

REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CMCASE E PECTINASE POR PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO CASCA DE CAFÉ SUPLEMENTADA COM MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO¹

ANGRA PAULA BONFIM RÊGO², JOICE RAÍSA BARBOSA CUNHA², ROBERTA
SOUZA SANTOS², FÁBIA GIOVANA DO VAL DE ASSIS² & PATRÍCIA LOPES LEAL²

¹Publicado no Ano de 2019;

²Universidade Federal da Bahia, angra_s2@hotmail.com.

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de CMCase e pectinase por uma linhagem de *Aspergillus* spp. (LEMI 15) cultivada sob fermentação estado sólido em casca de café suplementada com manipueira (resíduo proveniente da prensagem da massa de mandioca para produção de farinha), ao longo de 72 horas. O efeito da proporção entre os substratos (70 e 90% casca de café: manipueira; p:v), pH (5 e 6) e temperatura (30 e 35°C) sobre a produção das enzimas também foi avaliado. Os resultados indicaram que o isolado fúngico foi hábil em produzir todas as enzimas avaliadas, independente dos tratamentos. Nenhum efeito significativo das variáveis ambientais foi verificado. Maior atividade enzimática foi registrada nas primeiras 24 horas de fermentação (3,0 e 3,93 U.mL⁻¹ para CMCase e pectinase, respectivamente). O tempo de fermentação influenciou a atividade de todas as enzimas, sendo verificada a redução da atividade enzimática, ao final de 72 horas do processo fermentativo.

Palavras chaves: *Aspergillus*, enzimas, resíduos agroindustriais.

PRODUCTION OF ENZYMES CMCase AND PECTINASE BY FERMENTATIVE PROCESS USING COFFEE HUSKS SUPPLEMENTED WITH MANIPUEIRA AS SUBSTRATE

Abstract: The aim of this study was to evaluate the production of CMCase and pectinase by strain of *Aspergillus* spp. (LEMI 15) cultivated on state solid fermentation in coffee husk supplemented with manipueira (waste from the cassava mass press for production of flour), for 72 hours. The effect of the proportion between substrates (70 and 90% coffee husk: cassava waste; p:v), pH (5 and 6) and temperature (30 and 35°C) on the production of enzymes was also evaluated. The results indicated that the fungal isolate was able to produce all enzymes, independent of the treatments. No significant effect of environmental variables was verified. Higher enzymatic activity was recorded at 24 hours of fermentation (3,0 and 3,93 U.mL⁻¹ for CMCase and pectinase, respectively). The fermentation time influenced the activity of all enzymes, and the reduction of enzyme activity at the end of 72 hours of fermentation.

Key words: agro-industrial waste, *Aspergillus*, enzymes.

Introdução

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentre as novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (ROVEDA et al., 2010). No entanto, vários gargalos tecnológicos ainda podem ser reconhecidos quanto à produção industrial de enzimas, sendo o custo de produção um dos pontos mais avaliados (STROPARO et al., 2012). Como alternativas existentes a fim de diminuir esses custos, estão à seleção do agente biológico produtor das enzimas de interesse e o emprego de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais que são, geralmente, descartados por não terem na maioria das vezes, aplicações definidas. Além de possibilitar a geração de produtos com relevantes aplicações industriais, a utilização desses resíduos em diferentes processos biotecnológicos representa ainda uma forma de minimizar problemas ambientais e energéticos (TAMANINI e HAULY, 2004).

No Brasil, resíduos gerados pela cafeicultura e pela mandiocultura chamam a atenção pelo volume em que se acumulam no ambiente, muitas vezes sem tratamento prévio e consistindo,

portanto, como um problema ambiental. 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 (ORLANDELLI et al., 2012). Segundo ainda este autor, 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. A mandiocultura, por sua vez, abrange, aproximadamente, dois milhões de hectares, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de mandioca, cuja produção é de aproximadamente 26 milhões de toneladas de raízes frescas (FELIPE et al., 2010). A partir do processamento industrial da mandioca para produção de farinha (principal produto derivado da mandioca) é gerado um resíduo líquido conhecido como manipueira, caracterizada pela elevada carga orgânica, composta principalmente por açúcares solúveis de fácil fermentação e pela presença de um glicosídeo característico da planta de mandioca (linamarina) potencialmente hidrolisável à ácido cianídrico e de toxicidade significativa (NEVES et al., 2014).

A utilização da manipueira para diversos fins tem sido relatada na literatura, tais como produção de biofertilizante (VIEITES, 1998), nematicida, fungicida e inseticida (GONZAGA et al., 2007), ração animal (WOSIACKI ; CEREDA et al., 2002), produção de biosurfactante (BARROS et al., 2008), fabricação de tijolos a frio, produção de biogás, vinagre, sabão e ácido cítrico, como também na produção de etanol (SUMAN et al., 2011), biosurfactantes (NITSCHKE ; PASTORE, 2006) e fertirrigação (FERREIRA ; ARAÚJO, 2012). Não diferentemente, a casca de café também tem sido proposta para diversas finalidades como suplementação de ração animal (LEITÃO et al., 2005), produção de carvão ativado (OLIVEIRA et al. 2008), geração de energia (FARIA et al., 2015), adubação (SEDIYAMA et al., 2010) e na construção de painéis aglomerados para construção civil (MENDES et al., 2010).

Produção de enzimas utilizando casca de café e manipueira como substratos fermentativos é reconhecida na literatura: MACEDO et al. (2005) e SILVA et al. (2012) apontaram, respectivamente, a casca de café como substrato potencial para produção de tanase e lacase por diferentes linhagens fúngicas; Pothiraj et al. (2006) e Teixeira et al. (2017) reportaram, respectivamente, a produção de celulases e amilases a partir da fermentação de manipueira por fungos filamentosos. Contudo, no presente trabalho, sugerimos a potencialidade desses resíduos serem juntamente empregados como substratos em processos fermentativos para obtenção de enzimas de interesse industrial, como a CMCase e pectinase, por uma linhagem de *Aspergillus* spp.

Segundo Orlandelli et al. (2012), tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. Fungos filamentosos, leveduras e bactérias são os principais micro-organismos envolvidos em processos fermentativos na produção de enzimas devido à versatilidade genética e metabólica que eles podem apresentar (MENONCIN et al., 2009). Contudo, vale ressaltar que registros na literatura indicam que a utilização de fungos filamentosos em processos fermentativos para obtenção de enzimas são mais frequentes do que o uso de bactérias e leveduras para esta finalidade (GUIMARÃES, 2006).

O cultivo de micro-organismos sob fermentação em estado sólido (FES), que se caracteriza pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, na ausência ou baixo teor de água livre tem merecido a atenção de indústrias produtoras de enzimas (MURUGAN et al., 2011). Isto se deve às vantagens que este processo apresenta, quando comparado a outras tecnologias de fermentação: maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas à variações de temperatura e pH (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Dentre as várias enzimas produzidas por FES, podem ser citadas a celulase, amilase, lipase, protease e invertase.

Diante deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade técnica da produção das enzimas pectinase e CMCase (carboximetilcelulase) por uma linhagem de *Aspergillus* spp., sob cultivo em FES, utilizando a casca do café suplementada com manipueira como substrato e sugerindo portanto uma aplicação para estes resíduos e conseqüentemente, agregar valor econômico a eles. Diferentes concentrações do substrato e diferentes valores de pH e temperatura, foram testados para avaliar o efeito destas variáveis ambientais sobre a atividade das enzimas. O efeito do tempo de fermentação também foi avaliado em relação à atividade de CMCase e pectinase.

Materiais e Métodos

Linhagem de Aspergillus spp.

A linhagem fúngica foi isolada de amostras de manipueira fresca e identificada a nível de gênero (*Aspergillus* spp. LEMI 15), a partir da análise morfológica macroscópica das colônias e no estudo de estruturas reprodutivas da linhagem, utilizando microscopia óptica (SEIFERT et al., 2011). A reativação da linhagem foi realizada mediante o cultivo em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (PDA HIMEDIA, pH 5,02), por 48 horas.

Obtenção e preparo dos substratos

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 por 20 minutos a 121°C a fim de eliminar a microbiota nativa do material. A manipueira fresca também utilizada como meio de cultivo propriamente dito, foi obtida da linha de processamento de raízes de mandioca para a produção de farinha, em uma fábrica localizada no município Vitória da Conquista/BA. Imediatamente após a prensagem da massa da mandioca, a manipueira foi armazenada em tambores plásticos opacos, de 30 litros e transportada ao laboratório de Enzimologia e Microbiologia Industrial, da UFBA – Campus Anísio Teixeira.

Condições de cultivo

A fermentação em estado sólido foi estabelecida em frascos Erlenmeyers de 250 mL, nos quais foram adicionados casca de café e manipueira, a fim de se obter as proporções de 70 e 90% (casca de café:manipueira; m:v) em relação ao volume final (100 mL). Os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121 °C. A inoculação do isolado fúngico, foi realizada via deposição de dois *plugs* (pequenos discos de meio de cultura contendo micélio fúngico), segundo Sena et al. (2006).

As culturas foram mantidas em diferentes temperaturas (30 e 35°C) e valores de pH (5 e 6), por três dias. Alíquotas de cada tratamento foram coletadas, em intervalos de 12 horas, misturadas com 40 mL de água destilada, homogeneizadas, centrifugadas a 10.000 rpm, 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.

Determinação das atividades enzimáticas

Os extratos brutos foram submetidos às análises de atividades de pectinase e CMCase, utilizando o método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), de Miller (1959), conforme descrito por Siqueira et al. (2010).

Para avaliar as atividades enzimáticas, utilizou-se 50 µL da alíquota retirada de cada meio fermentativo, contendo o coquetel enzimático dos fungos, e 100 µL de substrato enzimático correspondente a cada enzima (solução de 1%), reagindo por 30 minutos, a 50°C, em banho maria. Após este período, foram adicionados 300 µL de solução de DNS, previamente preparada. A mistura foi levada à ebulição, em banho maria, por 10 minutos a 97°C. Ao fim, adicionou-se 1,5 mL de água destilada seguida de homogeneização. A atividade enzimática foi obtida a partir da leitura em espectrofotômetro, a 540 nm de absorbância.

A unidade das atividades enzimáticas (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto (açúcares redutores) por minuto por 1 mL da solução de reação. Utilizou-se como curva padrão os monômeros de glicose (pectina e CMCase).

Delineamento experimental

O experimento foi estabelecido em Delineamento Inteiramente Casualizado, disposto em arranjo fatorial com 2 níveis do fator pH (5,0 e 6,0), temperatura (30 e 35°C) e substrato (70 e 90% de casca de café em relação à manipueira) para a máxima produção de enzimas pelo isolado fúngico cultivado sob fermentação em estado sólido (Tabela 1).

Tabela 1. Modelo do delineamento experimental fatorial completo utilizado para as análises dos efeitos dos fatores pH, temperatura e concentração de substrato na atividade de CMCase e pectinase.

Tratamentos	pH	Temperatura (°C)	Relação casca de café : manipueira (%)
T1	5	30	90
T2	5	30	70
T3	5	35	90
T4	5	35	70
T5	6	30	90
T6	6	30	70
T7	6	35	90
T8	6	35	70

Análises estatísticas

Médias da atividade de cada enzima, ao final de 72 horas, e efeito do tempo de fermentação sobre as atividades das enzimas, independente dos tratamentos, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de regressão, avaliando a influência dos fatores individualmente e da interação entre eles. Diferenças significativas ($p < 0,1$) entre as médias foram determinadas pelo teste de Scott Knott, utilizando o software Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009).

Resultados e Discussão

Os resultados indicaram que o isolado fúngico *Aspergillus* spp. LEM15 apresentou habilidade metabólica para produzir CMCase e pectinase, independente dos tratamentos e tempos aplicados à fermentação em estado sólido (FES), contendo casca de café suplementada com manipueira como fontes de carbono (Tabela 2).

Tabela 2. Relação entre os tratamentos utilizados e a atividade de CMCase e pectinase nos diferentes tempos de fermentação.

Tratamentos (pH/temperatura/ substrato)	Atividade de CMCase			Atividade de pectinase		
	(U.mL ⁻¹)			(U.mL ⁻¹)		
	Tempo (horas)			Tempo (horas)		
	24	48	72	24	48	72
T1	2,6	0,71	1,25	3,47	0,64	0,14
T2	2,6	0,81	1,06	2,91	0,61	0,11
T3	2,3	0,78	1,31	2,20	0,55	0,13
T4	2,8	0,65	1,04	3,73	0,58	0,10
T5	2,6	0,66	1,42	3,93	0,55	0,17
T6	2,7	0,74	1,01	3,34	0,69	0,04
T7	3,0	0,65	1,23	3,60	0,60	0,15
T8	2,3	0,70	0,92	2,61	0,61	0,14

Atividades máximas das enzimas foram observadas nas primeiras 24 horas de fermentação (3,0 e 3,93 U.mL⁻¹ para CMCase e pectinase, respectivamente). Para CMCase, foram registradas médias de atividade de 0,71 e 1,15 U.mL⁻¹, às 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Enquanto que para pectinase, a média de atividade às 48 horas de fermentação foi de 0,6 U.mL⁻¹ e, em 72 horas, igual a 0,12 U.mL⁻¹. As maiores atividades das enzimas terem ocorrido no início do processo fermentativo (24 horas) aponta para uma rápida adaptação do isolado fúngico às condições de cultivo testadas neste trabalho. Rodríguez-Zúñiga et al. (2011), por exemplo, verificaram a necessidade de 72 horas de fermentação para o fungo *Aspergillus niger* atingirem maior atividade enzimática utilizando bagaço de cana como substrato.

As atividades máximas de CMCase e pectinase registradas neste trabalho superaram as reportadas em outros estudos que também utilizaram resíduos da agroindústria como substratos fermentativos: Khan et al. (2007) registraram atividade de endoglucanase de 0,7 U.mL⁻¹ por *Trichoderma* spp, utilizando de palha de arroz como substrato, com 8 dias de cultivo. Basso et al.

(2010) verificaram atividades de CMC_{case} de 0,2 e 0,4 U.mL⁻¹, aproximadamente, para duas linhagens de *Trichoderma reesei* cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar, ao longo de 15 dias. Silva et al. (2005), utilizando meio de farelo de trigo e bagaço de laranja na proporção 1:1, com *Penicillium viridicatum* RFC3, observaram atividade poligalacturonase de 2,5 U.mL⁻¹, aproximadamente, em 64 horas de fermentação. Alexandrino et al. (2010) ao empregarem resíduos de laranja como substrato para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*, sequer detectaram atividade pectinolítica nos filtrados das culturas.

Os fatores ambientais podem influenciar a produção de enzimas pelos micro-organismos, conforme verificado por Coral et al. (2002) e Souza et al. (2003). No entanto, nenhum efeito significativo ($p > 0,1$) dos tratamentos, bem como da interação entre eles, foi observado para a atividade de CMC_{case} e pectinase, no presente estudo. Algumas espécies microbianas, como o *Aspergillus* spp. LEMI15, apresentam estabilidade na produção de enzimas sob diferentes variações ambientais (FAWOLE e ODUNFA, 2003). Este resultado pode ser considerado interessante sob o ponto de vista industrial, uma vez que o controle de tais variáveis se torna menos rígido a fim de se obter produtos com características constantes e uniformes.

De acordo com Rodriguez-Zuniga et al. (2011), 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 limitante. No presente estudo, a linhagem *Aspergillus* spp. LEMI15 se mostrou bem adaptada às condições de fermentação, mesmo com a presença da manipueira ao substrato, cuja toxicidade é reconhecida devido à presença de um glicosídeo (linamarina) potencialmente hidrolisável à ácido cianídrico (NEVES et al., 2014). Isso, possivelmente, está relacionado à origem da linhagem fúngica, isolada da própria manipueira e por isso adaptada à constituição química do resíduo sendo capaz de utilizá-lo como fonte de carbono prontamente assimilável para seu crescimento e produção de enzimas.

A casca de café suplementada com manipueira se apresentou como um substrato viável para o crescimento da linhagem fúngica por ser fonte de nutrientes importantes para o crescimento microbiano e produção das enzimas de interesse (Tabelas 3 e 4). Isso confirma a potencialidade desses resíduos serem utilizados como substratos fermentativos tal como reportado por Oliveira et al. (2013) que empregaram manipueira como fonte de carbono para a produção de 2-fenil-etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Geotrichum fragrans* e García e Bianchi

(2015) que empregaram casca de café como substrato em fermentação em estado sólido para produção de compostos fenólicos totais por *Penicillium purpurogenum*.

Tabela 3. Composição química da manipueira.

Componentes	Concentração (mg.L⁻¹)
Cianeto livre	206,83 ^b ; 140,7 ^c ; 112,2 ^d
Nitrogênio	4900 ^a ; 2000 ^b ; 3000 ^c ; 1242 ^d
Carbono	37000 ^a ; 35000 ^b ; 35000 ^c ; 12330 ^d
Fósforo	160 ^a ; 250 ^b ; 300 ^c ; 325 ^d
Potássio	1863 ^a ; 2810 ^b ; 3800 ^c ; 1972 ^d
Cálcio	227 ^a ; 200 ^b ; 400 ^c ; 838 ^d
Enxofre	195 ^a ; 78 ^b ; 200 ^c ; 60 ^d
Magnésio	405 ^a ; 290 ^b ; 600 ^c ; 326 ^d
Ferro	15,3 ^a ; 7,0 ^b ; 6,4 ^c ; 12,4 ^d
Cobre	1,1 ^a ; 1,2 ^b ; 1,4 ^c ; 3,1 ^d
Zinco	4,0 ^a ; 3,0 ^b ; 5,0 ^c ; 32,5 ^d
Manganês	3,7 ^a ; 3,3 ^b ; 3,5 ^c ; 2,2 ^d

Fonte: ^aCereda (2001), ^bFernandes Júnior (1995), ^cBarana (1996), ^dBarana (2000)

Tabela 4. Composição química da casca de café.

Componentes	Concentração (%)
Proteína bruta	7,25 - 11,7 ^a ; 6,8 ^b ; 10,99 ^b
Celulose	14,7 - 42,0 ^a , 22,72 ^{cb}
Cálcio	0,03 - 0,5 ^a
Fósforo	0,03 - 0,16 ^a
Matéria mineral	6,5 - 7,8 ^a
Cafeína	0,48 - 1,31 ^a ; 1,2 ^c
Taninos	1,31 - 2,97 ^a ; 9,3 ^c
Lignina	9,3 - 13,56 ^a ; 12,38 ^b
Hemicelulose	4,3 - 15,37 ^a ; 14,69 ^b
Lipídeos	1,5 ^c
Açúcares totais	26,5 ^c

Adaptado de Andrade (2009). Fontes: ^aLeitão et al. (2005); ^bde Souza et al. (2001); ^cSoccol et al. (2002).

O tempo de fermentação foi avaliado como uma variável independente dos tratamentos (Figura 1). Tanto para pectinase quanto para CMCase foi verificada a redução significativa ($p < 0,1$) da atividade enzimática, após 72 horas de fermentação. A diminuição da atividade enzimática, ao longo da FES, foi também observado por Cruz et al. (2011) que atribuíram este fato a um possível esgotamento de nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática. Inforsato e Porto (2016) ressaltam que um decréscimo abrupto da atividade enzimática pode ocorrer devido ao aumento da concentração de açúcares provenientes da degradação da celulose acarretando na inibição total ou parcial de enzimas, até que o equilíbrio produto/substrato seja atingido. Esses mesmos autores citam como exemplo as enzimas do complexo celulolítico que sofrem inibição pelo produto são a 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase (CBH - EC 3.2.1.91), que hidrolisa terminais não redutores e oligossacarídeos em celobiose, a β -glicosídeo gluco-hidrolase (BG - EC 3.2.1.21) que promove a hidrólise de oligossacarídeos e celobiose em glicose.

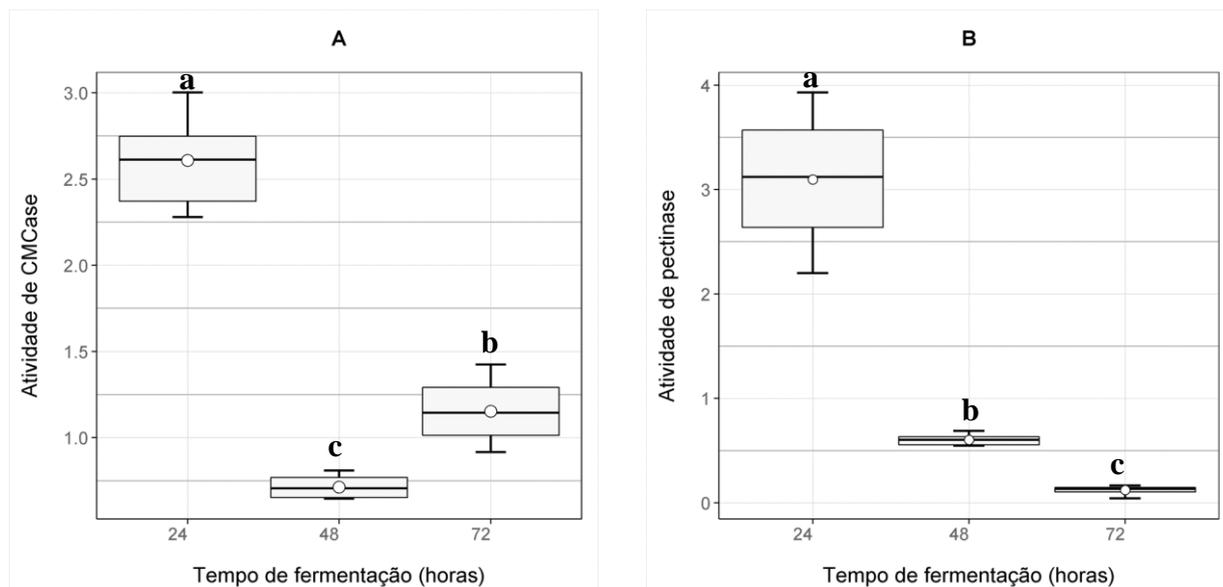


Figura 1. Efeito do tempo de fermentação em estado sólido contendo casca de café suplementada com manipueira sobre a atividade (U.mL^{-1}) de CMCase (A) e pectinase (B) por *Aspergillus* spp. LEMI15. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,1$).

De acordo com Rodriguez-Zuñiga et al. (2011), o tempo de 72 horas de fermentação em estado sólido para o cultivo de fungos é interessante, levando em consideração os fins comerciais quanto à produção de enzimas, em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos. Neste sentido, a linhagem de *Aspergillus* LEMI15 utilizada em nosso trabalho pode ser considerado um agente biológico promissor para a produção de CMCase e pectinase, cujas atividades médias foram, respectivamente, 2,6 e 3,09 UI.mL^{-1} , em apenas 24 horas de fermentação em casca de café suplementada com manipueira.

Conclusões

A linhagem fúngica *Aspergillus* spp. LEMI 15 isolada de amostras de manipueira fresca se mostrou hábil para a produção de CMCase e pectinase, sob as condições testadas neste estudo. Casca de café suplementada com manipueira consistiu em substrato interessante para compor o meio fermentativo a fim de se obter enzimas (CMCase e pectinase) produzidas pela linhagem fúngica. As variáveis ambientais avaliadas neste estudo (pH, temperatura e concentração de

substrato) não interferiram significativamente na atividade das enzimas. O tempo de fermentação foi a única variável avaliada que influenciou significativamente a atividade de ambas as enzimas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e à Universidade Federal da Bahia, pelo financiamento de estudos e projetos.

Referências

ALEXANDRINO, N.A.; de FARIA, H.G.; de SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Food Science and Technology**, v., p.27:364-368, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200026>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

ANDRADE, A.P.S. **Avaliação do potencial alelopático e efeitos fitoquímicos obtidos da casca de café (*Coffea arabica*)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

BARANA, A.C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

BARANA, A.C. **Estudo de carga de manipueira em fase metanogênica em reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n4/a34v28n4.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

BASSO, T.P.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.45, n.11, p.1282-1289, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100008>>. Acesso em: 07 mai. 2017.

CEREDA, M.P.; MATTOS, M.C.Y. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca: In: **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill (Brasil), v.4, 305p, 2001.

CORAL, G.; ARIKAN, B.; UNALDI, M.N.; GUVENMEZ, H. Some Properties of Crube Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. **Turkish Journal of Biology**,

v. 26, p. 209-213. 2002. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-02-26-4/biy-26-4-4-0111-5.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

CRUZ, E.A.; MELO M.C.; SANTANA N.B.; FRANCO M.; de SANTANA, R.S.M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z.S. Produção de alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.4, p. 245-249, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

FARIA, W.S.; PROTÁSIO, T.P.; TRUGILHO, P.F.; PEREIRA, B.L.C.; CARNEIRO, A.C.O.; ANDRADE, C.R.; GUIMARÃES JUNIOR, J.B. Transformação dos resíduos lignocelulósicos da cafeicultura em Pellets para geração de energia térmica. **Coffee Science**, v. 11, n. 1, p. 137 - 147, 2016. Disponível em: <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/1050/pdf_15>. Acesso em: 15 jun. 2017.

FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting pectinase of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00094-5)>. Acesso em: 29 jun. 2017.

FELIPE, F.I.; ALVES, L.R.A.; de CAMARGO, R.G.C. Panorama e perspectivas para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, p.134-146, 2010. Disponível em: <<http://energia.fca.unesp.br/index.php/rat/article/view/1114/1170>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

FERNANDES JÚNIOR, A. **Digestão anaeróbia de manipueira em separação de fases: Cinética da fase acidogênica**. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 1995.

FERREIRA, T.C.; ARAÚJO, N.C. Estudo agrônômico da espiga do milho (*Zea mays* L.) fertirrigado com manipueira. **Engenharia Ambiental**, v. 9, n.4, p. 152 – 163, 2012. Disponível em: <<http://ferramentas.unipinhal.edu.br/engenhariaambiental/viewarticle.php?id=799>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

GARCÍA, L.R.P.; BIANCHI, V.L.D. Efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 777-786, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n2p777>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

GONZAGA, A.D.; SOUZA, S.G.A.; PY-DANIEL, V.; RIBEIRO, J.D. Potencial de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no controle de pulgão preto de citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy, 1907). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 646-650, 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/112651/1/6698-27293-1-PB.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

GUIMARÃES, L.H.S. Screening at filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n.4, p.474 – 480, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400014>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

INFORSATO, F.J.; PORTO, A.L.M. Atividade enzimática de celulases pelo método dns de fungos Isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.5, n.4, p.444-465, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/rber/article/view/44339/pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

KHAN, M.H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulose enzyme. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.42, p.381-386, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934520601144691>>. Acesso em: 25 mai. 2017.

LEITÃO, R.A.; PAIVA, P.C.A.; REZENDE, C.A.P. Valor nutricional de casca de café (*Coffea arabica* L.) tratada com hidróxido de sódio e/ou úreia suplementada com feno de alfafa (*Medicago sativa* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, p. 31-36, 2005. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/2283>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

MACEDO, G.A.; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, n.4, p. 833-838, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000400016>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

MENDES, R.F.; MENDES, L.M.; GUIMARÃES JUNIOR, J.B.; MORI, F.A.; CÉSAR, A.A.S. Effect of the incorporation of coffee husks on the physic-mechanical properties of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake particleboards. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.3, p.610-617, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000300012>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p. 440-443, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200033>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426–428, 1959.

MURUGAN, S.; ARNOLD, D.; PONGIYA, U.D.; NARAYANAN, P.M. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC, 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4061/2011/696942>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

NEVES, O.S.C.; SOUZA, A.S.; COSTA, M.A.; SOUSA, L.A.; VIANA, A.E.S.; NEVES, V.B.F. Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.8, n.1, p. 1274-1284, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3895/S1981-36862014000100012>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n.2, p. 336 - 341, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

OLIVEIRA, L.C.A.; PEREIRA, E.; VALLONE, A.; SAPAG, K.; PEREIRA, M. Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: utilização de FeCl₃ como agente ativante. **Química Nova**, v. 31, n. 06, p. 1296-1300, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000600004>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

OLIVEIRA, S.M.M.; GOMES, S.D.; SENE, L.; COELHO, S.R.M.; BARANA, A.C.; CEREDA, M.P.; CHRIST, D. PIECHONTCOSKI, J. Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, p.158-163, 2013. Disponível em: <http://world-food.net/download/journals/2013-issue_2/2013-issue_2-food/f29.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2017.

ORLANDELLI, R.C.; ALBERTO, R.N.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n.10, p. 137-141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2012.21027>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

POTHIRAJ, C.; BALAJI, P.; EYINI, M. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1882-1885, 2006. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/55893>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 912-919, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800018>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n.1, p. 126- 131, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000100019>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

SEDIYAMA, M.A.N.; SANTOS, M.R.; VIDIGAL, S.M.; SANTOS, I.C.; SALGADO, L.T. Ocorrência de plantas daninhas no cultivo de beterraba com cobertura morta e adubação orgânica. **Planta Daninha**, v. 28, p.717-725, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000400003>>. Acesso em:18 jun. 2017.

SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. **The genera of hyphomycetes**. 9a ed. Utrecht: CBS Biodiversity Series 9, 2011. 997 p.

SENA, A.R.; KOBLITZ, M.G.B.; GOES NETO, A.; UETANABARO, A.P.T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 35, p. 91-

98, 2006. Disponível em: <http://www2.uefs.br/sitientibus/pdf/35/selecao_de_fungos_do_semi-arido_baiano.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2017.

SIQUEIRA, F.G.; SIQUEIRA, E.G.; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FERREIRA-FILHO, E.X. The Potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.002>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.S.; da SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v.40, p.2885-2889, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.008>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. **In: 7th World Congress on Computers in Agriculture**. Reno, Nevada, 2009. CD-Rom. p.1-5.

SILVA, J.J. da; SANTANA, T.T.; OLIVEIRA, A.C.C.; ALMEIDA, P.H. de; SOUZA, S.G. H. de; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B.; VALLE, J.S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.25110/arqvet.v15i2.2012.4234>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

SOCCOL, C.R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. **In: Pesquisa dos cafés do Brasil**. Brasília: Embrapa, p. 83-98, 2002. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/532/166699_Art03f.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 jun. 2017.

SOUZA, A.L. SOUZA, J.V.B.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G.; CECON, P.R.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. Composição químico-bromatológica da casca de café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 983-991, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982001000400011>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

SOUZA, J.V.B.; SILVA, E.S.; MAIA, M.L.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Paecilomyces clavissporus* 2A.UMIDA. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 455-458, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00092-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00092-X)>. Acesso em: 18 jun. 2017.

STROPARO, E.C.; BEITEL, S.M.; RESENDE, J.T.V.; 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.

SUMAN, P.A; URBANO, L.H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca

(manipueira). **Acta Scientiarum Technology**, v.33, n.4, p. 379 – 384, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i4.9279>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2004v25n4p315>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

TEIXEIRA, I.A.L.; GUSMÃO, R.O.; FERRAZ, L.M.; OLIVEIRA, A.P.C.; ASSIS, F.G.V.; LEAL, P.L. Isolamento e seleção de bactérias oriundas da manipueira produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa. **Revista brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 11, n. 1: p. 2227-2244, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3895/rbta.v11n1.2847>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

VIEITES, R.L. Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.8, p. 45-47, 1998. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4958/7092>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M.P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. Ciências exatas e da terra, agrárias e engenharias, v. 8, n. 01, 2002. Disponível em: <http://ri.uepg.br:8080/riuepg/bitstream/handle/123456789/595/ARTIGO_Valoriza%C3%A7%C3%A3oRes%C3%ADduosProcessamento.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 jun. 2017.