de lâminas contendo estruturas reprodutivas (FREITAS, 2014) foi capaz de produzir xilanase, sem adição de nutrientes ou quaisquer substâncias indutoras; sob a presença do farelo de mandioca e água. No presente estudo, a avaliação da atividade enzimática com a fermentação de farelo de mandioca, a partir de *Penicillium sp.* foi realizada sob perspectiva de três variáveis: temperatura (30°C, 34°C e 38°C), umidade (45%, 55% e 65%) e tempo (72, 192 e 312 horas de cultivo). A atividade enzimática máxima de xilanase foi atingida na maior temperatura, 38°C e umidade, 65%; com a produção de 3,3 U/mL (Figura 2).

FIGURA 2: Efeitos da umidade e do tempo de fermentação na atividade de xilanase.

O tempo de fermentação foi desprezado, pois não foi significativo no processo. Observou-se que o valor da atividade enzimática da xilanase foi próximo ao encontrado por Stropatro et al., (2012). Os autores utilizaram o *P. verruculosum*, que apresentou atividade enzimática de $4,62 \pm 0,35$ U/mL; com uma temperatura que variou de 30°C a 40°C e com umidade entre 68% e 80%. Ainda foram realizadas fermentações com os microrganismos *P. glabrum J3*, *P. glabrum J11* e *A. niger J4* que produziram atividade enzimática para xilanase de $0,54 \pm 0,09$ U/mL; $0,62 \pm 0,12$ U/mL e $8,73 \pm 0,34$ U/mL; respectivamente.

Ressalta-se nesse contexto uma variação a cerca da quantidade de enzima produzida entre as espécies e até mesmo entre linhagens, sugerindo que a escolha do microrganismo pode ser definidor durante o processo. No que se refere às análises estatísticas desse estudo nenhuma variável obteve ação independente no

processo, mas as interações entre a umidade e a temperatura exerceram influência significativa ($p < 0,05$) para produção da enzima (Figura 3).

FIGURA 3: Diagrama de Pareto, com as variáveis de temperatura e umidade, para obtenção da Xilanase.

Segundo Bianchi et al. (2005) o teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros para o sucesso da FES, pois facilita a dissolução e a transferência de massa de nutrientes e de oxigênio (SÁNCHEZ, 2009). De acordo com Mahanta et al. (2008), o elevado teor de água ocasiona a redução da porosidade da matriz-sólida, enfraquecendo a troca de gases; e o baixo teor limita o desenvolvimento do microrganismo ocasionando baixa atividade enzimática. No presente estudo, a atividade enzimática máxima foi atingida a 65% de umidade; o que pode ter ocasionado interferência no crescimento do fungo, reduzindo a aderência ao substrato, restringindo o sensoriamento celular.

A temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, crescimento e esporulação do microrganismo e a formação do produto. Diante disso, o calor gerado durante o processo deve ser liberado, pois altas temperaturas não são adequadas para os microrganismos, sendo uma variável difícil de controlar na FES (SÁNCHEZ, 2009). A temperatura de 38°C, estabelecida como máxima nos ensaios, também pode ter sido um fator de restrição para esporulação do microrganismo, associado a baixa produção enzimática.

Santos et al. (2013) ao utilizarem FES, a partir de *Aspergillus niger*, com farelo de cacau (*Theobroma cacao*), conseguiram obter enzimas celulolíticas, dentre estas a xilanase. As fermentações ocorreram a 30°C, variando o tempo de cultivo (24 e 120 horas) e a atividade de água (0,963; 0,976 e 0,983). A condição na qual a atividade enzimática para xilanase foi mais significativa foi a partir de 64 horas de fermentação, com uma produção de 11,86 U/mL e uma atividade de água de 0,971.

Os resultados encontrados por Terrasan et al. (2010), a partir de *P. janczewskii*, fermentado com farelo de trigo apresentam valores superiores quando comparados com o mesmo microrganismo fermentado usando bagaço de cana; registrando atividade de xilanase de 15,4 U/mL e 3,05 U/mL, respectivamente. Esse resultado fomenta que o substrato escolhido para fermentação é uma variável que também deve ser considerada, pois pode limitar de maneira considerável a técnica.

Adela et al. (2015) estudaram a produção e otimização das xilanases, por *Penicillium sp.*, utilizando como substrato subprodutos de cereais oriundos do

processo de destilação, denominados grãos destiladores (DDG), cascas de amendoim, biomassa de sorgo, bagaço de cana de açúcar e palha de arroz. A melhor produção da xilanase ocorreu após sete dias (168 horas) de cultivo com uso do DDG (220 IU/g), seguida do bagaço de cana (190 IU/g). Quando foi avaliada a quantidade de substrato, a melhor produção da xilanase ocorreu com 10g do DDG, sendo o valor encontrado 270 IU/g.

Ang et al. (2013) ao obterem celulases e xilanases por FES, a partir de *Aspergillus fumigatus* SK1, utilizando como fonte de carbono o óleo de palma não tratado (OPT) encontraram que as atividades mais elevadas para xilanase ocorreram a 80% de umidade, pH 5 e concentração de esporos 10^8 esporos/g de inóculo, apresentando valor de atividade enzimática igual a 418,70 U/g.

No estudo de Ncube et al. (2012) utilizando o fungo *Aspergillus niger* e semente de *Jatropha curcas*, os autores encontraram a atividade máxima da xilanase a partir de 48 horas de cultivo, com uma queda de 50% na produção após 240 horas (10 dias). A atividade enzimática máxima obtida para xilanase foi de 6.087 U/g, a 25°C, através da suplementação com extrato de malte, peptona, e extrato de levedura; como fonte de nitrogênio.

Os estudos relacionados as propriedades da xilanase, bem como a produção a partir de *Penicillium* sp. sob FES continuam sendo observadas e reportadas em estudos recentes, de elevado impacto no meio científico (MURTHY; NAIDU, 2012; LIAO et al., 2015; MARQUES et al., 2017). É importante destacar ainda que os processos fermentativos associados a fungos endofíticos, para produção de bioprodutos, envolvem processos celulares regulados sensivelmente pelo meio ambiente em que se encontram.

São muitas as variáveis inseridas no processo e que podem atuar de maneira determinante no rendimento do produto. Dessa forma é imprescindível a otimização de variáveis como temperatura, umidade, concentração de esporos e fonte de nutrientes para que o processo fermentativo tenha êxito.

CONCLUSÃO

O isolado endofítico *Penicillium* sp. e o substrato de farelo de mandioca pode ser considerado uma alternativa viável para produção de xilanase, como também, em processos fermentativos. Entretanto, tornam-se necessários mais estudos para aperfeiçoar a atividade enzimática para xilanase, induzida por *Penicillium* sp, a partir de resíduo agroindustrial da mandioca. Essas ações irão contribuir para gerar os avanços tecnológicos necessários, redução no custo da produção de enzimas e o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal, como fonte de energia renovável.

REFERÊNCIAS

- ADDELA, I.R.; GUJJULA, R.; SURENDER, M.; NYAPATI, S.; RUDRAVARAM, et al. Production and Optimization of Xylanase from *Penicillium* species in Solid-State Fermentation. **International Journal of Recent Biotechnology**, v.3, n.2, p.15 -21, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280235053_Production_and_Optimization_of_Xylanase_from_Penicillium_species_in_Solid-State_Fermentation>
- ALVES, N.M.; GUIMARÃES, L.H.S.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, P.G. Production and Partial Characterization of an Extracellular Phytase Produced by *Muscodor* sp. under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 23-32, 2016.

Disponível em<<http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.61003>> doi: 10.4236/aim.2016.61003.

AMORIM, G.M.; SANTOS, T.C.; PACHECO, C.S.V.; BARRETO, I.M.A.; FREIRE, D.M.G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 24-27, 2012. Disponível em<http://revistas.unisinos.br/index.php/estudos_tecnologicos/article/viewFile/ete.2012.81.04/1355> doi: 10.4013/ete.2012.81.04.

ANG, S.K.; SHAZA, E.M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A.A.; MADIHAH, M.S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Elsevier Process Biochemistry**, p.1-10, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>> doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.019.

BRASIL – **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento/Departamento de Economia Rural**. Análise da Conjuntura Agropecuária - Mandioca Safra 2014/2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426390/1/Ct102.pdf>>

BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em Estado Sólido. In: Willibaldo Schmidel et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blucher: São Paulo, v. 2, 247-276, 2005.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M.T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective bitransformations using fungi as biocatalysts. **Elsevier Tetrahedron – Asymmetry**, v. 4, p.385-397, 2009. Disponível em<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957416609001013>> doi:10.1016/j.tetasy.2009.02.009.

CASTRO, A.M.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, i. 3, p.1588-1602, 2015. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25413792>> doi: 10.1007/s12010-014-1368-2.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, p. 421-437, 2013. Disponível em<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/75343/2-s2.0-84880537758.pdf?sequence=1>>

COMPARINI, A.; PASSOS, G.; GRAZIADEI, H.; FERREIRA-SILVA, P. H.; LOUZADA, F. Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares de estatística. **São Carlos**, v. 1001, p. 14, 2009.

DUGAN, F. M. **The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature**. Ed. Spi., 2006.

FREITAS, L.S. **Produção de xilanases por fungo filamentoso isolado do Parque Municipal da Matinha em Itapetinga**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biologia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2014.

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

HEINZ, K.G.H.; DOMINGUEZ, A.C.; SILVA, P.R.; BOTELHO, T.K.R.; TAVARES, L.B.B. Avaliação da Atividade hidrolítica de micro-organismos isolados de resíduo do processamento de papel. **REA – Revista de estudos ambientais (Online)**, v.16, n. 2, p.37-47, 2014.

KAYSERILIOĞLU, B. Ş., BAKIR, U., YILMAZ, L., & AKKAŞ, N. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. **Bioresource Technology**, v.83, n.3, p.239-246, 2003. Disponível em< [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00258-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00258-4)> doi: 10.1016/ S0960-8524(02)00258-4.

LIAO, HANPENG; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; MEI, X.; MA, H.; SHEN, Q.; XU, Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Nature Scientific Reports**, v.5:12631, 2015. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224514>> doi: 10.1038/srep12631.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1729 - 1735, 2008. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509877>> doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.046.

MARQUES, G. L. ; REIS, N. S. ; SILVA, T. P. ; FERREIRA, M. L. O. ; AGUIAR-OLIVEIRA, E. ; OLIVEIRA, J. R. ; FRANCO, M. . Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v.1, p.1, 2017. Disponível em< <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-017-9994-x>> doi: 10.1007/s12649-017-9994-x.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A.R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM Santa Maria**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v.19, n.2, p.1365-1391, 2015. Disponível em< <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/16853>> doi: 105902/2236117016853.

MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; SOUZA, R. R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.8, n.8, p.1761-1776, 2012. Disponível em<

<http://dx.doi.org/10.5902/223611707165>> doi: 10.5902/223611707165. Acesso em: 25 de Agosto de 2017.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>> doi: 10.1021/ac60147a030.

MURTHY, P.S.; NAIDU, M.M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Springer Food and Bioprocess Technology**, v.5, i.2, p. 657 – 664, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-010-0331-7>> doi: 10.1007/s11947-010-0331-7.

NAIR, M. P. D.; PADMAJA, G.; MOORTHY, S. N. Biodegradation of cassava starch factory residue using a combination of cellulases, xylanases and hemicellulases. **Journal Biomass and Bioenergy**, v.35, i.3, p.1211-1218, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.009>> doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.009.

NASCIMENTO, L. S. A importância do Parque Municipal da Matinha, Itapetinga – BA, na conservação de espécies de aves ameaçadas pelo tráfico. **Enciclopédia Biosfera**, v.6,n.10, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/a%20importancia.pdf>>

NCUBE, T.; HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.K.; JANSEN, E.L. et al. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118 - 123, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011004511>> doi: 10.1016/j.indcrop.2011.11.024.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, 2012. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1346/468>>

PÉREZ-RODRÍGUEZ, N., OLIVEIRA, F., PÉREZ-BIBBINS, B. ET AL. Erratum to: Optimization of Xylanase Production by Filamentous Fungi in Solid-State Fermentation and Scale-up to Horizontal Tube Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.173, n.3, p.803-825, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728763>> doi:10.1007/s12010-014-0895-1.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico, EMBRAPA**, 2005.

PIROTA, R.D.P.B; TONELOTTO, M.; DELABONA, P.S.; TREMACOLDI, C.R.; FARINA, C.S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.9, p.1606-1612, 2015. Disponível

em< <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141241>> doi: 10.1590/0103-8478cr20141241.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597-603, 2013. Disponível em< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413011929>> doi:10.1016/j.biortech.2013.07.124

RIVERA, C.J.; GERARDI, A.G.; INFANTE, R.B.; CARRASCO, H.J.; RODRIGUES, O. Dietary fiber analysis of cassava using gravimetric methods. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.43, n.1, p. 78-80. Disponível em< <https://www.tib.eu/de/suchen/id/BLSE%3AEN009640538/Dietary-fiber-analysis-of-cassava-using-gravimetric/>>

SACCARO JUNIOR, N. L. Desafios da bioprospecção no Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA**. Brasília, p.01-38, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1568/1/TD_1569.pdf>

SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v.27, n.2, p.185-194, 2009. Disponível em<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100826>>doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001.

SANTOS, F.A.; MELO, A.L.M.; BONFIM, K.S.; BARROS, T.V.F.; SANTOS, S.F.M. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei* em cultivo semissólido. **Revista Saúde & Ciência Online**, v.3, n.3, 2014. Disponível em:< <http://www.ufcg.edu.br/revistasauedeeciencia/index.php/RSC-UFCG/article/view/181/118>>

SANTOS, T. C.; GEORGE FILHO, A.; ROCHA, T. J. O. FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011. Disponível em< <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/8025/8319>> doi: 10.5433/1679-0375.2011v32n1p87.

SANTOS, T. C.; GOMES, D.P.P.; BONOMO, R.C.F.; FRANCO M. Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Elsevier Food Chemistry**, v. 133, n.4, p. 1299-1304, 2012. Disponível em< <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.115>. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.115.

SANTOS, T.C.; ROCHA, T.J.O.; OLIVEIRA, A.C.; ABREU FILHO, G.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma Cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.65-71, 2013. Disponível em< <http://www.scielo.br/pdf/aib/v80n1/a10v80n1.pdf>>

SORNYOTHA, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. An efficient treatment for detoxification process of cassava starch by plant cell wall-degrading enzymes. **Journal of Bioscience and Bioengineering Year**, v.109, i.1, p. 9-14, 2010. Disponível em< <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.06.021> > doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.06.021.

STROPARO, E.C, BEITEL, S.M, RESENDE, J.T.V. DE, KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciências Agrárias**, v. 33, n.6, p. 2267-2278, 2012. Disponível em< <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/11792/11683>> doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n6p2267.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M.C.; CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v.101, n.11, p.4139-43, 2010. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122825>> doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.011.