

74937 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CELULASE (CMCase) POR FUNGO ISOLADO DA FASE TERMOFÍLICA DE UM PROCESSO DE COMPOSTAGEM EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO TENDO BAGAÇO DE COCO VERDE COMO SUBSTRATO

Glauçiane Danusa Coelho¹, Caroline da Silva Freitas², Eliel Gomes Barbosa², George Lacerda Belém², Lucas Rodolfo Inácio Silva³, Maxsuel da Costa Leão², Ravenna Lins Rodrigues², Ana Verônica Silva do Nascimento¹

¹ Professora da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos; Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Rua Luiz Grande, s/n - Sumé - PB, 58540-000, e-mail: glauçiane.coelho.pb@gmail.com

² Graduandas (os) do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Rua Luiz Grande, s/n - Bairro Frei Damião, Sumé - PB, 58540-000, e-mail: carolinefreitas13@gmail.com

³ Engenheiro de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Rua Luiz Grande, s/n, Sumé - PB, 58540-000

RESUMO: As atividades agroindustriais têm promovido aumento da produção de resíduos ligninolíticos. Dentre os produtos de origem agroindustrial, pode-se destacar a casca de coco verde, que tem gerado grandes quantidades de resíduos devido ao aumento do beneficiamento de coco verde para a comercialização de água de coco. A necessidade do desenvolvimento sustentável vem demonstrando a necessidade de produção mais limpa. Dessa forma, nesse trabalho o bagaço da casca de coco verde foi empregado para a produção de enzima celulolítica (CMCase), a partir de um fungo isolado da fase termofílica de um processo de compostagem. O efeito da temperatura e da umidade na cinética de produção de CMCase foi avaliada em fermentação em estado sólido, utilizando um planejamento fatorial 2². O fungo utilizado foi identificado como *Aspergillus sp.* e foi capaz de colonizar o bagaço de coco verde e produzir CMCase, sendo que a melhor produção da CMCase foi obtida a 45°C e 45% de umidade (bu). A CMCase obtida nessa condição apresentou temperatura e pH ótimo de 50°C e 5,0, respectivamente, e a meia vida foi estimada em 17,5 minutos.

Palavras chaves: bioprocessos, enzimas microbianas, processo fermentativo, enzima de interesse industrial

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE (CMCase) BY FUNGUS ISOLATED FROM THE THERMOPHYLIC PHASE OF A PROCESS OF COMPOSTING IN FERMENTATION IN SOLID STATE WITH COCONUT BAGASSE GREEN AS A SUBSTRATE

ABSTRACT: The agroindustrial activities have promoted an increase in the production of ligninolytic residues. Among the products of agroindustrial origin, it is possible to emphasize the green coconut bagasse, which has generated large amounts of residues due to increase of the green coconut processing for coconut water commercialization. The need for sustainable development has demonstrated the need for cleaner production. Thus, in this work the bagasse of the green coconut was used for the production of cellulolytic enzyme (CMCase), from a fungus isolated from the thermophilic phase of a composting process. The effect of temperature and humidity on the kinetics of CMCase production was evaluated in solid state fermentation using factorial design 2². The fungus used was identified as *Aspergillus sp.* and was able to colonize the green coconut bagasse and produce CMCase, and the best CMCase production was obtained at 45 ° C and 45% humidity (bu). The CMCase obtained in this condition presented optimum temperature and pH of 50 ° C and 5.0, respectively, and the half-life was estimated to be 17.5 minutes.

Key words: bioprocesses, microbial enzymes, fermentative process, enzyme of industrial interest

1. INTRODUÇÃO

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza e compõem cerca de 60% de toda a biomassa produzida na terra (1) (2) (3). A biomassa lignocelulósica tem origem em resíduos vegetais, florestais, animais, resíduos sólidos urbanos e industriais. Estes resíduos geralmente contêm 30-45% de celulose, 25 - 30% de lignina, 25 – 30% de hemicelulose, e uma pequena

quantidade de cinzas e extrativos. A proporção percentual desses componentes depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (4).

A celulose é o biopolímero de maior ocorrência no mundo. Quimicamente, a celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular, estando firmemente empacotadas em cadeias lineares de D-glicose com ligações β -(1 \rightarrow 4) (5)

A hemicelulose é um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos ramificados e lineares, composta de várias unidades monoméricas de açúcar formadas por cinco e seis carbonos (6), os quais estão ligados com as microfibrilas de celulose na parede celular da planta e também covalentemente ligado à lignina, formando assim uma estrutura altamente complexa (7).

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante na natureza. Representa cerca de 20-30% da massa total do material lignocelulósico e durante o crescimento vegetal vai sendo incorporada. Constituída basicamente de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinamílicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (8).

Os microrganismos apresentam importante papel na natureza, bem como no desenvolvimento de bioprocessos. Apesar disso, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta estejam catalogados e descritos (9). Dentre os microrganismos de grande importância destacam-se os fungos filamentosos que são reconhecidos pela capacidade de excretarem enzimas capazes de degradar diversos substratos (10).

As enzimas são moléculas de natureza proteica, que atuam como catalisadores biológicos e apresentam alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato. (11). As celulasas representam um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar a celulose natural em carboidratos menores (12). As enzimas do complexo celulolítico são classificadas em endoglucanases, exoglucanases, β -glicosidades e celulasas oxidativas, de acordo com o modo de ação (13)

As endoglucanases clivam ligações glicosídicas internas da celulose liberando oligossacarídeos de vários comprimentos. Essas enzimas atuam sobre a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose

(CMC) e também são conhecidas como endo β -1-4 glicanases e carboximetil celulases. Exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) atuam na celulose cristalina produzindo uma reação lenta e gradual de despolimerização (14)

As β -glicosidades ou celobiasas possuem a função de desdobrar a celobiose, gerada pelas endoglicanases e exoglicanases, em glicose, completando a hidrólise da celulose (15; 16). As celulases oxidativas despolimerizam celulose por reações de radicais, como é o caso da celobiose desidrogenase (13).

A produção de celulases por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com o objetivo de estabelecer melhores condições para a produção dessas enzimas. Sendo que no processo de produção enzimática, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em meio de cultivo, ou substrato, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma vasta gama de microrganismos tem sido estudada extensivamente de forma a tornar o processo de produção de enzima viável (17).

Dentre todos os organismos celulolíticos, alguns dos mais utilizados industrialmente são os fungos filamentosos dos gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, e *Penicillium* (18; 19; 20).

Dentre as aplicações das celulases pode-se destacar o uso na indústria têxtil, na indústria de bebidas, na nutrição animal, na fabricação de detergentes e na indústria de polpa e papel. Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, os chamados materiais lignocelulósicos (19).

Este trabalho tem como objetivo a produção de endoglucanase (CMCase) fungo filamentoso *Aspergillus sp* obtido a partir da fase termofílica de um processo de compostagem, bem como caracterizar a CMCase produzida por FSS, tendo bagaço de coco verde como substrato.

2. MATERIAL E MÉTODO

Local de realização do trabalho: Os experimentos do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em Sumé – Paraíba.

Substrato: neste trabalho foram utilizados o mesocarpo e o epicarpo do coco verde, que foi obtido por agricultores da cidade de Sumé, Paraíba, que doravante será designado como bagaço de coco verde.

Preparo do substrato: o bagaço de coco verde foi triturado em forrageira e foi lavado em água potável para a remoção dos sólidos solúveis totais (SST). A remoção dos SST foi acompanhada aferindo-se a água de lavagem com auxílio de um refratômetro. O processo de lavagem do substrato teve como função remover os açúcares redutores que podem reprimir a síntese enzimática, que apesar de, em geral, ser excelente fonte para o crescimento celular é reportada como repressora, quando em grande quantidade, para a produção de diversas enzimas, sendo uma delas a celulase (9).

Microrganismo: O fungo utilizado nesse estudo foi isolado da fase temofílica de um processo de compostagem. E foi escolhido por apresentar alto índice de produção de celulase (FPase) em meio sólido (IE=15) (21).

Identificação do fungo: foi realizada por meio da técnica de microcultivo (22). Em placa de Petri foi adicionado meio de cultura BDA (batata 200g, dextrose 20g, ágar 20g e água destilada qsp 1000mL). Após a solidificação, uma pequena parcela do meio foi transferida para uma lâmina. Esta foi inoculada e coberta por uma lamínula. O conjunto foi inserido em uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido e incubado a 25°C. O crescimento fúngico foi acompanhado por microscopia óptica e a identificação foi realizada comparando-se as imagens encontradas na literatura. Todos os itens utilizados nesse procedimento foram previamente esterilizados.

Preparo do inóculo: em placa de Petri contendo o fungo, previamente crescido em meio BDA adicionou-se água destilada esterilizada e os esporos foram raspados com uma alça de inoculação. A suspensão foi filtrada com auxílio de gaze e algodão esterilizados e a concentração de esporos foi quantificada em câmara de Neubauer espelhada.

Cinética de produção de celulase (CMCase) por fermentação em estado sólido (FSS): foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central, totalizando 7 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória, para avaliar o efeito da umidade inicial do meio (U) e a temperatura (°C) de incubação na produção enzimática. Os valores de umidade (b.u.) e temperatura utilizados foram, respectivamente, 45% (-1), 55% (0), 65% (+1) e 30°C (-1), 37°C (0) e 45°C (+1).

Determinação da umidade: aproximadamente cinco (5) gramas do substrato foi colocado na termo balança determinadora de umidade (SHIMADZU - MOC63u) por 15 minutos a 105°C.

Ajuste da umidade: foi realizado utilizando-se a equação 1.

$$V_{aa} = M_{aa} = m_i * \frac{v_2 - v_1}{1 - v_2}$$

Sendo:

$V_{aa} = M_{aa}$ = volume de água a ser adicionado ao meio;

M_i = quantidade de substrato utilizado;

V_2 = umidade desejada;

V_1 = umidade encontrada

Sistema de fermentação em estado sólido (FSS): foi realizada em frascos de vidro, com capacidade de 500 mL, contendo quinze (15) g de bagaço de coco esterilizado por via úmida (60 min, 1 atm) com a umidade inicial ajustada. Ao sistema de FSS foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos na concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹. Os sistemas de FSS foram incubados por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h nas temperaturas indicadas no planejamento fatorial.

Crescimento microbiano no substrato: foi determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), STANDARD METHODS G21-90 (1990), que apresenta as seguintes faixas de crescimento:

(-) Ausência de crescimento;

(+) Pouco crescimento, com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;

(++) Moderado crescimento com surgimento de pellet fino na superfície do meio;

(+++)⁶ Ótimo crescimento da metade a todo o frasco.

Obtenção do extrato enzimático bruto: a cada frasco foi adicionado 60 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 (23). O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 min, e em seguida agitado em mesa agitadora a 120 rpm durante 1 hora a 25 °C. O extrato bruto foi obtido por filtração a vácuo utilizando papel de filtro qualitativo. O extrato enzimático bruto foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de carboximetilcelulase (CMCase) bem como para a caracterização desta atividade.

Determinação da atividade carboximetilcelulases (CMCase): foi realizada pela análise da capacidade do extrato enzimático bruto em liberar açúcares redutores (24). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose, por minuto, a 50°C. O meio reacional foi composto por 500 μL do extrato enzimático e 500 μL de solução carboximetilcelulose a 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM. A mistura foi incubada a 50°C por 5 e 10 minutos. Após esse tempo foi retirado o volume 500 μL do meio reacional e colocado em tubo de ensaio contendo 500 μL de reagente de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) que interrompeu a reação.

Após fervura de 5 minutos foi adicionado 2,5 mL de água ultrapura e procedeu-se a leitura a 540 nm. Os testes foram realizados em duplicatas.

A curva padrão para a determinação dos açúcares redutores foi construída com o intervalo de diluição da glicose de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ com limites inferior e superior de 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Determinação da temperatura e do pH ótimo: a determinação do pH ótimo foi realizada por meio da incubação do extrato bruto em presença de soluções tamponantes McIlvaine com CMC a 1% no intervalo de pH de 3,0 a 8,0 a 50°C. A determinação da temperatura ótima reacional foi realizada por meio da incubação do extrato bruto nas temperaturas de 40 a 70°C, no pH ótimo, em presença de CMC a 1%. Os ensaios foram feitos em duplicata.

Determinação da meia-vida CMCase produzida em FSS: A meia vida, tempo necessário para perda de 50% da atividade inicial, foi avaliada a 50°C, após a incubação do extrato por diferentes intervalos de tempo. Alíquotas foram retiradas para determinação de atividade CMCase residual. A partir dos resultados estimou-se a meia vida ($T_{1/2}$). Os ensaios foram feitos em duplicata.

Efeito de íons e substâncias sobre a atividade CMCase: o efeito de alguns íons sobre a atividade de CMCase foi avaliado pela incubação do filtrado bruto em tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Foram avaliadas as seguintes substâncias: Cloreto de Magnésio (MgCl_2), Iodeto de Potássio (KI), Sulfato de Magnésio (MgSO_4), Cloreto de Cálcio (CaCl_2) nas concentrações de 1mM e 10mM. Os ensaios foram feitos em duplicata

Análise dos resultados: Os resultados foram analisados por meio de análises de variância (ANOVA) e de gráficos gerados pelos programas computacionais *Statistica* TM (Versão 8.0, da *Statsoft*, Inc.) e *Origin Pro* 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do fungo

As imagens obtidas por meio da técnica de microcultivo (Figura 1) permitiu identificar que o fungo utilizado nesse trabalho pertence ao gênero *Aspergillus*, uma vez que há produção de fiálides e conídios em cadeias secas. Os conidióforos são simples, asseptados e sem ramificações, com uma base chamada de pé. O conidióforo ainda se conecta a uma hifa vegetativa, se estendendo por alguns milímetros de comprimento terminando numa vesícula onde estão alocadas as fiálides.(25).

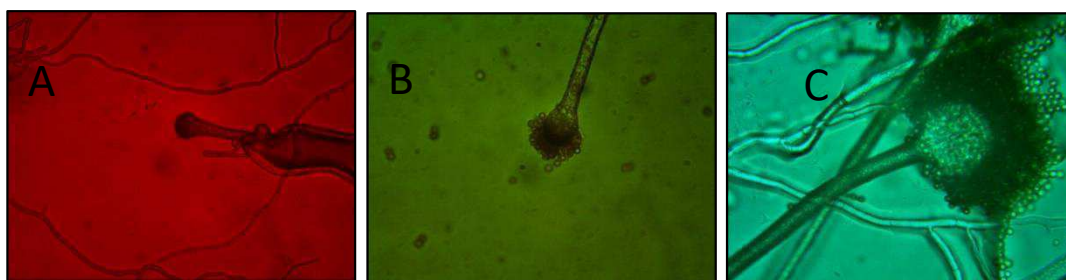


Figura 1. Imagens obtidas por meio do micro cultivo com 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação em meio BDA.

Crescimento microbiano

A Tabela 1 apresenta a avaliação visual do crescimento de *Aspergillus sp* em bagaço de coco, nos ensaios estabelecidos no planejamento fatorial. A avaliação visual do crescimento segundo a ASTM G21-90 (1990) permitiu constatar que no Ensaio 01 (30°C e 45% de umidade) e 02 (30°C e 65% de umidade) o crescimento só foi verificado a partir das 72h de fermentação, tendo pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio. A partir das 144h foi observado crescimento moderado com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio.

No Ensaio 03 (45°C e 45% de umidade) observou-se a colonização do substrato a partir das 72h de fermentação, com pouco crescimento e turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio, indicando que as condições de temperatura e umidade não foram propícias para o crescimento fúngico.

Tabela 1 - Crescimento qualitativa de *Aspergillus sp* segundo ASTM G21-90 (1990)

Ensaio	24h	48h	72h	96h	120h	144h	196h
01	-	-	+	+	+	++	++
02	-	-	+	+	+	++	++
03	-	-	+	+	+	+	+
04	-	-	-	-	-	-	-
05	+	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	+	+
07	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: dados da pesquisa

No Ensaio 04 (45 °C e 65% umidade) não foi verificado crescimento micelial.

Nos Pontos Centrais (Ensaios 05, 06 e 07) realizados a 37°C e 55% de umidade observou-se pouco crescimento em todos os tempos avaliados.

Como o fungo utilizado foi isolado numa temperatura de 43°C \pm 2 (10) (26) esperava-se maior crescimento fúngico a temperatura de 45°C, o que não foi observado. O fungo teve maior crescimento nos ensaios em que temperatura foi de 30°C. No entanto, é possível afirmar que o microrganismo foi capaz de crescer no bagaço de coco verde triturado.

Cinética de atividade de CMC_{Case}

Em todos os Ensaios realizados houve produção de atividade enzimática de CMC_{Case}. Na Figura 02 está apresentado o perfil cinético de produção de atividade de CMC_{Case} em FSS tendo bagaço de coco como substrato.

O Ensaio 01 (30°C e 45% de umidade) apresentou atividade máxima de 0,34 U.mL⁻¹ com 24h de incubação. Após o pico de produção de CMC_{Case}, observou-se a diminuição dessa atividade conforme descrito anteriormente (27). No Ensaio 03 (45°C e 45% de umidade) foi verificado o melhor resultado para a produção de CMC_{Case} com atividade máxima de 0,6 U.mL⁻¹. Esse valor é superior aos apresentados por Oliveira

(28) em que um isolado fúngico de *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade máxima de CMCase de 0,233 U.mL⁻¹ em FSS utilizando o mesmo substrato.

Nos Ensaios 02 (30°C e 65% de umidade) e 04 (45°C e 65% de umidade) observou-se produção enzimática de 0,08 U.mL⁻¹ e 0,106 U.mL⁻¹, respectivamente. Os baixos níveis de produção de CMCase, para estas condições, podem ter sido ocasionados possivelmente pelo aumento da umidade.

Nos Pontos Centrais (37°C e 55% de umidade) a máxima atividade de CMCase foi de 0,039 U.mL⁻¹. Sendo que temperatura e umidade moderadas não promoveram boa produção de CMCase.

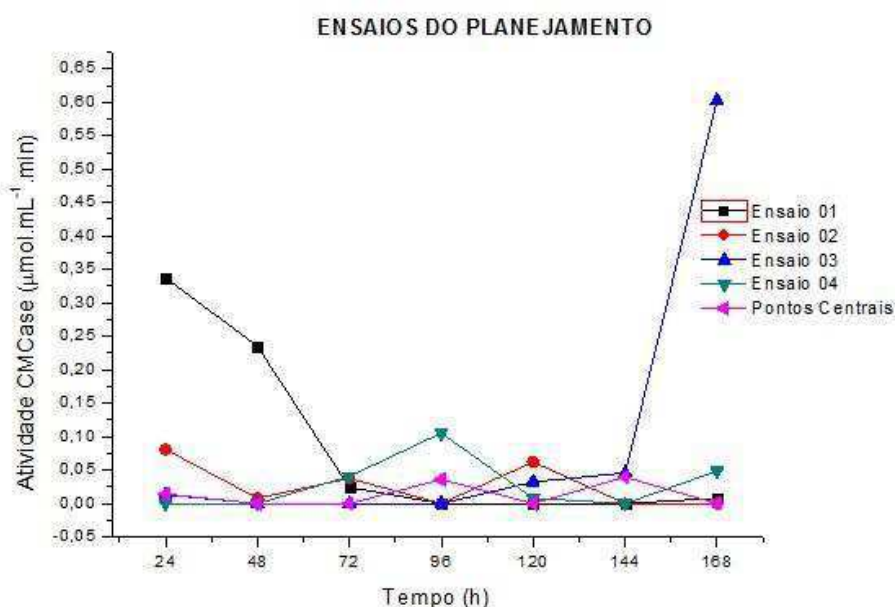


Figura 2 – Comportamento cinético das atividades expressas em CMCase de todos os ensaios do planejamento. Fonte: dados da pesquisa

Apesar de ser verificada maior produção de atividade de CMCase nos Ensaios 3 e 1, respectivamente, ambos com umidade de 45%, as análises estatísticas evidenciaram que nenhuma das variáveis independentes estudadas (temperatura e umidade) apresentaram efeito significativo sobre a produção de atividade de CMCase, o que é confirmado pelo diagrama de Pareto (Figura 3A).

O gráfico de contorno (Figura 3B) evidencia que as maiores atividades de CMCase foram obtidas a 45% de umidade e a 45°C, referente ao Ensaio 3.

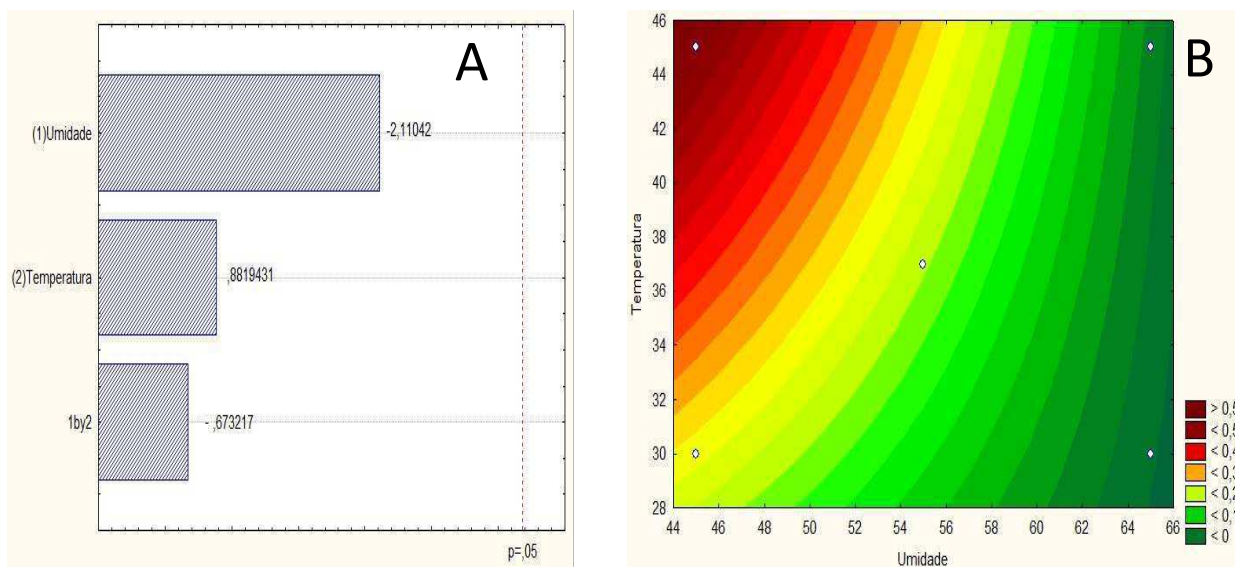


Figura 3 – Diagrama de Pareto (A) e Gráfico de contornos das variáveis independentes umidade e temperatura em função da atividade enzimática de CMCase de *Aspergillus sp.* Fonte: dados da pesquisa

Determinação de temperatura e de pH e ótimos

Os efeitos da temperatura e do pH e sobre a atividade de CMCase foram avaliados em extratos enzimáticos brutos obtidos nas condições de cultivo utilizadas no Ensaio 3 (45°C e 45% de umidade) em que foi verificada a máxima atividade de CMCase (0,6 U.mL⁻¹). As figuras 4A e 4B apresentam o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de CMCase produzida pelo fungo *Aspergillus sp.*, isolado na fase termofílica de um processo de compostagem, durante crescimento em bagaço de coco verde.

O aumento dos valores de pH proporcionou o aumento da atividade enzimática. Sendo que o pH ótimo foi determinado em pH 5,0. Em valores de pH superiores a 5,0, a atividade de CMCase apresentou tendência de redução, e nos valores de pH 7 a 8 verificou - se ainda cerca de 70% da atividade inicial. O pH ótimo determinado para a CMCase de *Aspergillus sp* está dentro da faixa de pH esperado para as celulasas fúngicas que varia de 3,6 a5,0 (20)

A temperatura ótima foi determinada em 50°C, sendo que a 60°C foi verificada apenas 20% de atividade residual.

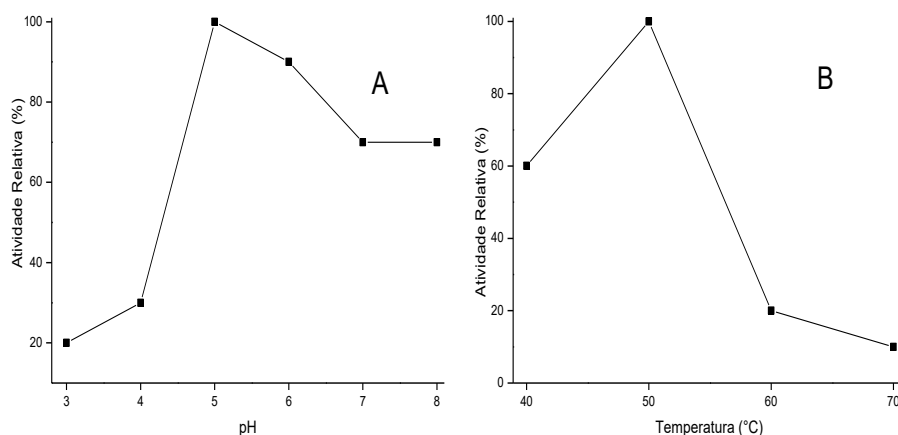


Figura 4. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) de reação sobre a atividade do extrato bruto de *Aspergillus sp.* O pH ótimo foi determinado em pH McIlvaine. A temperatura ótima foi determinada no pH ótimo. O extrato enzimático bruto foi obtido em FSS, a 45°C tendo bagaço de coco como substrato com 45 % de umidade (b.u.).

Determinação da meia-vida CMCase produzida em FSS

A estabilidade térmica do extrato bruto de *Aspergillus sp* em FSS foi avaliada na temperatura ótima (50°C). O $T_{1/2}$ foi estimado em 17,5 min.

No perfil de termo inativação (dados não apresentados) foram verificadas duas fases. Na primeira fase, a perda de atividade CMCase ocorreu de forma lenta, sendo que com 10 min e 15 min de incubação verificou-se 60 % da atividade inicial. Na segunda fase, a redução de atividade CMCase ocorreu de forma rápida, sendo que aos 30 min de incubação foram verificados apenas 4% de atividade residual. A ocorrência de um perfil de termo inativação bifásico pode indicar a existência de diferentes isoenzimas no extrato enzimático bruto, as quais são desnaturadas a taxas diferentes (29).

Efeito de íons sobre a atividade

A adição de cloreto de cálcio na concentração de 1 mM estimulou em 20% a atividade de CMCase, contudo na concentração de 10 mM promoveu efeito inibitório de

60%. O Iodeto de Potássio na concentração 1 mM não alterou a atividade de CMCase e na concentração 10 mM reduziu a atividade em 20%.

A atividade de CMCase do extrato bruto foi inibida na presença de $MgCl_2$ e $MgSO_4$ em ambas concentrações avaliadas. Sendo que a adição os íons de $MgCl_2$ e $MgSO_4$ a 1 mM promoveu redução de 50% e 10% da atividade da CMCase, respectivamente. Na concentração de 10 Mm, o efeito inibitório desses íons foi intensificado, correspondendo a 60% e 80%, respectivamente.

4. CONCLUSÃO

O fungo utilizado pertence ao gênero *Aspergillus sp* e foi capaz colonizar bagaço de coco verde;

O bagaço de coco é um substrato com potencial para produção de CMCase;

A endoglicanase (CMCase) produzida por *Aspergillus sp* apresentou temperatura e pH ótimos característicos dos fungos pertencentes ao referido gênero;

REFERÊNCIAS

1. Tengerdy RP, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v 13, p 169-179, 2003.
2. Juhás Z, Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Processo Biochemistry*; 2005.
3. Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A, Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. *Renewable Energy*; 2009.
4. Fuentes LLG. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. [Dissertação Mestrado]. Campinas: UNICAMP; 2009.
5. Klock U. Química da Madeira: Manual didático. 3. ed. Curitiba; 2005.
6. Rubin E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008; (454): 841-5.
7. Shallom D, Shoham Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6 (3): 219-28.
8. KirK, T. K. Effects of microrganisms on lignin. *Annual Review of Phytopatology* 19719; 185-210.

9. Burke JD, Michael AB, Weintraub N, Charlotte C, Hewins R.; Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*. 2011; 43(4): 795-803.
10. Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008.
11. Lins, SAS. *Produção de celulases por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48*. [Dissertação]. Campina Grande: UFCG; 2012.
12. Damisa D, KUTA F, ADABARA N. Mutagenic treatment of *Aspergillus niger* with hydroxylamine for improved cellulase synthesis from cellulosic wastes. *Journal of Biotechnological Science*. 2013; 2 (1) 65-72
13. Saranraj P, Stella D, Reetha D. microbial cellulases and its applications: a review. *International Journal of Biochemistry & Biotech Science* 2012; 1: 1-12.
14. Martins, LF. *Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum**. [Dissertação] Curitiba: UFPR; 2005.
15. Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997 (15): 583-620.
16. Lynd LR. Microbial cellulases utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002; (66): 506-77.
17. Tavares MBR. *Estudo da produção de enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger**.
18. [Dissertação] - Campina Grande: UFCG; 2009.
19. Sighania RR, Sukumaran RK, Patel AK, 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*. 2010 (46): 541-9.
20. ZANCHETTA, A. *Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica* [Dissertação]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2012.
21. Castro AM, Pereira Jr N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*; 2010;(33): 181- 8.
22. Nunes JS, Delgado RFA, Lima CA, Lins SAS, Vital AFM, Coelho, GD. Estudo preliminar sobre o perfil de produção de celulase (fpase) durante um processo de compostagem. *II Simpósio Micológico do Semiárido*, 2017.
23. ANVISA. *Detecção e Identificação dos fungos de Importância Médica*. 2004.

24. Moreira-neto, SL. Caracterização de lacase de *Peniophora cinérea* e estudo do potencial e aplicação biotecnológica. 2012. 168 p. il. [Tese] – Lorena: USP; 2012.
25. Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959; (31):3; 426-8.
26. Wilmar CL. Taxonomia de fungos anamórficos – I. Hefomicetos. *Micologia avançada*. 3ª ed. Passo Fundo: Editora: Revisão anual de patologia e plantas; 2011
27. Nunes JS, Delgado RFA, Sousa EM, Coelho GD. A compostagem como fonte de micro-organismos com potencial biotecnológico. *ANAIS ENAMA*: 2014.
28. Amorim BC. Estudo da produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma sp.* [Dissertação]. Campina Grande:UFCG; 2010.
29. Oliveira JSD, Souza FPF, Macedo GR, Santos ES, Assis CF. Produção de enzimas pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*) em FSS utilizando resíduo de coco como substrato. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2015.
30. Seckler R, Jaenicke R. Protein folding and protein refolding. 1992. *The FASEB Journal*.(6): 2545-52.