

## OBTENÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS CULTIVADOS EM SISTEMA SUBMERSO COM RESÍDUO DE PUPUNHA

Hayssa Carolini Alamar Nunes<sup>1</sup>, Juliane Andressa Chicatto<sup>2</sup>, Elis Ganzer<sup>3</sup>,  
Cristiane Vieira Helm<sup>4</sup> e Lorena Benathar Ballod Tavares<sup>5</sup>

**Resumo:** *Biomassas lignocelulósicas como os resíduos agroindustriais e florestais podem ser utilizados como substrato na otimização do processo de obtenção de celulases por fungos filamentosos. Neste contexto o objetivo deste estudo foi a produção de celulases em meio contendo bairras do processamento de pupunha empregando um planejamento fatorial com diferentes níveis de pH, concentração de farinha de soja e de solução de sais minerais em sistema submerso contendo Ganoderma lucidum e Trichoderma sp isoladamente e em cultivo misto (co-cultura). Também foram testados três métodos de concentração de proteínas dos extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos e suas respectivas análises moleculares. O cultivo isolado de G. lucidum apresentou as maiores atividades enzimáticas (0,057 UI.mL<sup>-1</sup> - endoglucanase, 0,054 UI.mL<sup>-1</sup> - exoglucanase, 0,500 UI.mL<sup>-1</sup> - β-glicosidase). O pH foi a variável significativa para os cultivos isolados, enquanto que a farinha de soja e a solução de sais foram significativas na cultura mista. Dos métodos de concentração testados o sistema por estufa a vácuo aumentou a atividade de celulases e a concentração de proteínas, cuja massa molecular foi de 62 kDa para as amostras com maiores atividades enzimáticas.*

**Palavras-chave:** Atividade enzimática. *Ganoderma lucidum*. *Trichoderma sp*.

### 1 Introdução

A produção e utilização de enzimas de origem microbiana constituem um dos principais setores da indústria biotecnológica (BORTOLAZZO, 2011). Dentre essas enzimas pode-se citar a lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacases e as celulases. Dessas enzimas, as celulases se destacam devido a sua ampla aplicação em diversos setores econômicos como na indústria de papel, indústria têxtil e alimentícia e no setor energético. Nesse último é devido a sua ação na quebra da celulose para liberação de glicose na etapa de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas para produção do etanol de segunda geração (ALMEIDA, 2012).

A atuação das celulases na etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica é fundamental, devido à obtenção de glicose a partir da celulose presente nessa biomassa. Para obter a glicose é necessária a atuação sinérgica de um complexo de celulases composto de endoglucanases (EC 3.2.1.4);

exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β-glicosidase (E.C. 3.2.1.21) (ARANTES; SADDLER, 2010). O uso desse complexo representa 50% do custo total da hidrólise e cerca de 40% do custo total da produção do etanol de segunda geração (2G), limitando a produção deste combustível em larga escala (BORTOLAZZO, 2011; BALAT, 2011; DESWA; KHASA; KUHAD, 2011). Com o objetivo de diminuir o custo de produção dessas enzimas estudos têm sido realizados com fungos produtores de celulases em cultivos contendo material celulósico que expressam as três celulases de interesse para a hidrólise enzimática (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010). Todavia, os componentes utilizados no cultivo dos fungos também acrescentam elevado custo no processo. Portanto, utilizar resíduos lignocelulósicos agroindustriais e florestais como agente de indução da produção enzimática pode representar uma opção mais econômica, com melhor logística e ser ambientalmente adequada. A utilização desses resíduos diminui o custo relacionado

<sup>1</sup> E-mail: yssa.nunes@gmail.com

<sup>2</sup> E-mail: julianechicatto@hotmail.com

<sup>3</sup> E-mail: elisganzer@msn.com

<sup>4</sup> E-mail: cristiane.helm@embrapa.br

<sup>5</sup> E-mail: lorena@furb.br

ao material usado no processo, reduz o problema causado pelo acúmulo e agrega valor aos mesmos (SCHEUFELE, 2012). O resíduo de bainhas de pupunha (*Bactris gasipaes*) é um material com potencial para indução da produção enzimática uma vez que apresenta as características químicas adequadas, dentre elas a presença de celulose. Além disso, mostra ampla disponibilidade já que desde a década de 70 a produção de palmito da pupunha no Brasil tem aumentado, com conseqüente aumento na geração de resíduos. Para a obtenção do palmito de pupunha, 80 a 90% da massa bruta da pupunheira torna-se resíduo (PUPO, 2012).

Outra maneira para diminuir o custo de obtenção das celulasas são as alterações no processo de produção que pode ser efetivado com a modificação de parâmetros de processo e de cultivo. Esses parâmetros, tais como o pH, a fonte de carbono e de nitrogênio, a concentração de inóculo, a agitação, a temperatura, entre outros, possuem efeito sobre a produção das enzimas (BORTOLAZZO, 2011; SHAHRIARINOUR et al., 2011; BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010). A espécie ou espécies de microrganismos utilizados no processo também influenciam na atividade enzimática (ZANCHETTA, 2012; SALES et al., 2011). Outro fator relacionado com a atividade é a concentração do extrato enzimático, que está relacionada com o método de concentração (SANTOS, 2011). Neste contexto, este estudo teve como objetivo otimizar a produção de celulasas empregando *Ganoderma lucidum*, um fungo basidiomiceto ligninolítico, além do fungo *Trichoderma* sp, um ascomiceto amplamente relatado como produtor de celulasas. Nesse estudo esses fungos também foram cultivados como cultura mista em cultivo submerso usando o resíduo de pupunha como indutor da produção de celulasas com auxílio de um planejamento fatorial. Os melhores extratos obtidos foram concentrados por três diferentes procedimentos.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Microrganismos

Os isolados *Trichoderma* sp (TR11-LEB) e *Ganoderma lucidum* (EF 35) foram obtidos da micoteca do Laboratório de

Trabalho de Tecnologia de Produtos Não Madeireiros da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Florestas (Colombo, PR, Brasil). Estes foram cultivados e mantidos em placas de Petri contendo Agar Dextrose batata (PDA) a 25° ± 1°C na ausência de luz e armazenados a 4°C.

### 2.2 Cultivo submerso e determinação enzimática

Foi empregado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo em triplicata com três variáveis em dois níveis para obtenção dos diferentes meios em cultivo submerso. As variáveis testadas foram, a concentração de solução de sais (0 e 100%), de soja (0 e 12 g.L<sup>-1</sup>) e valor de pH (3 e 8) (Tabela 1). O planejamento foi realizado com *Trichoderma* sp e *Ganoderma lucidum* isolados e como cultura mista. A cada meio foram adicionados 3,6 g.L<sup>-1</sup> de farelo de mandioca e 30 g.L<sup>-1</sup> de resíduo de pupunha (granulometria de 0,5 a 2,4 cm), representando a fonte de carbono, sendo o resíduo de pupunha também utilizado como indutor de celulasas. A solução de sais foi composta de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,87 g.L<sup>-1</sup>); MgHPO<sub>4</sub> (0,40 g.L<sup>-1</sup>); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,37 g.L<sup>-1</sup>); FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (10,00 mg.L<sup>-1</sup>); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (7,20 mg.L<sup>-1</sup>); ZnCl<sub>2</sub> (4,00 mg.L<sup>-1</sup>); CuSO<sub>4</sub> (1 mg.L<sup>-1</sup>) quando corresponde a 100% da solução e somente água para 0% desta solução (HUMFELD; SUGIHARA, 1949).

Os ensaios foram realizados em frascos cilíndricos de 500 mL esterilizados com 200 mL de solução de sais ou água para 0% de solução de sais. Para cada ensaio foram inoculados 6 “plugs” do respectivo fungo e 3 “plugs” de cada fungo para a cultura mista. Os frascos foram incubados por nove dias a 25 °C, e após esse período foi determinada a atividade das celulasas a partir dos extratos enzimáticos obtidos pela filtração e centrifugação dos meios e mantidos a -20°C.

As atividades de endoglucanase (CMCase) e exoglucanase (avicelase) foram determinadas segundo Tanaka et al. (1981) quando 0,1 mL do extrato e 1 mL de solução de carboximetilcelulase (0,44%) para endoglucanase e de avicel 1,1% foram mantidas a 50 °C por 60 minutos. A concentração de açúcares redutores foi determinada segundo Miller (1959) com uso do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico).

**REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)**  
**v.17, n. 1, p. 16-26, jan./jun. 2015**

**Tabela 1 - Matriz dos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo do cultivo submerso com os valores absolutos das variáveis utilizadas para os cultivos isolados e em cultura mista de *Ganoderma lucidum* e *Trichoderma* sp.**

Ensaio	Soja (g.L <sup>-1</sup> )	Soluções de sais (%)	pH inicial
1	-1 (0)	-1 (0,0)	-1 (3,0)
2	+1 (12)	-1 (0,0)	-1 (3,0)
3	-1 (0)	+1 (100)	-1 (3,0)
4	+1 (12)	+1 (100)	-1(3,0)
5	-1 (0)	-1 (0,0)	+1 (8,0)
6	+1 (12)	-1 (0,0)	+1 (8,0)
7	-1 (0)	+1 (100)	+1 (8,0)
8	+1 (12)	+1 (100)	+1 (8,0)

Fonte: Autoras (2015)

A atividade de  $\beta$ - glicosidase (Beta) foi determinada a partir de 1 mL de solução de celobiose a 0,53% e 1 mL do extrato enzimático mantidos a 50°C por 30 minutos. Em seguida a glicose foi quantificada usando o kit GOD-POD da Bioliquid®. As atividades enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, onde uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor (glicose), por minuto, a 50°C. Os resultados foram avaliados por meio da verificação dos efeitos significativos dos fatores ( $p \leq 0,05$ ) pela análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e a metodologia de superfície de resposta.

### 2.3 Concentração de extrato

Os extratos com maiores atividades de celulasas em cada tipo de cultivo (isolado e cultura mista) foram submetidos aos métodos de concentração por precipitação de sulfato de amônio (60, 70 e 80%) a 30 mL de extrato bruto, sendo essa solução mantida *overnight* e posteriormente centrifugada a 4500 rpm a 7°C por 10 minutos e por fim ressuspensa em 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5. O método seguinte foi a concentração de 10 mL do extrato bruto em estufa a vácuo a 50°  $\pm$  2°C com bomba a vácuo efetuando pressão negativa de 700 mm de mercúrio até atingir 1mL. Para a última metodologia foi adicionado ao extrato bruto uma solução tampão acetato de amônio 0,1M diluída em metanol (4 tampão: 1 extrato), a qual permaneceu *overnight* a -20°C. Posteriormente, o precipitado formado

passou por banhos de metanol e acetona a 80%, alternadamente e intercalados por um período de repouso das soluções de uma hora a -20°C. Por fim, o precipitado formado após os banhos permaneceu a -4°C por dois dias, sendo em seguida ressuspensa com tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. As proteínas totais foram determinadas antes e depois as concentrações, segundo Bradford (1976).

### 2.4 Determinação da massa molecular

A massa molecular das amostras com maiores e menores atividades enzimática de cada tipo de cultivo foi determinada por eletroforese SDS-PAGE para possibilitar a comparação entre as proteínas presentes e ausentes. Todavia, somente aquelas que atingiram no mínimo 5  $\mu$ g de proteínas em uma alíquota máxima de 44  $\mu$ L foram aplicadas nos géis. Juntamente a essas amostras, um controle do respectivo tratamento e o padrão com massas conhecidas foram aplicados no gel. A eletroforese foi conduzida com amperagem constante de 15 mA por aproximadamente 3 horas usando um gel de acrilamida 10%. Por fim os géis foram corados com Nitrato de prata.

## 3 Resultados e discussão

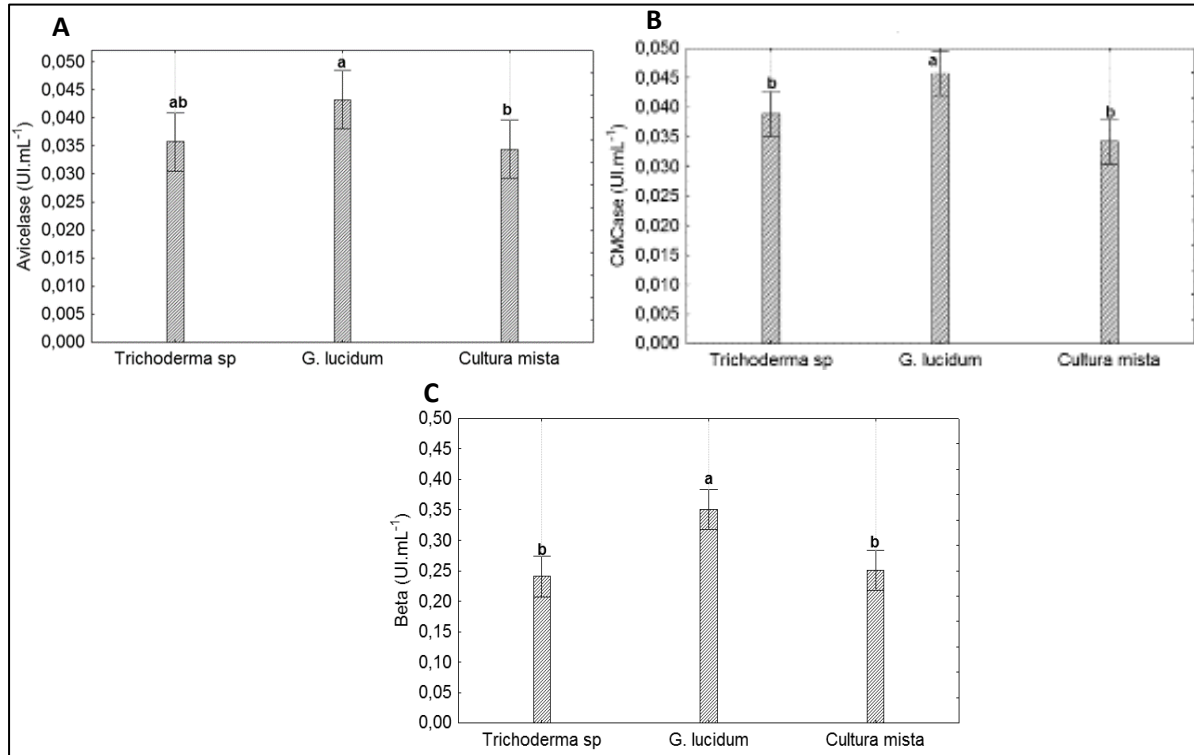
### 3.1 Influência das variáveis na produção enzimática

Conforme a Figura 1 o cultivo isolado de *G. lucidum* apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as

enzimas estudadas. O cultivo isolado de *Trichoderma* sp apresentou atividades

superiores à cultura mista, porém sem diferença estatisticamente significativa.

**Figura 1 - Médias da atividade de Avicelase (A), CMCCase (B) e  $\beta$ - glicosidase (C) dos cultivos isolados e em cultura mista de *Ganoderma lucidum* e *Trichoderma* sp.**



Colunas iguais com mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Autoras (2015)

Na cultura mista foi observado o efeito antagônico citado por Albert et al., (2011) no qual um fungo neutraliza ou anula os efeitos do outro. Comportamento similar foi observado por Sales et al. (2011) em estudo com *Aspergillus phoenicis* e *A. aculeatus* no qual a cultura mista desses fungos teve cerca de dez vezes menos atividade que os melhores ensaios das culturas isoladas. Esse contexto também pode estar relacionado a atividade antifúngica do *G. lucidum*, (VILLAMIL, 2010) decorrente da presença da proteína denominada ganodermina encontrada neste fungo a qual pode ter suprimido a atividade do *Trichoderma* sp. na cultura mista (WANG; NG, 2006).

A  $\beta$ -glicosidase foi a única enzima que sofreu influência na cultura mista, sendo a concentração de solução de sais e a concentração de farinha de soja significativas na atividade ( $p= 0,036$  e  $p= 0,037$ , respectivamente). As maiores atividades ocorreram em ensaios com menores

concentrações de farinha de soja e porcentagem de solução de sais (Figura 2).

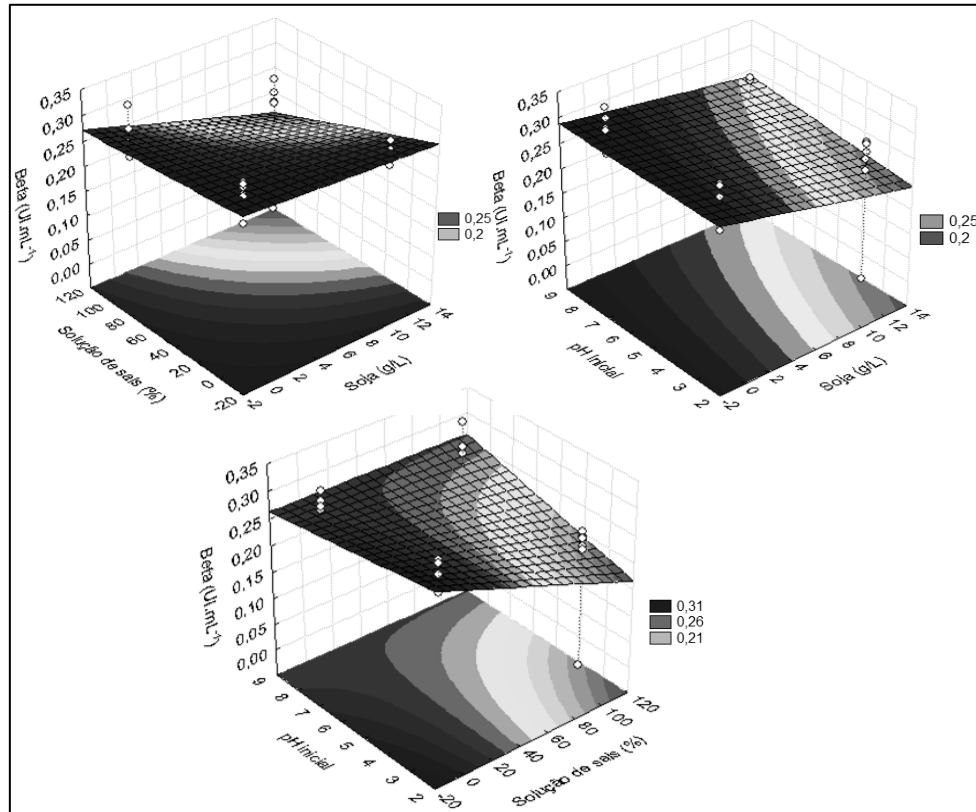
Os melhores resultados com menor concentração de sais podem estar relacionados com a melhor utilização dos nutrientes da pupunha, mandioca e soja pelo *G. lucidum* presente na cultura mista, sendo ele altamente adaptado para degradar e crescer em materiais lignocelulósicos devido a sua produção de enzimas holocelulósicas e oxidases (SITARZ, 2013).

Referente à concentração de nitrogênio do meio, El-Metwally (2014) constatou que o extrato de levedura e a peptona induziram a produção de maior concentração de biomassa com menores atividades de celulasas. A farinha de soja utilizada nesse estudo como fonte de nitrogênio apresentou resposta similar. Valores de pH mais elevados em combinação com maiores concentrações de nitrogênio também acarretaram aumento da biomassa com redução na produção de celulasas (MATKAR et al., 2013).

As atividades de CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram influenciadas no cultivo isolado de *Trichoderma* sp, sendo o pH a única variável significativa ( $p= 0,001$  para

CMCase e  $p= 0,03$  para Beta), na qual os menores valores proporcionaram maiores atividades (Figura 3).

Figura 2 - Superfícies de resposta referente à atividade de Beta ( $\beta$ - glicosidase) na cultura mista em cultivo submersa



Fonte: Autoras (2015)

No cultivo isolado de *G. lucidum* novamente as atividades de CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram influenciadas pelo pH ( $p= 0,012$  para CMCase e  $p= 0,002$  para  $\beta$ -glicosidase). Para a  $\beta$ -glicosidase a interação da solução de sais com o pH também foi significativa ( $p=0,010$ ). As maiores atividades de CMCase foram alcançadas em pH ácidos (3,0). Para  $\beta$ -glicosidase as maiores atividades foram observadas em ensaios com pH baixos, maior concentração de solução de sais independente da concentração de farinha de soja (Figura 4).

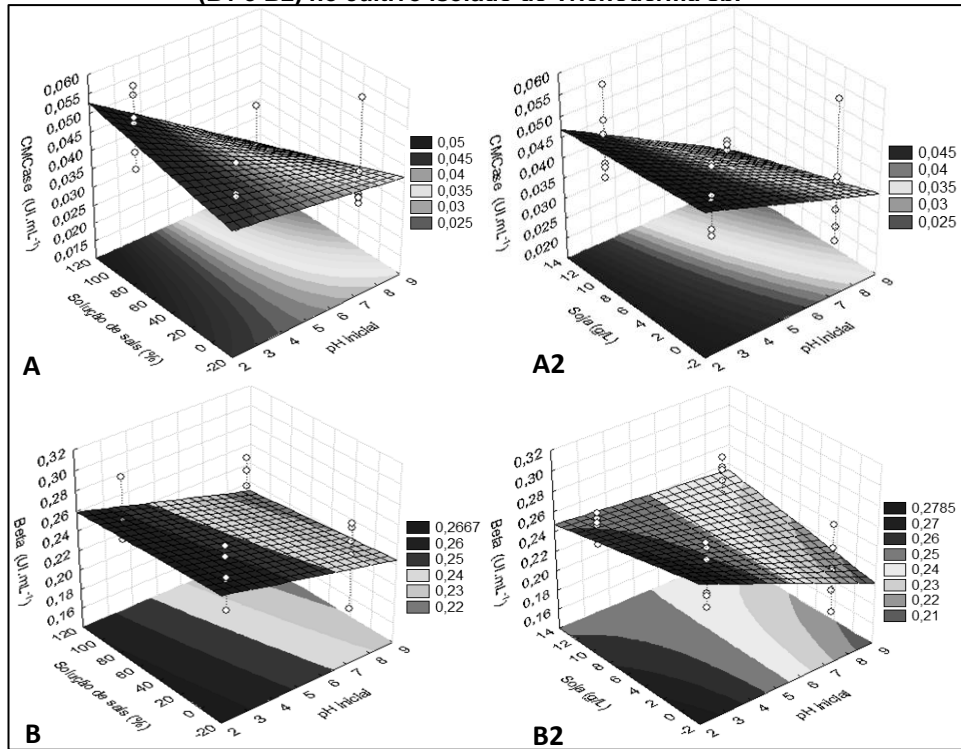
Rodriguez-Zuniga et al. (2011) utilizando os meios de sais de Mandels e Weber, também observaram efeito positivo na produção de celulases a exemplo do cultivo com *G. lucidum*.

Assim como neste estudo, Das et al. (2012) apontam que a maior atividade de CMCase ocorre em torno de pH 3 a 5. O mesmo foi descrito por Dave et al. (2013) e

Ghori et al. (2011) que observaram maiores atividades de CMCase e  $\beta$ -glicosidase nesta faixa de pH. Valores mais elevados de pH podem provocar mudanças estruturais do local de ligação das enzimas, diminuindo as atividades enzimáticas (DAS et al., 2012).

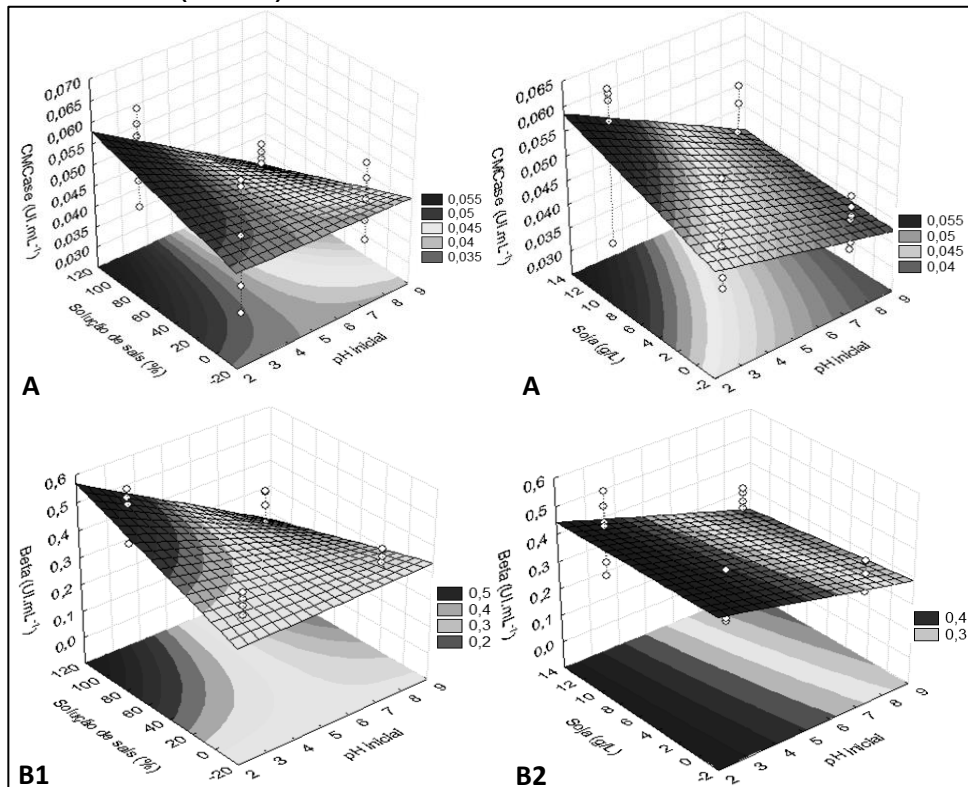
Os ensaios com pH 8,0 apresentaram redução de valor, após o final do cultivo para índices entre 5,0 e 6,0, sendo estes similares ao estudo de Vieira et al. (2008) com fungos degradadores de material lignocelulósico. Esta condição pode prejudicar o sistema de cultivo devido ao aumento da ocorrência de autólise, pois o pH possui efeito direto sobre a captação de nutrientes presente no meio de cultivo. O controle desta variável é essencial para reduzir a autólise, bem como para manter a multiplicação celular e a produção de celulases (RODRIGUEZ-GOMEZ; HOBLEY, 2013).

Figura 3 - Superfícies de resposta referente à atividade de CMCase (A1 e A2) e  $\beta$ - glicosidase (Beta) (B1 e B2) no cultivo isolado de *Trichoderma* sp.



Fonte: Autoras (2015)

Figura 4 - Superfícies de resposta referente à atividade de CMCase (A1 e A2) e  $\beta$ - glicosidase (Beta) (B1 e B2) no cultivo isolado de *Ganoderma lucidum*.



Fonte: Autoras (2015)

### 3.2 Concentração enzimática e determinação da massa molecular

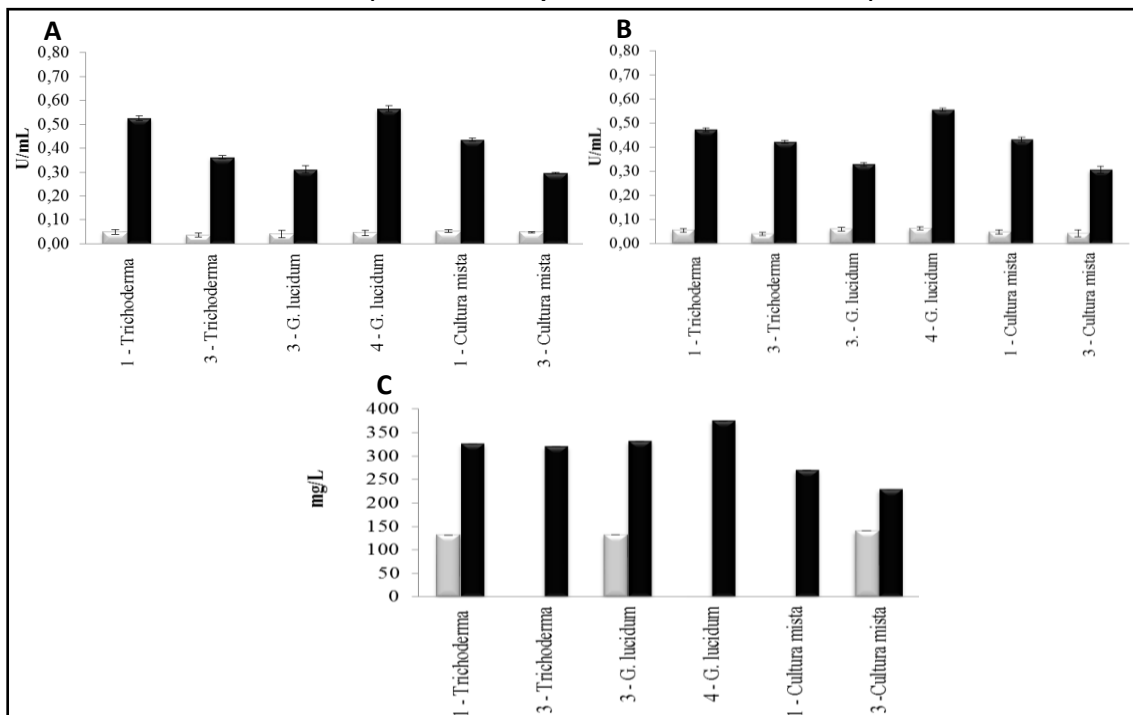
De modo geral as concentrações de proteína promovidas por banhos e por precipitação com sulfato de amônio diminuíram a atividade das celulasas (Avicelase e CMCase) e não apresentaram um padrão na quantidade de proteínas totais obtidas.

Na precipitação com sulfato de amônio a diminuição da atividade enzimática pode estar relacionada à desidratação das proteínas e desnaturação das enzimas causada pela forte interação das moléculas de água com os íons, oriunda da dissociação do sal. Por sua vez a diminuição da atividade enzimática observada na concentração por banhos de metanol e acetona pode estar relacionada com a desestabilização da enzima (inativação), oriunda das modificações na conformação

das estruturas terciárias e secundárias, decorrentes da penetração desses solventes no interior das proteínas (LIMA; ANGNES, 1999). Todavia, para esses dois métodos, alguns ensaios apresentaram diminuição de atividade das celulasas com aumento na concentração de proteínas totais. Portanto, esses métodos podem ter beneficiado outras enzimas e não as celulasas.

A concentração por estufa a vácuo foi a única a apresentar aumento na quantidade de proteínas totais e na atividade das celulasas para todos os ensaios e tipos de cultivos empregados (Figura 5). Hargreaves (2008) usando rotavapor, um procedimento semelhante a estufa a vácuo, concentrou o extrato em cerca de 20 vezes, monitorando a temperatura do banho-maria e obteve um produto em que as enzimas não foram drasticamente afetadas durante o processo.

**Figura 5 - Atividade de Avicelase (A), CMCase (B) e quantidade de proteínas totais (C) dos extratos brutos (■) e concentrados por estufa a vácuo (■) dos melhores extratos de cada um dos três cultivos (*Trichoderma* sp, *G. lucidum* e cultura mista)**



Fonte: Autoras (2015)

A partir da concentração dos extratos foi possível realizar a determinação da massa molecular das proteínas por eletroforese SDS-PAGE. Seus respectivos ensaios controles não apresentaram nenhuma banda aparente. Nos ensaios com maiores atividades enzimáticas, os cultivos

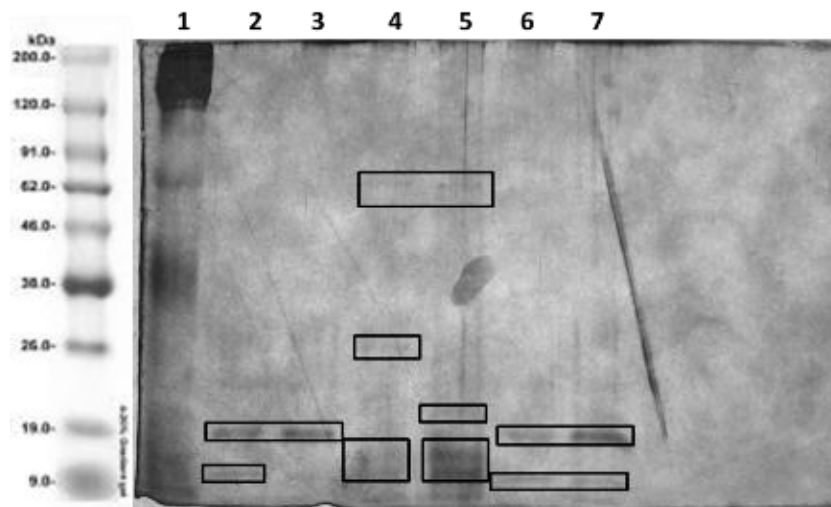
de *G. lucidum* (faixas 4 e 5 da Figura 6) apresentaram proteínas com massas moleculares de 62 kDa, 26 kDa (amostra 3) e 22 kDa (amostra 4) representando Avicelases e CMCases (RODRIGUEZ-GOMEZ; HOBLEY, 2013). Contudo, por esse método os cultivos isolados de *Trichoderma*

sp e cultura mista não apresentaram proteínas com massa molecular similar as celulases.

A respeito dos ensaios com menor atividade enzimática, somente um ensaio da cultura mista apresentou concentração de proteína suficiente para ser aplicado no gel de eletroforese. Este ensaio apresenta quatro massas moleculares referentes à CMCase (92 kDa, 45 a 46 kDa, 36 a 38 kDa e 26 a 30 kDa) (PEREIRA, 2013;

RODRIGUEZ-GOMEZ; HOBLEY, 2013) e uma massa molecular de 26 a 30 kDa indicando a presença de Avicelase e  $\beta$ -glicosidase (DEVI, KUMAR, 2012; RODRIGUEZ-GOMEZ; HOBLEY, 2013) (Figura 7). Comparando os géis pode-se levantar a hipótese que a proteína de massa molecular 62 kDa presente nos ensaios com maiores atividades de celulases está relacionada a maior atividade enzimática.

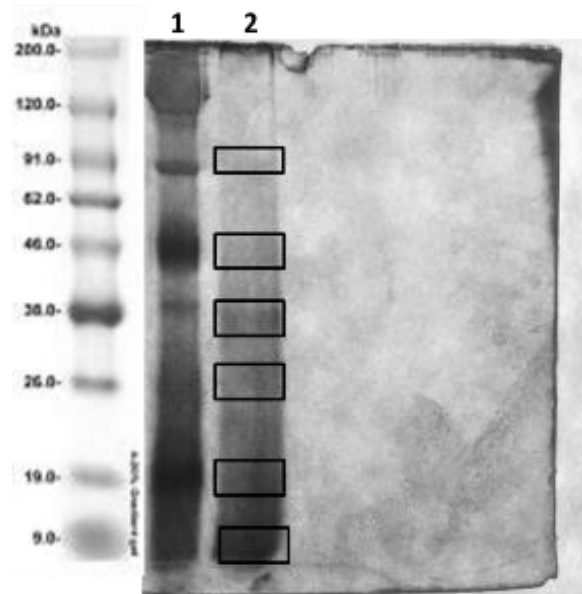
**Figura 6 - Gel de eletroforese SDS-PAGE das amostras com maiores atividades de celulases dos cultivos isolados e em cultura mista de *Ganoderma lucidum* e *Trichoderma* sp. em sistema submerso**



Faixa 1 – Padrão; Faixas 2 e 3 - amostras 1 e 3 (cultivo em *Trichoderma* sp); Faixas 4 e 5 – amostras 3 e 4 (cultivo em *G. lucidum*); Faixas 6 e 7 – amostras 1 e 3 (cultura mista).

Fonte: Autoras (2015)

**Figura 7 - Gel de eletroforese SDS-PAGE da amostra com menor atividade de celulase da cultura mista do cultivo em sistema submerso**



Faixa 1 – Padrão; Faixa 2 – amostra 6 (cultura mista).

Fonte: Autoras (2015)



#### 4 Conclusão

O cultivo isolado de *G. lucidum* mostrou melhor desempenho para a produção de celulases, principalmente em pH mais ácido e com concentração por estufa a vácuo. No entanto, mesmo utilizando recursos de menor custo para a produção enzimática, os dados obtidos dos extratos concentrados em estufa a vácuo

ainda apresentam atividades inferiores a das enzimas comerciais. Os fungos *G. lucidum* e *Trichoderma* sp em cultivo de co-cultura, não mostraram resultados efetivos para o aumento da atividade enzimática. Da mesma forma, a linhagem de *Trichoderma* sp não mostrou resultados competitivos nesse estudo de otimização do processo de obtenção de celulases.

---

#### 5 Cellulase Obtained by Fungi Cultivated in Submerged System with Peach Palm waste

**Abstract:** Lignocellulosic biomass of residues from agro-forest industries can be used as a substrate in the optimization of process for cellulase production by filamentous fungi. In this context the aim of this study was the cellulase production using mono and co-cultures of fungal strains with *Ganoderma lucidum* and *Trichoderma* sp in submerged system with sheaths of peach palm, employing a factorial design with different levels of pH, concentration of soy flour and minerals solution. In addition, were analyzed three methods of protein concentration of the enzyme extract from the cultivation of fungi and their respective molecular analyzes. *Ganoderma lucidum* shows the highest levels of enzymatic activity (0,057 UI.mL<sup>-1</sup> - endoglucanase, 0,054 UI.mL<sup>-1</sup> - exoglucanase, 0,500 UI.mL<sup>-1</sup> -  $\beta$ -glucosidase). The pH was a significant variable for monocultures, whereas there were significant effects of soya flour and salt solutions for co-culture. The method to concentrate the enzymatic extracts by vacuum oven system increased the cellulase activity and protein concentration. The molecular mass protein was 62 kDa to samples with highest enzyme activities.

**Keywords:** Enzyme activity; *Ganoderma lucidum*; *Trichoderma* sp.

---

#### 6 Referências

ALBERT, S; CHAUHAN, D; PANDYA, B; PADHIA, A. Screening of *Trichoderma* Spp. As potential fungal Partner in Co-culturing with White Rot Fungi for Efficient Bio-Pulping. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 6, p. 95-101, 2011.

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos.** 2012. 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ARANTES, V. SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.4, p.1-11, 2010.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. **Energy Conv. Manag.**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of protein utilizing the Principle of protein Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRIJWANI, K; OBEROI, H. S; VADLANI, P.V. Production of cellulolytic enzyme system in mixedculture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochem**;v. 45, p. 120-128, 2010.

DAS, A; GHOSH, U; MOHAPATRA, P. K. D; PATI, B. R; MONDAL, K. C. Study on thermodynamics and adsorption kinetics of purified endoglucanase (cmc) from *Penicillium notatum* ncim no-923 produced under mixed solid-state fermentation of waste cabbage and bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1103 – 1111, 2012.

DAVE, B. R; SUDHIR, A. P; PARMAR, P; PATHAK, S; RAYKUNDALIYA, D; SUBRAMANIAN, R. B. Enhancement of cellulose activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: Optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 108 – 115, 2013.

REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)  
v.17, n. 1, p. 16-26, jan./jun. 2015

- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp.RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 6065–6072, 2011.
- DEVI, M. C; KUMAR, M. S. Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, p. 120 – 128, 2012.
- EL-METWALLY, M, M. Statistical response to different Fermentation Parameters in rapid Production of cellulase by *Penicillium purpugenium* MA1 in solid state fermentation of rice Hulls. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, p. 221 – 231, 2014.
- GHORI, M. I; AHMED, S; MALANA, M. A; JAMIL, A. Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 5878 – 5886, 2011.
- HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da Floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** 2008. 88f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- HUMFELD, H., SUGIHARA, T.F. Mushroom mycelium production by submerged propagation. **Food Technology, Chicago**, v.3, p. 355-356, 1949.
- LIMA, A. W. O; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química nova**, v. 22, p. 229-245, 1999.
- MATKAR, K; CHAPLA, D; DIVECHA, J; NIGHOJKAR, A; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 24 – 33, 2013.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Biochemistry**, v. 31, p.426 – 428, 1959.
- PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** 2013. 101f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). - Universidade Federal de Goiás, 2013.
- PUPO, H. F.F. **Painéis alternativos produzidos a partir de resíduos termoplásticos e da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth).** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP, 2012.
- RODRIGUEZ-GOMEZ, D; HOBLEY, T. J. Is an organic nitrogen source needed for cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30? **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 29, p. 2157 – 2165, 2013.
- RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F; FARINAS, C. S; NETO, V. B; COURI, S; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912 – 919, 2011.
- SALES, M. R; MOURA, R. B; PORTO, T. S; MACEDO, G. R; PORTO, A. L. F. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 917 – 924, 2011.
- SANTOS, A. S. **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante.** 2011. 94f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.
- SCHUEFELE, F. B. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas.** 2012. 119f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade estadual do oeste do Paraná, 2012.
- SHAHRIARINOUR, M; WAHAB, M. N. B; MOHAMAD, R; MUSTAFA, S; ARIFF, A. B. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 7459 – 7467, 2011.
- SITARZ, A. K; MIKKELSEN, J. D; HOJRUP, P; MEYER, A. S. Identification of a laccase from *Ganoderma lucidum* CBS 229.93 having potential for enhancing cellulase catalyzed lignocellulose degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 378 – 385, 2013.
- TANAKA, T.; TANIGUCHI, M. A; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p. 177-183, 1981.
- VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M; TAVARES, L. B. B.; PAULERT, R.; SMÂNIA JR, A. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont.. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 561-568, 2008.

REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)  
v.17, n. 1, p. 16-26, jan./jun. 2015

VILLAMIL, K, J. R. **Evaluación de metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos humanos y animales de *Aspergillus* spp. y dermatófitos.** 2010. 40f. Trabajo de grado (título de microbióloga industrial) –Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2010.

WANG, H; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides, v. 27, p. 27 – 30**, 2006.

ZANCHETTA, A. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica.**

2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2012.

## 7 Agradecimentos

À CAPES pela bolsa de mestrado e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade. À Embrapa Florestas pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da FURB/Blumenau (SC) pela infraestrutura disponibilizada.