

# Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus sp.* Através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea L.*)

## *Evaluation of CMCCase Activity and FPase of Rhizopus sp. Stipe Through the Bioconversion of Red Mombin Residue (Spondias Purpurea)*

Tamires Carvalho dos Santos<sup>a</sup>; Graziella Marques Amorim<sup>b</sup>; Renata Cristina Ferreira Bonomo<sup>b</sup>; Marcelo Franco<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Engenharia Ambiental, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BA, Brasil

<sup>b</sup>Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BA, Brasil

\*E-mail: marcelofranco@pq.cnpq.br

Recebido: 07 de fevereiro de 2011; Aceito: 20 de maio de 2011.

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi quantificar a atividade enzimática das enzimas celulíticas (CMCase e FPase) produzidas por meio da fermentação em estado sólido, utilizando a espécie fúngica *Rhizopus sp.* e o resíduo proveniente do beneficiamento da seriguela como substrato. As condições tempo de fermentação e atividade de água foram determinadas em função da resposta da atividade enzimática de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e atividade de água (0,943, 0,970, 0,985), em função da atividade enzimática. As fermentações foram realizadas a 35 °C em estufa bacteriológica. Os resultados demonstram que a maior produção para a CMCCase foi de 11,06 U/g em 72 horas de fermentação, enquanto que para a FPase a atividade máxima ocorreu em 96 horas de fermentação com uma produção enzimática de 25,15 U/g, ambas as enzimas apresentaram maior atividade em 0,971 de atividade de água. O fungo sintetizou ambas as enzimas sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose presente no resíduo e água em diferentes concentrações.

**Palavras-chave:** Fungos. Desenvolvimento Sustentável. Fermentação.

### Abstract

The objective of this study was to quantify the enzymatic activity of cellulitic enzymes (CMCase and FPase), produced way of the fermentation in solid state, using the fúngica species *Rhizopus sp.* e the residue proceeding from the improvement of seriguela as substratum. The conditions time of fermentation and activity of water had been determined in function of the reply enzymatic activity of fermentation (24, 48, 72, 96 and 120 hours) and activity of water (0,943, 0,970, 0,985), in function of the enzymatic activity. The the 35 fermentations had been carried through oC in bacteriological greenhouse. The results demonstrate that the biggest production for the CMCCase was of 11,06 U/g in 72 hours of fermentation, whereas for the FPase the maximum activity occurred in 96 hours of fermentation with an enzymatic production of 25,15 U/g, both the enzymes had presented greater activity in 0,971 of activity of water. Fungo syntheicized both the enzymes without the necessity of any inductor or suppliment beyond the present cellulose in the residue and water in different concentrations.

**Keywords:** Fungi. Sustainable Development. Fermentation.

### 1 Introdução

A fruticultura brasileira tem se mostrado como o mais dinâmico setor da economia, cresce ano a ano, supera barreiras fitossanitárias e cambiais e consolida-se como grande vetor de desenvolvimento do país. Nos últimos anos, aumentou sua área em níveis inéditos na história, ampliando suas fronteiras em direção à região Nordeste, em que condições de luminosidade, umidade relativa e temperatura são muito mais favoráveis do que nas regiões Sul e Sudeste onde até então eram desenvolvidas<sup>1</sup>. Estima-se que deste processamento, aproximadamente 40% são considerados resíduos agroindustriais compostos de restos de polpa, casca, caroços ou sementes.

Observa-se que o Nordeste tem papel relevante no desempenho da fruticultura do Brasil. Ao mesmo tempo, a fruticultura é uma atividade intensa que contribui muito para a economia da região. As frutas tropicais são principalmente produzidas nas áreas semiáridas, abrindo

possibilidades de desenvolvimento para estas economias historicamente fragilizadas.

A relevância do estímulo a esse setor produtivo é a possibilidade de absorção de mão-de-obra e geração de emprego e renda nessas regiões<sup>2</sup>. Há crescente demanda por produtos originados de frutas exóticas, com destaque ao gênero *Spondias*, pertencente à família das *Anacardiáceas*, dentre estas a seriguela (*Spondias purpurea L.*). Seus frutos são drupas elipsóides de coloração amarelo ou avermelhada e possuem polpa de pequena espessura ao redor de um grande caroço. São consumidos *in natura* ou como sucos, refrescos, licores, entre outros<sup>3</sup>. A fruta madura apresenta aproximadamente 7% de açúcares redutores, 1% de amido, 70% de rendimento médio de polpa, 21° Brix, 0,7% de acidez titulável (expressa em ácido cítrico), com índice de maturação (SST/ATT) de 34 e pH 3,5<sup>4</sup>.

Após o despolpamento para fins industriais ocorre a geração do resíduo que pode acarretar problemas ambientais.

Infelizmente, a maior parte desses resíduos agroindustriais é disposta diretamente ao ambiente<sup>5</sup>. Os resíduos compostos por materiais lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e esta biomassa apresenta potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, compostos de aroma, entre outros<sup>7,8</sup>. Esses resíduos são fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como substrato podem minimizar a dependência do homem por combustíveis fósseis através da energia renovável na forma de glicose<sup>6</sup>. A produção global anual de biomassa vegetal é de aproximadamente 2 x 10<sup>11</sup> toneladas, sendo que a lignocelulose responde por 90% deste valor<sup>9</sup>.

Normalmente a composição dos materiais lignocelulósicos pode variar de acordo com a espécie vegetal, porém a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Os dois primeiros são carboidratos resultantes da polimerização de açúcares, enquanto a lignina é um polímero aromático produzido a partir de precursores fenólicos, não contendo açúcares. Visto que a celulose responde por cerca de metade da composição e que a degradação deste homopolímero libera glicose a ser prontamente fermentada, torna-se então este substrato alvo de intensas pesquisas<sup>10</sup>.

A fermentação em estado sólido (FES) demonstra-se um processo vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat destes microorganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem estabilidade maior a variações de temperatura e pH<sup>11</sup>.

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. Esse complexo é dividido em três grupos: Endoglucanases (EC 3.2.1.4): enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico, as quais hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor; Exoglucanases: enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs (EC 3.2.1.91), embora raras, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já as CBHs (EC 3.2.1.91) são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar

as regiões cristalinas mais expostas às celulases;  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose<sup>12</sup>.

Atualmente a atenção dos investidores em bioenergia volta-se para a etapa de hidrólise enzimática dos polissacarídeos. Esta fase é decisiva tanto para o custo quanto para a eficiência do processo de bioconversão. O emprego de enzimas específicas para degradação de biomassa vegetal é muito mais interessante que a hidrólise ácida diante do alto custo e risco ao ambiente apresentado por este último<sup>13</sup>. As celulases podem ser utilizadas em indústrias: de alimentos; têxtil; de papel e celulose; e no tratamento de resíduos, entre outras<sup>14-17</sup>.

O trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o efeito do tempo de fermentação e da atividade de água sobre a cinética de produção de celulases através da fermentação em estado sólido (FES) do resíduo de seriguela.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Materiais

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Rhizopus* sp. proveniente do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA da UESB campus de Itapetinga. O resíduo foi cedido por uma agroindústria de beneficiamento de polpa de frutas localizada na região sudoeste da Bahia, seco em estufa de secagem e esterilização SOLAB a 70 °C por 24 horas, triturado em moinho tipo Wiley na granulométrica aproximada de 1,2 mm (20 mesh).

### 2.2 Obtenção da solução de esporos

A cultura esporulada (em PDA HIMEDIA acidificado) foi suspensa em solução de Tween 80 VETEC a 0,01% e submetida contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular BIOVAL L1000.

### 2.3 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers contendo 10 g de resíduo, adicionando uma suspensão contendo 107 de esporos por grama de substrato. Foram adicionados volumes de água estéril até os seguintes valores de atividade de água 0,943, 0,970 e 0,985, determinada em aqualab BASEQ, representando 40, 50 e 60% de umidade, respectivamente. Os cultivos foram conduzidos a 35 °C em estufa bacteriológica modelo SL 101 SOLAB.

### 2.4 Extração dos compostos enzimáticos

Após o processo fermentativo realizou-se a extração mecânica do extrato enzimático com solução tampão de citrato de sódio VETEC com o pH 4,8 a 50 mM. O extrato enzimático proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga CETRIBIO modelo 80-2B.

## 2.5 Análises das atividades enzimáticas

### 2.5.1 Enzima CMCase

Para a atividade de CMCase, que representa a dosagem de endoglucanases, foi realizado com a dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) CROMOLINE a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio VETEC com o pH 4,8 a 50 mM. Os ensaios reacionais foram conduzidos adicionando em tubo de ensaio 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de CMC. Em outro tubo foram adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático comparado ao controle reação. O branco continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de solução tampão. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica QUIMIS a 50 °C por 10 minutos, e a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL DNS. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância em de 540 nm realizada em espectrofotômetro BEL PHOTONICS 2000 UV.

### 2.5.2 Enzima FPase

A atividade FPase, ou seja, atividade de papel de filtro, abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. No tubo contendo o ensaio reacional foi adicionado 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No outro tubo o controle da reação foi efetuado adicionando 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, no terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao controle.

As amostras foram incubadas em estufa a 50 °C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL DNS. Os tubos foram alocados em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorbância em de 540 nm.

### 2.5.3 Curva de calibração

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS<sup>18</sup>. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U por grama de substrato (U/g). A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

## 2.6 Análises estatísticas

A análise da produção de enzimas foi realizada verificando o tempo de fermentação e a atividade de água. Para determinar o efeito dessas variáveis sobre a produção de enzimas, o experimento foi conduzido em três níveis de atividade de água

(0,943, 0,970 e 0,985) variando com o tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e elaborou-se um delineamento inteiramente casual (DCL), com três repetições amostrais. Os dados foram ajustados a um modelo quadrático completo (todos os efeitos linear e quadrático principal e todas as interações de duas vias), através da Equação 1, utilizando o software SAEG estatística. A significância estatística de todos os fatores foi então avaliada por uma análise de variância (ANOVA), usando um teste estatístico de Fisher.

$$K = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_i X_i^2 + \sum \beta_j X_i X_j \quad (1)$$

Representam o efeito constante no processo  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_i^2$ ,  $\beta_{ij}$ , o efeito linear e quadrático de  $X_i$  e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$  na produção das enzimas.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F).

## 3 Resultados e Discussão

Durante o processo de fermentação em estado sólido ocorre a sacarificação, esse processo consiste na conversão enzimática de polissacarídeos em açúcares fermentáveis. A celulose é hidrolisada inicialmente pelas endoglucanases, essas enzimas ao decomporem os polissacarídeos, de forma aleatória, produzem terminais para as exoglucanases atuarem<sup>19</sup>. Na tabela 1 são apresentados os valores obtidos durante o experimento.

**Tabela 1:** Atividades das enzimas CMCase (endoglucanase) e FPase (complexo endoglucanase e exoglucanase) em cinco tempos e três atividades de água, médias das três repetições amostrais

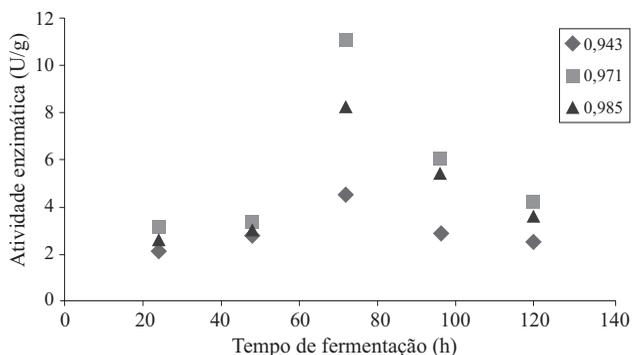
Tempo (h)	CMCase (U/g)			FPase (U/g)		
	0,943 (aw)	0,971 (aw)	0,985 (aw)	0,943 (aw)	0,971 (aw)	0,985 (aw)
24	2,132	3,164	2,625	6,080	10,926	10,567
48	2,783	3,366	3,052	7,000	11,733	10,993
72	4,510	11,060	8,234	8,211	16,467	13,416
96	2,895	6,058	5,452	8,952	25,754	20,886
120	2,468	4,241	3,635	7,000	20,146	18,373

Na tabela 2 encontram-se os resultados dos modelos reduzidos para cada atividade de água, bem como os coeficientes de variação para cada equação. Os dados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos (F > valor crítico, valor P < 0,05).

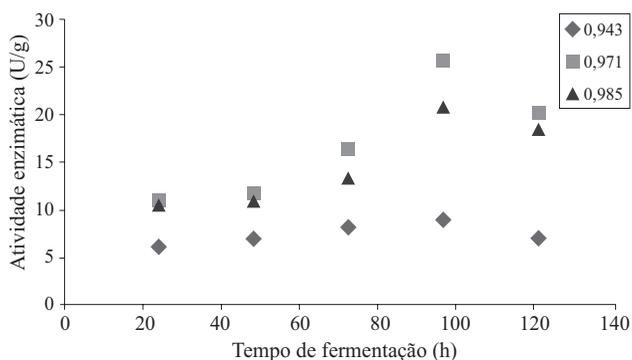
**Tabela 2:** Modelos de ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA

Atividade de água	Equação	R <sup>2</sup>	Coefficiente de Variação
<b>CMCase</b>			
0,943	$-0,0007x^2 + 0,1014x - 0,0261$	0,7195	13,054
0,971	$-3.10^{-5}x^3 + 0,0035x^2 - 0,0339x + 1,7865$	0,7056	2,264
0,985	$-2.10^{-5}x^3 + 0,0034x^2 - 0,0699x + 2,3563$	0,8536	32,252
<b>FPase</b>			
0,943	$-0,0008x^2 + 0,1268x + 3,2042$	0,8215	2,375
0,971	$-0,0001x^3 + 0,0235x^2 - 1,2592x + 29,478$	0,9628	1,384
0,985	$-7.10^{-5}x^3 + 0,0155x^2 - 0,8605x + 23,551$	0,9447	2,514

Nas figuras 1 e 2 estão representados os pontos médios de cada experimento realizado e o arranjo experimental para as enzimas CMCase e FPase respectivamente, em função da atividade enzimática (U/g), atividade de água (aw) e tempo de fermentação (h).



**Figura 1:** Atividade de CMCase (endoglucanase) em função do tempo e variação da atividade de água



**Figura 2:** Atividade de Fpase(complexo enzimático endoglucanase e exoglucanase) em função do tempo e variação da atividade de água

De acordo com a literatura o intervalo de atividade de água em que ocorre o desenvolvimento microbiano varia 0,60

- 0,99 em geral, e o valor ideal para o crescimento fúngico situa-se entre 0,90 e 0,9920. No presente estudo foi observado que abaixo da atividade de água de 0,95 e acima de 0,98, houve diminuição na produção das enzimas. Fato que pode estar relacionado com a inibição do fungo, marcado pela extrapolação do nível de água ideal para o desenvolvimento da linhagem selecionada, o que poderia estar influenciando no metabolismo responsável pela produção da enzima. A umidade é fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de umidade adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor<sup>20,21</sup>.

Durante o processo fermentativo as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular. As endoglucanases clivam as ligações β-(1-4)-glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas. As exoglucanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia. Esse comportamento pode explicar os valores otimizados em relação à variação de tempo, para a CMCase (endoglucanases) o tempo ótimo foi 72 horas de fermentação com a atividade de 11,060 U/g, já para FPase (endoglucanases e exoglucanases) o tempo otimizado foi de 96 horas de fermentação para uma atividade enzimática de 25,754 U/g.

O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além do resíduo de seriguela e água em diferentes concentrações, demonstrando que é uma enzima constitutiva.

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, por equações matemáticas, os balanços de massa, associados às transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam.

#### 4 Conclusão

Os resultados indicam que a estirpe de *Rhizopus* sp. é bastante promissora, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulósicas, a análise obtida indica que para a CMCase o tempo ótimo foi de 72 horas de fermentação com estimativa de produção de 11,06 U/g para a CMCase, já para FPase indica que a otimização do bioprocessamento encontra-se entre 96 horas de fermentação para uma produção enzimática de 25,15 U/g. Em ambas as enzimas estudadas a atividade de água 0,971 foi a que obteve melhor produção das espécies enzimáticas. A FES é uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a reutilização dos resíduos gerados, diminuindo passivos ambientais bem como a valorização econômica desses rejeitos.

O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose contida no resíduo de seriguela e água em diferentes concentrações.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro.

### Referências

1. Agriannual 2008. Anuário da Agricultura Brasileira. Brasília: FNP; 2008.
2. Quintino HMS. Benefícios sociais da política de incentivos à cultura do mamão no Estado do Ceará. Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Economia Rural] - Universidade Federal do Ceará; 2007.
3. Filgueiras HAC, Alves RE, Moura CFH, Oliveira ACO, Araújo NCC. Calidad de frutas nativas de latinoamerica para indústria: ciruela mexicana (*Spondias purpúrea* L.). Proc Int Soc Trop Horticulture 2001;43(1):68-77.
4. Lynd LR, Zhang YH. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. Biotechnol Bioeng 2002;77(1):467-75.
5. Ojumu TV, Solomon BO, Betiku E, Layokun SK, Amigun B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. Afr J Biotechnol 2003;2(6):150-2.
6. Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol 2008;35(5):377-91.
7. Soccol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresour Technol 2010;101(10):4820-5.
8. Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. Bioresour Technol 2007;98(1):504-10.
9. Leathers TD. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. FEMS Yeast Res 2003;3(2):133-40.
10. Vásquez MP, Silva JNC, Souza Junior MB, Pereira Junior N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. Appl Biochem Biotechnol 2007;12(1):137-40.
11. Lynd LR, Weimer PJ, Zylwh V, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Molec Biol Rev 2002;66(1):506-77.
12. Zhang P, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnol Adv 2006;24:452-81.
13. Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Rev Bras Bot 2004;27(2):205-11.
14. Laufenberg G, Kunz B, Nystrom M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. Bioresour Technol 2003;87(2):167-98.
15. Pelizer LH, Pontieri MH, Moraes IO. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. J Technol Manag Innov 2007;2(1):118-27.
16. Hahn-Haagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund Mf, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol 2006;24(12):549-55.
17. Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 2006;69(6):627-42.
18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31(1):426-8.
19. Balat M, Balat H. Progress in bioethanol processing. Progress Energy Combustion Sci 2008;34(1):551-73.
20. Gervais P, Molin P. The role of water in solid-state fermentation. Bioch Eng J 2003;13(1):85-91.
21. Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol Adv 2009;27(2):185-94.

