

Produção de enzimas por *Penicillium chrysogenum* em fermentação em estado sólido usando a fibra do coco como substrato

Enzyme production by Penicillium chrysogenum in solid state fermentation using coconut fiber as a substrate

Sérgio Dantas de Oliveira Júnior^{1*}, Carlos Eduardo de Araújo Padilha², Estefani Alves Asevedo³, Vanessa Carvalho Pimentel⁴, Mariana da Costa Batista⁵, Fernanda Rodrigues de Araújo⁶, Gorete Ribeiro de Macedo⁷, Cristiane Fernandes de Assis⁸, Everaldo Silvino dos Santos⁹

¹Doutor em Engenharia Química, colaborador externo do Instituto de Pesquisas da Amazônia. Endereço: Av. André Araújo, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Doutor em Engenharia Química, colaborador externo do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Av. Senador Salgado Filho, CEP 59072-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

³Mestranda em Engenharia Química do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova CEP: 50972-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴Graduada em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova, CEP: 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁵Mestra em Engenharia Sanitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova CEP: 50972-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁶Graduada em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova, CEP: 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁷Doutora em Engenharia Química pela Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, docente titular livre da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova CEP: 59072-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁸Doutora em Biotecnologia, docente associado nível II do departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: General Cordeiro de Faria, Petrópolis CEP: 59010-180, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁹Doutor em Engenharia Química, docente permanente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Endereço: Av. Senador Salgado Filho, Lagoa Nova CEP: 50972-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: sergiodantas100@hotmail.com

Recebido: 10/01/2021; Aceito: 06/06/2021

RESUMO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato na produção de enzimas é uma prática atrativa que visa reduzir custos de operação, além de reduzir o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes subprodutos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar a cinética de produção de enzimas celulolíticas (CMCase, Xilanase, Avicelase e FPase) de *Penicillium chrysogenum* (807) através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato a fibra do coco verde. Os valores máximos das atividades das enzimas foram CMCase (2,58 U/g), FPase (2,24 U/g), Avicelase (2,38 U/g) e Xilanase (6,72 U/g). Baseado nos resultados obtidos o microrganismo e o substrato apresentaram potencial para processos de produção de enzimas em fermentação em estado sólido.

Palavras-chave: *Penicillium chrysogenum*, fibra, complexo enzimático.

ABSTRACT

The use of agro-industrial waste as a substrate in the production of enzymes is a conventional practice that aims to reduce operating costs, in addition to reducing the environmental impact caused by the accumulation of these by-products. Thus, the objective of this work was to study the production kinetics of cellulolytic enzymes (CMCase, Xylanase, Avicelase and FPase) of *Penicillium chrysogenum* (807) through solid state fermentation using green coconut fiber as a substrate. The maximum values obtained for enzymes activities were for CMCase (2.58 U/g), FPase (2.24 U/g), Avicelase (2.38 U/g) and Xylanase (6.72 U/g.) Based on the obtained results, the microorganism and the substrate showed potential for enzyme production processes in solid state fermentation.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, fiber, enzyme complex.

INTRODUÇÃO

O grande consumo de água de coco verde (*in natura* ou industrializada) vem aumentando a geração de resíduo do beneficiamento desse fruto, ocasionando sérios problemas quanto ao descarte desse material, principalmente em grandes cidades onde são levados para lixões e aterros sanitários sem qualquer tipo de tratamento (MORETTI & MACHADO, 2006).

O processo de fermentação em estado sólido (FES) envolve o crescimento e metabolismo de microrganismos, na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato sólido, ou suporte. No entanto, o substrato deve apresentar umidade suficiente para possibilitar o crescimento celular e as atividades do metabolismo microbiano (FARINAS, 2015, SOCCOL et al., 2017).

Os fungos do gênero *Penicillium* são empregados para produção de biomoléculas como, por exemplo, a espécie *Penicillium chrysogenum* que é utilizada na produção de antibióticos (FERRER et al., 2001). Alguns estudos já comprovaram que este microrganismo apresenta alta atividade celulolítica envolvida na degradação de resíduos madeireiros (NWODO-CHINEDU et al., 2005).

As celulasas são enzimas de interesse atual, produzidas por diversos microrganismos como, por exemplo, as bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesofílicos e termofílicos, que podem ser produzidos através da fermentação submersa (FS), por meio de fermentação em estado sólido (FES) (KUHAD et al., 2016; ZHANG, 2013). No entanto, existem poucos microrganismos que produzam níveis elevados de celulase extracelular e que são capazes de hidrolisar a celulose cristalina. Outros microrganismos são incapazes de excretar as três enzimas integrantes do complexo celulolítico que agem em sinergismo, dificultando desta maneira a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis (KUHAD et al., 2016).

No presente estudo avaliou-se a produção de enzimas celulolíticas (CMCase, FPase, Avicelase e Xilanase) através da FES durante 240 h, utilizando como substrato a fibra de coco verde e o fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum* 807 como cepa produtora de celulases. Além disso, a estabilidade da enzima CMCase foi investigada sob estresses do ambiente (diferentes temperaturas e pHs).

MATERIAL E MÉTODOS

Fibra de coco verde

A casca e o mesocarpo fibroso foram utilizados para a obtenção da fibra da casca de coco verde. O fruto foi coletado em um quiosque na praia de Ponta Negra - Natal (RN). Os cocos foram selecionados e lavados. Os resíduos foram secados em estufa do tipo bandeja a 70 °C por 72 horas, e moídos em triturador (moinho tipo Willye, TE – 680, marca: Tecnal®), a granulometria do material foi de 20 *mesh*, em peneira com diâmetro de abertura de 0,850 mm, e armazenados em sacos plásticos à temperatura ambiente. A Figura 1 ilustra o aspecto do material lignocelulósico utilizado.



Figura 1. Representação do resíduo utilizado como substrato: fibra do coco verde

Fonte: Próprio Autor

Microrganismo

A cepa utilizada para a produção das enzimas foi a linhagem do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum* (807) da coleção ARS Culture Collection (EUA). O microrganismo foi inoculado em placas contendo ágar batata dextrose (BDA) sendo incubadas a ± 28 °C, por 5 dias. Os repiques foram realizados a cada 3 meses para a manutenção do microrganismo e mantidos refrigerados. A Figura 2 representa o fungo crescido em placa de Petri.

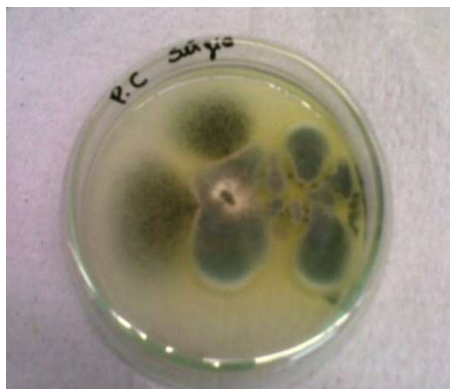


Figura 2. Representação do *Penicillium chrysogenum* (807) em placa de Petri

Fonte: Próprio Autor

Inóculo

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação dos esporos da cepa de *Penicillium chrysogenum* (807) em Erlenmeyers de 125 mL contendo sabugos de milho (4,0 g) que foram autoclavados. Para inoculação no meio do sabugo de milho foram transferidos 1,0 mL da solução de Tween 80 a 0,2% (v/v) das placas contendo os microrganismos e incubados em estufa incubadora do tipo DBO (Demanda Bioquímica de oxigênio) à 30 °C por 7 dias. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio do microscópio binocular (modelo BX 51, OLYMPUS). A concentração de esporos utilizada foi de $1,0 \times 10^6$ esporos por grama de meio sólido (COELHO et al., 2001).

Fermentação em estado sólido

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada durante 10 dias em estufa BOD a 30 ± 2 °C, sendo realizadas amostragens a cada 24 horas. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com teor de umidade em 75% e com atividade de água (a_w) igual a 0,997. Foram pesados 5,0 g do substrato em base seca (coco), com uma concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos por mL (COELHO et al., 2001) e uma solução salina nutriente (0,1%, nitrato de amônio 0,1% e sulfato de magnésio heptahidratado 0,1% (m/v), com pH corrigido para 5,0 com ácido clorídrico (0,1 M)). As atividades enzimáticas foram analisadas determinando-se as atividades de CMCase, FPase e Avicelase) e Xilanase, além disso foram determinadas as concentrações de açúcares redutores totais, proteínas totais e celulose residual.

Extração das enzimas

Os extratos enzimáticos foram coletados dos Erlenmeyers a cada 24 h durante 240 h de fermentação, em que foram adicionados 30 mL do tampão acetato de sódio (200,0 mM, pH 5,0) ao meio fermentado misturando-se com bastão de vidro. O fermentado foi submetido à agitação em *shaker* (200 rpm, 30 °C) por 30 minutos. Em seguida, o extrato foi clarificado por meio de centrifugação a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C e filtração, sendo armazenados a temperatura de -18 °C em microtubo *Eppendorf*. O sobrenadante contendo o extrato enzimático foi utilizado para análises das atividades enzimáticas (CMCase, Avicelase, FPase e Xilanase) e para determinação de proteínas totais.

Dosagem das atividades enzimáticas, proteínas totais e celulose residual

A quantificação da atividade FPásica foi realizada em papel de filtro de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). A atividade de endoglucanase (Endo-1,4-β-D-glucanase) foi determinada pelo método da carboximetilcelulose (CMC) de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). Uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 4% (m/v) foi preparada em tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8). A atividade da Xilanase foi determinada pela liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a xilana (1,0%) (Sigma) preparada em solução tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 5,0) a 50 °C. A Avicelase foi quantificada através da solução de Avicel 101 (1,0% (m/v)), e quantificada através da liberação dos açúcares redutores a 50 °C. A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER , 1959). A determinação das proteínas foi de acordo com Bradford (1976). O conteúdo de celulose residual foi determinado pela metodologia proposta por Updegraff (1969). As atividades enzimáticas foram calculadas de acordo com a Eq. (1):

$$[\text{Enz}] = \frac{\text{diluição}^* \times \Delta\text{Abs} \times \text{Fator}^{**} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times \text{Volume total da mistura reacional (mL)} \times \text{Volume do tampão de extração (mL)}}{\text{tempo (min)} \times \text{Volume do sobrenadante (mL)} \times \text{Massa do resíduo (g)}} \quad (1)$$

* Apenas se fosse necessário diluir o sobrenadante (solução enzimática)

** Fator obtido da curva padrão

Avaliação da estabilidade da CMCase

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas foi determinado realizando o ensaio padrão a uma faixa de temperatura de 30-70 °C. A estabilidade térmica das enzimas secretadas pelo *P. chrysogenum* (807) foi testada por determinação da atividade de enzima residual após incubação em banho-maria à temperatura de 30-70 °C, por 1 h. O pH ótimo foi estimado no intervalo de pH de 2,0-10,0 utilizando diferentes tampões (0,2 M) nos ensaios. Os seguintes tampões foram usados: tampão glicina-HCl para pH 2,0 e 3,0; tampão acetato de sódio para pH 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio para pH 6,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH para pH 9,0 e 10,0. A cada volume da solução tamponante foi misturado um volume de extrato enzimático na proporção de 1:1 (v/v), e mantido a 4°C durante 1 hora.

RESULTADOS

A Figura 3 ilustra o perfil cinético apresentado pelo fungo *Penicillium chrysogenum* que ocorreu durante 10 dias. Análises de proteína total (PT), açúcares redutores totais (ART), e celulose residual foram realizadas a cada 24 horas, durante 240 horas. Observa-se que o microrganismo foi capaz de consumir a fonte de carbono, ou seja, ocorre à redução de ART, e que se manteve constante nos últimos dias ($5,25 \pm 0,08$ mg/mL). Durante o processo fermentativo ocorre a formação de metabólitos como, por exemplo, as proteínas que alcançaram concentração máxima ($0,38 \pm 0,03$ mg/mL) durante 96 horas de cultivo. Destaca-se a presença de celulose residual mesmo no término da fermentação, com valor de $0,18 \pm 0,04$ mg/mL no último dia FES.

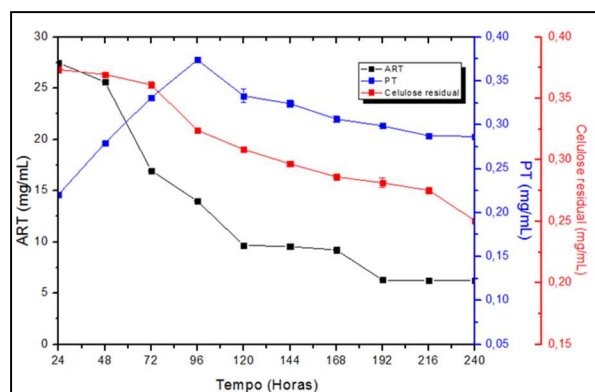


Figura 3. Perfil dos teores de açúcares redutores totais, proteínas totais e celulose residual produzidos pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (807) durante 10 dias de cultivo utilizando a fibra de coco verde como substrato na fermentação em estado sólido.

A Figura 4 representa o perfil cinético das quatro enzimas produzidas pelo *Penicillium chrysogenum* (807) durante os 10 dias. No que diz respeito à CMCase, a mesma apresentou o maior valor no quinto dia com atividade de 2,58 U/g, sofrendo redução até o final do cultivo, ou seja, após 240 h. Para as enzimas Avicelase e Xilanase as atividades máximas foram alcançadas entre 72 e 96 horas, com uma produção de 2,38 U/g e 6,72 U/g, respectivamente. Para a FPase sua atividade máxima foi em 96 horas com uma produção de 2,24 U/g ficando com atividade praticamente constante até o final do cultivo.

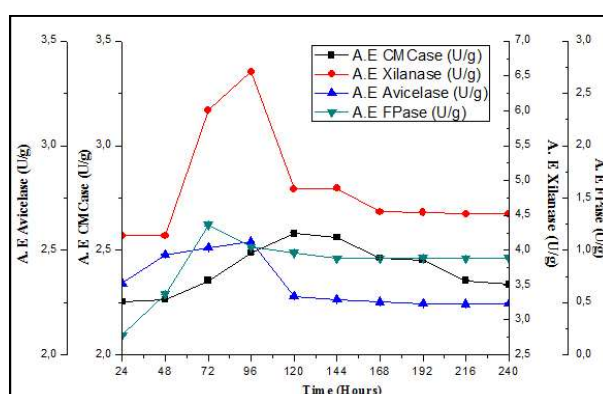


Figura 4: Perfil das atividades enzimáticas (CMCase, Xilanase, Avicelase e FPase) durante os 10 dias na FES, utilizando o fungo *Penicillium chrysogenum* (807) e a fibra de coco verde como substrato.

DISCUSSÃO

A FES reproduz o *habitat* natural dos fungos filamentosos, de modo que esses microrganismos sejam capazes de crescer satisfatoriamente em substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzimas, como por exemplo, as celulasas (SILVA et al., 2005). A escolha por um substrato específico para o cultivo usando FES, leva em consideração o custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilitam o fornecimento de elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em *habitat* naturais.

As condições propostas para este processo fermentativo são em decorrência das maiores atividades enzimáticas verificadas de acordo com Oliveira Júnior (2014). Do mesmo modo, a utilização do resíduo (fibra de

coco verde), com umidade de 75%, e o pH 5,0 foi levado em consideração ao encontrado na literatura, pois é o melhor para o desenvolvimento do *Penicillium chrysogenum*.

A escolha da fibra do coco verde como substrato para o processo fermentativo foi devido a sua composição estrutural (celulose, hemicelulose e lignina), que serviu como fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo, e para a indução de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Oliveira Júnior et al. (2018) encontraram valores de $36,23 \pm 0,09$, $23,79 \pm 0,31$ e $30,23 \pm 0,12$ para a celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente, quando utilizaram a fibra do coco verde na FES.

Em cultivos em FES, uma umidade muito elevada resulta na diminuição da porosidade, problemas nas trocas gasosas e contaminação cruzada (NARAHARA et al., 1982). Baixos teores de umidade ocasionam problemas no crescimento dos microrganismos (LONSANE et al., 1985). A quantidade de água livre é um parâmetro de grande importância para FES, pois ela é utilizada para a difusão dos gases, dos solutos e dos metabólitos inibitórios (PANDEY, 2003). Portanto, a umidade de 75% e a atividade de água (a_w) igual a 0,997 foram favoráveis ao processo.

A umidade para o cultivo do microrganismo em FES depende da porosidade do substrato, ou seja, o quanto ele consegue reter água. Por isso a umidade tem que estar relacionada com a umidade da biomassa para poder promover o crescimento do agente fermentador (DOELLE et al., 1992). Existe um valor de umidade para cada microrganismo associado ao substrato que não necessariamente será o melhor valor para a excreção do produto de interesse (NARAHARA et al. 1982).

A quantidade de água na FES é sempre limitada e para que o processo ocorra de maneira ideal é necessário o controle da umidade. A quantidade de umidade presente para cada substrato permite a formação de um filme de água na superfície, o que facilita a transferência de oxigênio e nutrientes. Os espaços que existem na matriz sólida devem estar livres para que ocorra a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (DESCHAMPS et al., 1985).

Na FES, cada microrganismo possui uma quantidade de água livre ideal que é necessária para as atividades metabólicas e de seu crescimento. Uma pequena variação nos teores de umidade acarreta problemas no crescimento e metabolismo dos microrganismos (ANDRADE, 1999).

A faixa de pH para os microrganismos durante a FES possui um amplo limite de variação (Perazzo, 1999), podendo diferir no pH para o crescimento microbiano e o pH para formação das biomoléculas alvo, porém, devendo-se considerar que o pH apresenta significativos efeitos sobre os resultados de um processo fermentativo, seja para FSm ou FES (Pandey, 2003). Existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o crescimento e desenvolvimento de cada microrganismo, por exemplo, os fungos preferem pH baixo (4,5 – 6,0) e as bactérias pH neutros (6,5 – 7,0) (PERAZZO, 1999).

O controle do pH durante a FES é bastante difícil (Lonsane et al., 1985; Pandey, 2003; Perazzo, 1999), sendo que o monitoramento e o controle deste parâmetro geralmente não são realizados, devido as dificuldades das técnicas aplicadas. Uma maneira de evitar este problema é o uso de substratos com a capacidade tamponante (DEL BIANCHI et al., 2001). O pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e para a secreção enzimática. A variação de pH no meio durante o crescimento dos microrganismos afeta a formação e estabilidade do produto (PANDEY, 2003). As variações que ocorrem com o pH dos meios um cultivo é em decorrência das reações que ocorrem durante as atividades metabólicas dos microrganismos. Por exemplo, os sais de amônia formado pelo metabolismo do nitrogênio faz com que o pH diminua durante o crescimento celular, o íon hidrogênio é formado quando carboidrato é consumido (DOELLE et al., 2002).

A cinética estabelecida para o fungo *Penicillium chrysogenum* ocorreu durante 10 dias. A cada 24 horas foram retiradas duplicatas de Erlenmeyers para a determinação de proteína total (PT), açúcares redutores totais (ART), CMCase, Avicelase, Xilanase, FPase e celulose residual.

As enzimas carboximetilcelulase (endoglucanase) e Avicelase (exoglucanase) formam um sistema enzimático hidrolítico importante para a degradação da celulose (BAYER e LAMED, 1992). As atividades dessas enzimas presentes na cinética em questão podem comprovar o potencial que o fungo possui em degradar a celulose, confirmando assim a indução na produção das enzimas celulolíticas constitutivas que iniciarão a hidrólise da celulose, induzido a síntese de endoglucanases (CMCase).

A atividade celulolítica aumentou com o tempo de fermentação, até 72 h, e a partir desse tempo o microrganismo alcançou a fase estacionária do seu crescimento. Após esse período, ocorreu diminuição na atividade FPase, que pode estar relacionada a mudanças nas condições do meio de cultivo, juntamente com a limitação da concentração de nutrientes no meio e a formação de subprodutos. Assim, pode ocorrer a morte celular e posterior desnaturação de enzimas, reduzindo a atividade enzimática (HAQ et al., 2006). Além disso, essa redução possivelmente pode estar ligada ao esgotamento do substrato, o polissacarídeo celulósico. Uma outra hipótese é a ocorrência de repressão catabólica, ocasionando uma redução nas atividades dessas enzimas, pela inibição provocada por metabólitos ou ácidos produzidos durante a fermentação.

As maiores atividades da xilanase provavelmente seja devido à hidrólise da hemicelulose bem como a presença de alguns nutrientes. O tipo e a concentração de nitrogênio são importantes fatores nutricionais responsáveis por regular a produção de enzimas lignocelulolíticas (KCHLISHVILI et al., 2006).

Destaca-se que a temperatura ótima da enzima CMCase foi de 50 °C. O resultado da estabilidade térmica indicou que durante 1h de incubação a 50 °C o extrato bruto manteve mais de 80% da sua atividade residual. Com relação a estabilidade ao pH, a enzima manteve 60% da sua atividade ao pH 5,0. Por ser uma temperatura relativamente baixa, a utilização da CMCase produzida por *P. chrysogenum* em processos biotecnológicos torna-se interessante, por ser mais econômico devido à redução do custo com energia, além de diminuir o risco de contaminação por fatores externos. A estabilidade em pH ácido é vantajoso, haja visto, que grande parte dos processos biotecnológicos ocorrem em pH ácidos.

A termoestabilidade é uma interessante propriedade das enzimas utilizadas em processos biotecnológicos (RAY, 2010). Em ensaios de hidrólise, por exemplo, as enzimas termoestáveis apresentam várias vantagens, como atividade específica mais elevada, o que ocasiona a diminuição na quantidade da carga enzimática utilizada no processo, conferindo maior estabilidade podendo alongar o tempo de hidrólise e permitem o aumento da flexibilidade de variações do processo (VIAKARI et al., 2007). Assim, celulasas e xilanasas termoestáveis apresentam vantagens na aplicação industrial e biotecnológica.

CONCLUSÃO

A reutilização de resíduos oferece uma alternativa para a redução do impacto ambiental, da mesma maneira, nos custos do processo fermentativo. O aproveitamento do resíduo lignocelulósico, a fibra de coco verde como substrato, mostrou ser bastante promissor ao crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* (807), além de possibilitar a produção de um extrato enzimático com níveis significativos de atividade enzimática de CMCase, FPase, Avicelase e Xilanase.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela infraestrutura fornecida para que o presente trabalho pudesse ser realizado. Ao Departamento de pós-graduação em Engenharia Química por todo apoio às análises. Agradecimento ao CAPES pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglucosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento do arroz**. Dissertação de mestrado – centro de estudos ambientais, Programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 1999.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim Ceppa**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALHO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. IN SCHIMEDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucheir LTDA, v. 2, 2001.

DESCHAMPS, F.; GIULIANO, C.; ASTHER, M. Cellulose production by *Trichodema harzinaum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.85, p.13-24, 1985.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.52, p.179–188, 2015.

FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; SOLÀ, C. Production of native and recombinat lipases by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.95, n.3. p.221-255, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

HAQ, I. U.; MUKHTAR H.; UMBER H. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. **Journal of Agriculture Social Science**, v.2, n.1, p.23–25, 2006.

KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M.; TSIKLAURI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.391-397, 2006.

KUHAD, R. C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K. K.; KAUR, A. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.55, p.249–272, 2016.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v.7, p.258-265, 1985.

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

MORETTI, C. M.; MACHADO, C. M. M. **Aproveitamento de resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Piracicaba, SP: Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças - USP/ESALQ, p. 25-32, 2006.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANIGKURA,.; SUMALEE.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, v.6, n.4, p.311-319, 1982.

NWODO-CHINEDU, S.; OKOCHI, V. I.; SMITH, H. A.; OMIDIJI, O. Isolation of cellulolytic microfungi involved in woodwaste decomposition: prospect for enzymatic hydrolysis of cellulosic wastes. **International Journal of Biomedical and Health Science**, v.1, n.2, p.41-51, 2005.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. de. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. 2014.

OLIVEIRA, S. D.; ARAÚJO PADILHA C. E.; ASEVEDO, E. A.; PIMENTEL, V. C.; ARAÚJO, F. R.; MACEDO G. R.; SANTOS E. S. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.6, p.937-944, 2018.

PANDEY, A. Solid State Fermentation. Biochemical. **Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.81- 84, 2003.

PERAZZO, A. N. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus - indica mill*) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. Tese (doutorado). Escola de química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1999.

RAY, R. R. Extra Cellular Endoxylanase Production from Solid State Fermentation of Dried Grass by *Streptomyces sp* OM 09. **Journal of experimental Sciences**, v.1, p.33-36, 2010.

SILVA, E. M.; MACHUCA A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 283-8, 2005.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDERBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v.1, n. 1, p. 52–71. 2017.

UPDEGRAFF, D. M. Semi micro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v.32, p.420–424, 1969.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; YEHMAANPERA, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.121–145, 2007.

ZHANG, X. Z.; ZHANG, Y. H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: YANG, S-T.; EL-ENSHASY, H.; THONGCHUL, N. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. 1a ed. John Wiley & Sons, p.131– 146, 2013.