



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO



ROSÂNGELA MORAES GONÇALVES

**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE LINHAGEM FÚNGICA
TERMÓFILA ISOLADA DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE**

DOURADOS, MS

AGOSTO/2017

ROSÂNGELA MORAES GONÇALVES

**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE LINHAGEM FÚNGICA
TERMÓFILA ISOLADA DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE**

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Trabalho de conclusão de curso
apresentado no curso de graduação
de Ciências Biológicas na
Universidade Federal da Grande
Dourados.

DOURADOS, MS

AGOSTO/2017

G635p Goncalves, Rosangela Moraes

Produção de celulases e hemicelulases por cultivo em estado sólido de linhagem fúngica termófila isolada do cerrado sul-mato-grossense / Rosangela Moraes Goncalves -- Dourados: UFGD, 2017.

17f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite

TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Produção enzimática. 2. resíduos agroindustriais. 3. fungo termofílico. I. Título.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela saúde e por ter me guiado na trajetória acadêmica e me ajudado a concluir;

Aos meus pais por todo apoio, me incentivando a nunca desistir, mas sempre persistir, e não mediram esforços para que meu sonho se realizasse, pois acreditaram no meu potencial;

Ao Professor Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pela valiosa orientação na realização desse trabalho, pela paciência e bondade, transmitindo seus conhecimentos com maior encargo e alegria;

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realizar meu curso de graduação e as demais atividades de pesquisa, ensino e extensão;

Aos professores e técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, em especial aqueles que sempre tiveram presentes na minha formação acadêmica;

A todos os colegas do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, por terem me recebido por todo esse tempo com carinho e amizade, sempre ajudando no que precisava;

Em especial, meus agradecimentos a Nayara, por ter dedicado um pouco do seu tempo, carinho e paciência na realização desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. METODOLOGIA	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÃO	16
5. REFERÊNCIAS	17

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Produção de celulases e hemicelulases em diferentes substratos por CES pelo isolado 23, 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 40°C.

Figura 1: Produção de celulases e hemicelulases em função do tempo de cultivo do isolado 23 em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 40°C. **A) CMCase; B) β -glicosidase; C) Xilanase; D) β -xilosidases.**

RESUMO

Os processos de cultivo microbiológico têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento biotecnológico, mostrando características operacionais e econômicas na utilização de enzimas, como na redução de custos em escala industrial. As dificuldades em decompor a biomassa celulósica em glicose, podendo ser convertida em produtos de valor agregado, tem tornado as celulases e hemicelulases um dos sistemas enzimáticos mais estudados atualmente. Assim, o uso de substratos alternativos, como resíduos agroindustriais, é de grande importância para redução dos custos de produção dessas enzimas. Em países como o Brasil, os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para produção de enzimas microbianas, devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis, dessa forma, esses podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo para processos de cultivo em estado sólido (CES) que merecem destaque no aproveitamento desses subprodutos, além de ser benéfico ao meio ambiente. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas utilizando diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido de uma linhagem fúngica termófila (isolado 23), isolado do Cerrado sul-mato-grossense. A produção das enzimas foi obtida pelo cultivo do microrganismo em farelo de trigo contendo 70% de umidade, a temperatura de 40°C, onde a maior produção de celulases (CMCase e β -glicosidase) foi de 30,9 U/g a 72 horas de cultivo e 229,7 U/g em 120 horas, e hemicelulases (xilanase e β -xilosidase) foi de 179,5 U/g a 48 horas de cultivo e 12,6 U/g em 96 horas. Os resultados permitem concluir que o microrganismo isolado possui potencial para sua aplicação industrial, principalmente por apresentar características relevantes para produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em meios de cultivo de baixo valor agregado.

Palavras-chave: Produção enzimática; resíduos agroindustriais; fungo termofílico.

ABSTRACT

The microbiological cultivation processes have conquered a prominent place in biotechnological development, showing operational and economic characteristics in the use of enzymes, as in the reduction of costs on an industrial scale. The difficulties in decompose cellulosic biomass in glucose can be converted into value-added products, has become the cellulases and hemicellulases one of the most studied enzyme systems currently. Thus, the use of alternative substrates, such as agroindustrial residues, is of great importance for reducing the cost of production of these enzymes. In countries as Brazil, the agroindustrial residues represent an important alternative source for production of microbial enzymes, due to the large amount of nutrients available, so these can be used as low-cost raw materials for solid state cultivation processes (CES) that deserve to be highlighted in the use of these by-products, besides being beneficial to the environment. Thus, the objective of this work was to evaluate the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes using different agroindustrial substrates by solid state cultivation of a thermophilic fungal lineage (isolate 23), isolated from the Cerrado south-mato-grossense. The production of the enzymes was obtained by cultivation of the micro-organism in wheat bran containing 70% humidity, at the temperature of 40° C, where the biggest production of cellulases (CMCase and β -glucosidase) was 30,9 U/g to 72 hours of culture and 229,7 U/g in 120 hours, and hemicellulases (xylanase and β -xylosidase) was 179,5 U/g to 48 hours of culture and 12,6 U/g in 96 hours. The results allow concluding that the micro-organism isolated has potential for its industrial application, mainly for presenting characteristics relevant to the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes in low added value culture media.

Keywords: Enzyme production; agroindustrial residues; thermophilic fungal.

1. INTRODUÇÃO

A escassez de combustíveis fósseis somados aos problemas ambientais resultantes da sua transformação e de seu consumo tem estimulado a busca de fontes alternativas de biocombustíveis renováveis. Dessa maneira, o interesse no uso de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas para converter biomassa vegetal em açúcares fermentáveis aumenta a cada dia (GARCIA et al., 2015; SINGHANIA et al., 2010).

As celulasas são enzimas que constituem um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos promovendo a sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalizadores altamente específicos que atuam em sinergia para liberação de açúcares fermentescíveis. A glicose liberada apresenta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol. A hidrólise enzimática de celulose em glicose envolve a ação sinérgica de três enzimas: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose e as β -glicosidases, que hidrolisam celobiose solúveis em glicose (CASTRO and PEREIRA JR., 2010).

A hemicelulose é degradada mais facilmente que a celulose (SHALLOM; SHOHAM, 2003). E de acordo com a sua cadeia principal de açúcar (xilose) presente na sua estrutura, as hemiceluloses é denominada de xilana. A degradação de hemicelulasas em açúcares fermentescíveis é fundamental para a obtenção de elevada eficiência no processo de conversão de biomassa em combustível renovável (BHAT, HAZLEWOOD, 2001). Hemicelulasas são enzimas que hidrolisam a hemicelulose e se classificam em: endoxilanases, que clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana; os xilooligômeros e xilobiose, são hidrolisados por β -xilosidases, que liberam a xilose pela extremidade não redutora (ALVES-PRADO et al., 2010).

As dificuldades em decompor a biomassa celulósica em glicose, podendo ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulasas e hemicelulasas um dos sistemas enzimáticos mais estudados atualmente. Essas enzimas apresentam aplicabilidade na obtenção de etanol de segunda geração, estonagem e polimento de tecidos, formulações de detergentes domésticos e industriais, processamento de alimentos e bebidas e produção de ração de animal (STROPARO et al., 2012).

A obtenção de enzimas industriais de forma sustentável e economicamente viável exige a busca de meios de cultivo de baixo custo. A produção industrial das enzimas necessita de conhecimento e controle dos parâmetros envolvidos no

crescimento do microrganismo e de sua produção enzimática. A redução dos custos da produção por meio da otimização é o objetivo básico para aplicação industrial de uma enzima (SCHEUFELE et al., 2012).

A produção industrial de enzimas é geralmente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas estejam relacionados ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Assim, o uso de substratos alternativos é de grande importância para a redução dos custos de produção (BERNARDES, 2014; JOO; CHANG, 2005).

Em países que exercem grande atividade agrícola, como o Brasil, são gerados enormes volumes de resíduos que são acumulados no meio ambiente. Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para produção de enzimas microbianas (SIQUEIRA et al., 2010). Devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais, estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo para processos secundários. Neste contexto, o cultivo em estado sólido (CES) exerce papel de destaque no aproveitamento desses resíduos, pois visa a síntese de diversos compostos de valor agregado e de interesse industrial, além de ser benéfico ao meio ambiente. (DANTAS, AQUINO, 2010; BASSO et al., 2010).

Dentre as espécies microbianas, os fungos filamentosos são mais adaptados para produção de enzimas por cultivo em estado sólido (CES), os quais tem recebido atenção nas pesquisas, por crescerem em baixos níveis de água livre (PARIS, 2008; RODRIGUEZ et al., 2006).

As vantagens do CES incluem ainda a simplicidade das condições de crescimento do microrganismo, pois são semelhantes as condições ambientais onde os fungos filamentosos se desenvolvem. O método também resulta em maiores níveis de produtividade e baixa repressão catabólica, aumentando a estabilidade das enzimas secretadas (GARCIA et al., 2015; PANDEY, 2003).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas utilizando diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido, por uma linhagem fúngica termófila denominada isolado 23, isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

Foi utilizado o fungo filamentosso termófilo previamente denominado Isolado 23, isolado de amostras de solo do cerrado. O microrganismo foi cultivado a 40°C e mantido em *Ágar Sabouraud Dextrose* a 4°C, pela a equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER/UFGD).

2.2. Obtenção do inóculo

O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose*. Para o crescimento o fungo foi incubado por 48 h a 40°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente, composta por 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônio (m/v). A inoculação do microrganismo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL dessa suspensão (GARCIA et al., 2015).

2.3. Cultivo em estado sólido

As enzimas foram produzidas pelo cultivo do fungo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho e farelo de soja), a umidade foi ajustada para 70% com solução nutriente (descrito no item anterior). Todo o material foi previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e os experimentos foram realizados em duplicatas. O melhor substrato foi selecionado para variação do tempo de cultivo, visando a produção das enzimas (GARCIA et al., 2015).

2.4. Extração da enzima

A extração das enzimas foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm por 1 hora. As amostras foram filtradas e centrifugadas a 1.500 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático e utilizado nas etapas seguintes (LEITE et al., 2007).

2.5. Determinação da atividade de celulases e hemicelulases

As atividades de CMCase e xilanase foram determinadas pela adição de 100 μL de extrato de enzima, 900 μL de 0,1 M tampão de acetato de sódio (pH 4,5) contendo Carboximetilcelulose 3% (C5678 Sigma) e xilana 0,5% (Beechwood Sigma) respectivamente. Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). As atividades de β -glicosidase e β -xilosidase foram determinadas com 50 μL de extrato enzimático, 250 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e 250 μL de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP β G, Sigma) para β -glicosidase e p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (pNP β X Sigma) para β -xilosidase, reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M e o p-nitrofenol liberado quantificado por espectrofotometria a 410 nm (LEITE et al., 2007). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de produto por minuto de reação.

2.6. Análise estatística

Todas as experiências foram realizadas como duplicatas e os resultados são apresentados como a média de dois testes independentes. A análise estatística dos dados incluiu uma ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção de substratos para produção de celulases e hemicelulases

Nesse trabalho foi avaliado seis substratos que são produzidos em abundância no Brasil, visando a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo isolado 23, por cultivo em estado sólido, em 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 40°C.

A maior produção das enzimas foi obtida com o substrato farelo de trigo, onde a maior produção de CMCase e β -glicosidase foi de 14,2 e 178,7U/g respectivamente, e de Xilanase e β -xilosidase foram de 143,5 e 10,1U/g, respectivamente (Tabela 1).

O farelo de trigo apresenta equilíbrio entre a fonte de carbono e nitrogênio, e é rico em proteínas, minerais, gordura e vitamina B, que são facilmente assimilados pelo

microrganismo, com isso, favorece no crescimento e produção de enzimas (LEITE et al., 2008).

Tabela 1: Produção de celulasas e hemicelulasas em diferentes substratos por CES pelo isolado 23, 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 40°C.

Substratos	CMCase (U/g substrato)	β -glicosidase (U/g substrato)	Xilanase (U/g substrato)	β -xilosidase (U/g substrato)
Farelo de trigo	14,2±0,5 ^a	178,7±4,0 ^a	143,5±2,1 ^a	10,1±0,1 ^a
Farelo de soja	8,9±0,2 ^b	40,6±0,9 ^b	9,2±0,0 ^b	1,3±0,0 ^c
Palha de milho	3,8±0,2 ^e	1,6±0,0 ^d	3±0,1 ^d	0,4±0,0 ^d
Casca de arroz	2,3±0,1 ^f	0,3±0,0 ^e	1,4±0,0 ^e	0,2±0,0 ^d
Bagaço de cana	5,7±0,2 ^d	3,9±0,0 ^c	6,8±0,2 ^c	0,6±0,0 ^d
Sabugo de milho	6,6±0,0 ^c	1,1±0,0 ^d	9,9±0,1 ^b	2,6±0,0 ^b

Diversos trabalhos relatam o farelo de trigo como sendo um bom substrato para produção de celulasas e hemicelulasas (GONÇALVES et al., 2013; ALVES-PRADO et al., 2010; LEITE et al., 2008; SUKUMARAM et al., 2009).

O farelo de trigo possui maior quantidade de macro e micronutrientes do que os demais substratos analisados, que induziram fracamente a produção das enzimas comparadas ao farelo de trigo. A produção de enzimas microbianas é diretamente dependente da natureza do substrato, pois serve como suporte sólido e fonte de nutrientes, ou seja, o substrato ideal é aquele que fornece tanto a fonte de carbono e energia como a fonte de nitrogênio para o microrganismo (PANDEY et al., 2003). Assim, o farelo de trigo foi selecionado para a produção das enzimas na avaliação do tempo de cultivo.

3.2. Produção de celulasas e hemicelulasas em função do tempo de cultivo

A maior produção de CMCase foi cerca de 30,9±0,5 U/g (3,09±0,05 U/mL) em 72 horas de cultivo (em termos absolutos) e a β -glicosidase foi de 229,7±10,5 U/g (22,97±1,05 U/mL) em 120 horas. Após esse período a atividade enzimática caiu consideravelmente (Figura 1: **A e B**).

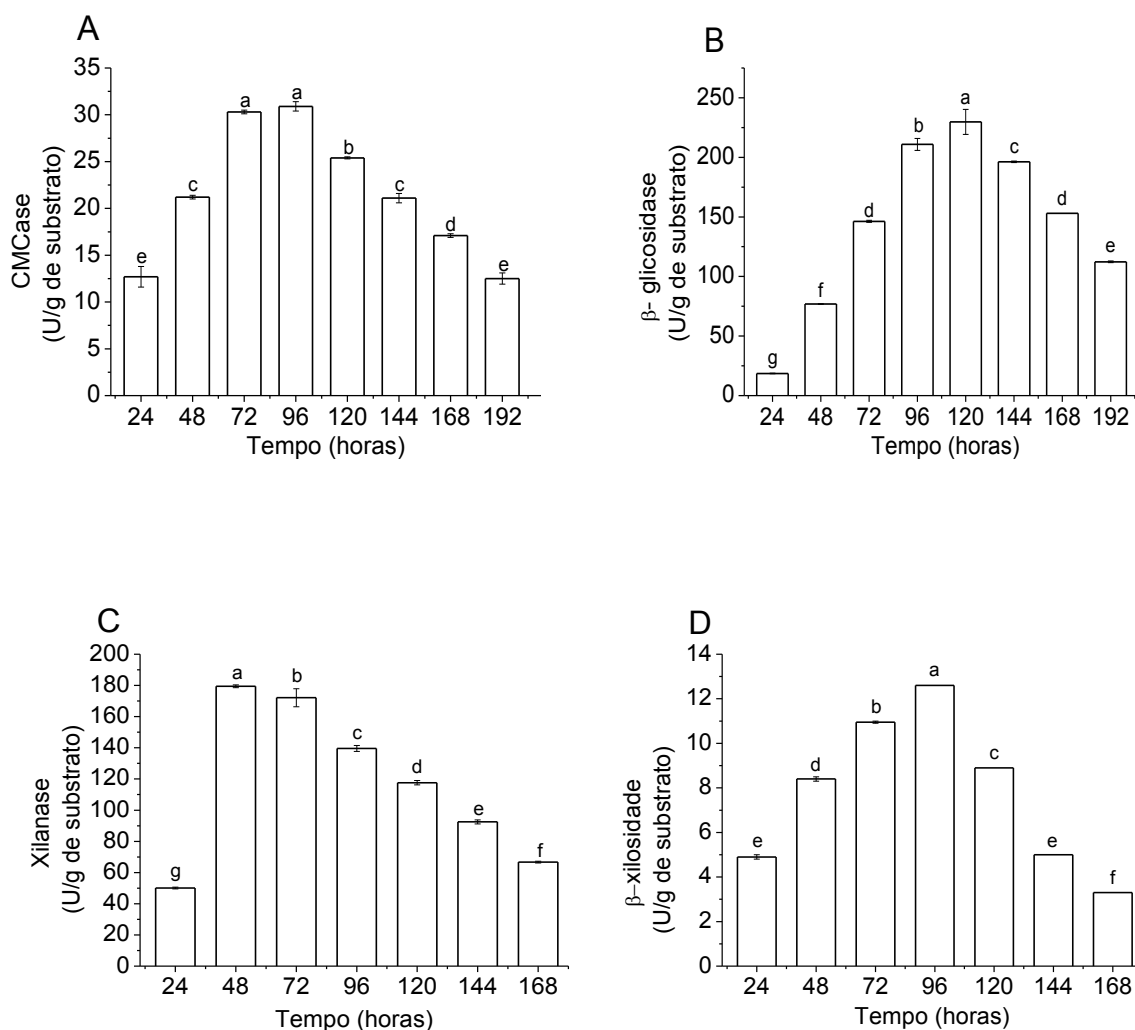


Figura 2: Produção de celulases e hemicelulases em função do tempo de cultivo do isolado 23 em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 40°C. **A) CMCCase; B) β-glicosidase; C) Xilanase; D) β-xilosidases.**

A maior produção de xilanase obtida foi de $179,5 \pm 0,9$ U/g ($17,95 \pm 0,09$ U/mL) em 48 horas de fermentação e de β-xilosidase foi de $12,6 \pm 0,0$ U/g ($1,26 \pm 0,00$ U/mL) a 96 horas, após esse tempo de fermentação foi possível observar o decréscimo da atividade das enzimas (Figura 1: **C e D**).

O valor elevado de atividade enzimática nos primeiros dias de cultivo pode ocorrer pela baixa disponibilidade de açúcares redutores disponíveis necessários para o desenvolvimento do microrganismo (SANTANA et al., 2012). As quedas nas produções enzimáticas podem ocorrer pelo esgotamento de nutrientes, por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática, ou crescimento celular, que pode resultar na morte celular e posteriormente a desnaturação das enzimas. A diminuição da água do meio também pode diminuir a atividade enzimática pela redução do sistema fermentativo,

consequentemente a redução na difusão de oxigênio e a dificuldade de eliminação de dióxido de carbono pelo fungo (SANTOS et al., 2013). A otimização do tempo no processo de produção enzimática é essencial para melhorar a técnica de fermentação, uma vez que o custo de produção enzimática é proporcional ao tempo de incubação (GARCIA et al., 2015).

Os resultados obtidos no presente trabalho são similares ou melhores que os descritos na literatura. Alves Prado et al. (2010) obtiveram 17,8 U/mL de xilanase no cultivo do fungo *Lysinibacillus sp* após 72 h de fermentação em estado sólido em palha de milho e também obtiveram 20,6 U/mL de xilanase em 72 h de cultivo em farelo de trigo. Terrasan et al. (2010), otimizaram a produção de hemicelulases em cultivo submerso de fungo *Penicillium janczewsku* obtendo 15,19 U/mL de xilanase e 0,16 U/mL de β -xilosidase. Gaffney et al. (2009) apresentam resultados inferiores aos obtidos neste presente trabalho ao estudar o fungo *T. lanuginosus* utilizando como substrato farelo de trigo e obtendo cerca de 2,335 U/g de xilanase em 45°C por 40 h. Munir et al. (2007) obtiveram com o microrganismo *Trichoderma harzianum* em farelo de arroz a máxima atividade de CMCase com 96 h de incubação cerca de 1,9 U/mL. Soni et al. (2010) alcançaram maior produção de CMCase com o fungo *Aspergillus fumigatus* em farelo de trigo cerca de 98,5 U/g. Gonçalves et al. (2013) obtiveram com o microrganismo *Lichtheimia ramosa* a produção de 2,13 U/mL de CMCase quando cultivados em farelo de trigo e produção de β -glicosidase de 17,26 U/mL em farelo de trigo a 35°C após 120h. Leite et al. (2008) relatam a produção de 13 U/g de β -glicosidase após 120h de cultivo em estado sólido pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de trigo como substrato. Xin e Geng (2010) obtiveram 61,6 U/g de β -glicosidase com *T. reesei* cultivada a 26°C durante 192 h em lascas de madeira.

Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com a literatura, mostrando que o microrganismo Isolado 23 é um ótimo produtor de β -glicosidade. Com a tendência de utilizar enzimas microbianas para aplicações industriais, torna esse microrganismo atraente por suas características apresentadas, que podendo ser aplicada na hidrólise da celulose para obtenção de etanol de segunda geração, e também na indústria de alimentos e bebidas.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o fungo isolado 23 apresenta potencial para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em cultivo em estado sólido tendo como substrato o farelo de trigo.

É importante ressaltar que os parâmetros como umidade, temperatura e tempo de cultivo influenciam na produção enzimática. Com exceção do tempo, esses parâmetros ainda não foram avaliados. Dessa forma, novos ensaios podem ser realizados, visando à otimização do processo. O tempo para a produção das enzimas foi relativamente baixo, entre 48 a 120 horas, características importantes para a redução do custo de produção, o que estimula a continuidade do trabalho visando a caracterização e aplicação dessas enzimas em etapas futuras.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES-PRADO, H. F., PAVEZZI, F. C., LEITE, R. S. R., OLIVEIRA, V. M., SETTE, L. D., DA SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 333–346, 2010.
- 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.
- BERNARDES, A. V., MARTINS, E. S., MATA, J. F., FERREIRA, O. E. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -Amilase por *Rhizomucormiehei*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 08, p. 1439-1451, 2014.
- BHAT, M. K., HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. *in enzymes in farm animal nutrition*. p. 11-23, 2001.
- CASTRO, A. M., PEREIRA, J., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.
- DANTAS, E. M., AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*, v.12, n.1, p.81-87, 2010.
- GAFFNEY, M., DOYLE, S., MURPHY, R. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v 73, n. 12, p.2640-2644, 2009.
- GARCIA, N. F. L., SANTOS, F. R. S., GONÇALVES, F. A., PAZ, M. F., FONSECA, G. G., LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, v18, n. 4, p. 314-319, 2015.
- GONÇALVES, F. A., LEITE R. S. R., RODRIGUES A., ARGANDOÑA E. J. S., FONSECA G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 377–384, 2013.
- JOO, H. S., CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus sp.* I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
- LEITE, R. S. R., BOCCHINI, D. A., MARTINS, E. S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes From *Aureobasidium pullulans* on Solid State Fermentation. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 281-288, 2007.
- LEITE, R. S. R., ALVES-PRADO, H. F., CABRAL, H., PAGNOCCA, F. C., GOMES, E., DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- PARIS, L. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. *Dissertação de Mestrado*, p. 2, 2008.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2, p. 81–84, 2003.
- RODRIGUEZ, J. A., MATEOS, J. C., NUNGARAY, J., GONZÁLEZ, J., BHANGNAGAR, T., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., BARATTI, J. Improving lipase production by nutrients

ourcemoification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 11, p. 2264–2269, 2006.

RUEGGER, M. J. S., TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, p. 205-211, 2004.

SANTANA, R. S. M., GONÇALVES, Z. S., FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.8, n.14; p. 1982, 2012.

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.

SCHUEFELE, F. B., BUTZKE, A. S., MARRA, I. F., HASAN, S. D. M., FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engvista*, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.

SHALLOM, D., SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE C., PANDEY A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SIQUEIRA, F. G., SIQUEIRA, E. G., JARAMILLO, P. M. D., SILVEIRA, M. H. L., ANDREAS, 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 and Biodegradation*, v. 64, n. 1, p.20-26, 2010.

SONI S. K., SONI R. Regulation of cellulase syntesis in *Chaetomium erraticum*. *BioResources*, v. 5, n. 1, p. 81-98,2009.

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. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

TERRASAN, C. R., TEMER, B., DUARTE, M. C., CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes from *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4139-4143, 2010.