

## PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus* sp. FSDE16 UTILIZANDO FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATO: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Amanda Letícia de Carvalho Cardoso<sup>1</sup>  
Felipe Augusto Santos<sup>1</sup>  
Sharline Florentino de Melo Santos<sup>2</sup>

### RESUMO

A reutilização e reciclagem de resíduos agroindustriais podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo. Resíduos agroindustriais, em sua maioria, são materiais lignocelulósicos e pesquisas vem sendo desenvolvidas para a reutilização destes com o intuito de minimizar os impactos ambientais e ao mesmo tempo como forma de reaproveitamento. As celulases são um grupo de enzimas que atuam em sinergismo, levando à degradação da celulose em glicose por meio da clivagem das ligações O-glicosídicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulases pelo fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16, isolado do solo de uma indústria sucroalcooleira, por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como meio de cultivo, sendo avaliadas três fontes de nitrogênio: solução de extrato de levedura 1%(m/m<sub>H2O</sub>), solução de sulfato de amônio 1%(m/m<sub>H2O</sub>) e solução de Mandels e Weber (1969). Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 1000 mL contendo 100 g de meio sólido. Em seguida, foram esterilizados e foi feita a inoculação com concentração de 10<sup>7</sup> esporos/g de substrato. Posteriormente, os cultivos foram incubados durante 7 dias à temperatura de 38 °C onde, a cada 24 horas, uma amostra foi retirada para análise de pH, umidade e atividade enzimática. Os melhores resultados de atividade de CMCcase para avaliação das fontes de nitrogênio foi para o cultivo realizado com sulfato de amônio, com valor de 6,28 U/g em 168 horas de cultivo.

**Palavras-chave:** Enzimas, Cultivo em estado sólido, Fungo.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, é comum a existência de problemas de degradação ambiental, e os recursos do solo que são essenciais para sobrevivência dos seres vivos, estão cada vez mais degradados. Dentre estes problemas, têm-se a estocagem de resíduos agroindustriais.

As tendências mundiais avançam cada vez no sentido da utilização de processos biotecnológicos para obtenção de combustíveis ao invés da utilização dos processos convencionais. A principal fonte de combustível utilizada é oriunda dos derivados de

<sup>1</sup> Mestranda do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, [amanda\\_leticia03@hotmail.com](mailto:amanda_leticia03@hotmail.com);

<sup>1</sup> Mestrando do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, [felipe1830@gmail.com](mailto:felipe1830@gmail.com);

<sup>2</sup> Professor Orientador: Doutora, Departamento de Engenharia Química – UFPB, [sharlinefm@hotmail.com](mailto:sharlinefm@hotmail.com).

petróleo, porém existem inúmeras fontes renováveis possíveis a serem exploradas, como os resíduos provenientes da agroindústria (INÁCIO, 2016).

Os resíduos agroindustriais em sua grande maioria são materiais lignocelulósicos. A biomassa lignocelulósica possui em sua composição três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina (NISHIDA et al, 2013). Existem enzimas capazes de hidrolisar a celulose e a hemicelulose presente nesta biomassa.

O farelo de trigo é um resíduo da produção da farinha de trigo, produto bastante consumido no Brasil. Este resíduo se caracteriza como um material lignocelulósico por possuir em sua composição cerca de 31% de celulose, 26% de hemicelulose, 24% de lignina e 7% de cinzas (BAKKER, 2017). Se tornando assim, uma matéria-prima interessante como fonte de carbono e energia, bem como um ótimo indutor para a produção enzimática.

As celulasas são um grupo de enzimas que hidrolisam a celulose natural em carboidratos menores. As enzimas do complexo celulolítico são classificadas em endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, de acordo com o modo de ação (COELHO et al., 2018).

As aplicações das celulasas no mercado industrial estão ligadas com a biotecnologia, em conjunto com a microbiologia, genética, bioquímica e engenharia química. São aplicadas em diversos segmentos, como a indústria têxtil, papel e celulose, produção de bebidas, ração animal, entre outras (ORLANDELLI et al., 2012). Porém, a aplicação destas enzimas na produção de etanol de segunda geração vem ganhando cada vez mais foco nas pesquisas desenvolvidas.

O etanol de segunda geração pode ser gerado a partir da fermentação de açúcares liberados na hidrólise da biomassa lignocelulósica, se apresentando como uma tecnologia promissora, pois além da matéria-prima do processo ser extremamente abundante, pode também contribuir com a redução dos problemas ambientais (MARRA et al., 2015).

Para a produção de enzimas podem ser utilizados dois tipos de cultivo: cultivo em estado sólido (CES) ou cultivo submerso (CS), sendo o CES a técnica mais utilizada. O CES se caracteriza pelo crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência ou baixo teor de água livre (BOMTEMPO et al., 2017). Este processo apresenta vantagens em relação a outras tecnologias, como: maior produtividade de extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas em relação às variações de temperatura e pH (RÊGO et al., 2019).

Neste sentido, o estudo das condições de cultivo se faz necessário, pois estas definem a produtividade enzimática do cultivo em estado sólido assim como o microrganismo utilizado. Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de celulases pelo fungo filamentosso *Aspergillus* sp. FSDE16 por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, sendo avaliadas três fontes de nitrogênio: solução de extrato de levedura 1%(m/m<sub>H2O</sub>), solução de sulfato de amônio 1%(m/m<sub>H2O</sub>) e solução de Mandels e Weber (1969).

## METODOLOGIA

**Microrganismo:** Utilizou-se o fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16. Este fungo foi obtido a partir do isolamento do solo de descanso da Usina Japungu Agroindustrial, localizada no município de Santa Rita, estado da Paraíba. Este microrganismo foi previamente selecionado como produtor de celulases pela medida do halo de degradação em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono (CARVALHO-GONÇALVES, 2017).

**Inóculo:** Foi feito o repique do fungo em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Em seguida, as placas foram incubadas durante 7 dias à 37 °C. Após o crescimento dos fungos, foi feita a suspensão dos esporos em água destilada estéril. Para obtenção do volume de suspensão com a concentração desejada de 10<sup>7</sup> esporos/g, primeiramente foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer no microscópio eletrônico, obtida pela Equação 1. Posteriormente o volume de inóculo foi obtido pela Equação 2.

$$\text{Concentração (esporo/mL)} = \Sigma * 5.10^4 * \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Onde:

$\Sigma$ : número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro)

$$\text{Volume(inóculo)} = \frac{\text{concentração(esporo/grama)} * \text{massa do meio (g)}}{\text{concentração (esporo/mL)}} \quad (2)$$

O fungo foi cultivado no meio contendo farelo de trigo como substrato. Para o ajuste da umidade foram analisadas três fontes de nitrogênio: solução de extrato de levedura 1%

(m/m<sub>H2O</sub>), solução de sulfato de amônio 1% (m/m<sub>H2O</sub>) e solução de Mandels e Weber (1969), com concentrações conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Meio de Mandels e Weber (1969)

Reagentes	Quantidade (g/L)
Ureia	0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	0,3
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,3
Peptona	0,75
Extrato de levedura	0,25
Solução estoque	1 mL

Para o preparo das três soluções de umidificação, foi preciso calcular a quantidade de água para adicionar ao meio e deixá-lo na umidade desejada de 70%. Essa quantidade de água foi obtida através da Equação 3.

$$m_{H_2O} = \text{massa do resíduo} * \frac{\text{umidade desejada} - \text{umidade do resíduo}}{1 - \text{umidade desejada}} \quad (3)$$

Foram pesados 100 gramas de farelo de trigo umedecido e colocados em erlenmeyers de 1000 mL, em duplicata. Os erlenmeyers foram fechados e colocados em autoclave à 121°C durante 15 minutos para esterilização do meio. Em seguida, depois de frio, foi feita a inoculação com o volume de inóculo obtido anteriormente, os erlenmeyers foram fechados e incubados durante 7 dias sob a temperatura de 38°C. A cada 24 h, inclusive 0 h, foi retirada uma amostra de aproximadamente 3 gramas para análise de pH, umidade e atividade enzimática.

Para obtenção do extrato enzimático, foi utilizado como solvente solução de cloreto de sódio (0,9%), na proporção de 11 mL por grama de amostra. Em aproximadamente 1 grama de amostra foi adicionada a solução e homogeneizou-se. Após 30 minutos, foi feita a filtração da mistura com papel de filtro. O extrato filtrado foi armazenado sob refrigeração para posterior análise enzimática.

**Análise da umidade:** Para esta análise, foi determinado o peso seco de cápsulas de alumínio e nelas foram pesadas cerca de 2 gramas de amostra. Após 24 horas, em estufa a 105°C, a umidade das amostras foi determinada através da Equação 4 a seguir (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{\text{peso inicial da amostra}} * 100 \quad (4)$$

**Análise do pH:** Para esta análise, foi preparada uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 grama de amostra. Após homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um período de aproximadamente 20 minutos e o pH mensurado em pHmetro digital (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

**Determinação da atividade enzimática:** Para análise de atividade enzimática de CMC<sub>Case</sub>, foi preparada uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 4% (Sigma C – 5678) em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de solução CMC 4% e em seguida adicionou-se 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático nestes tubos, a mistura foi homogeneizada e os mesmos foram incubados durante 10 minutos à 50 °C para que a reação viesse a ocorrer. Após esse tempo, foram adicionados 0,5 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) para interromper a reação e a mistura foi novamente homogeneizada.

Preparou-se o branco das amostras. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de tampão citrato de sódio e em seguida adicionou-se 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático, a mistura foi homogeneizada e, em seguida, foi adicionado 0,5 mL de DNS. Preparou-se também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,25 mL de solução CMC 4%, 0,25 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL de DNS em um tubo de ensaio.

Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em água fervente durante 5 minutos. E logo depois, resfriados em banho de gelo. Após isto, as amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada para leitura no espectrofotômetro em absorvância 540 nm. Para determinação da concentração de açúcares foi construída uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959; GHOSE, 1986). O valor da atividade enzimática pode então ser calculado através da Equação 5:

$$\text{CMCase} \left( \frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 0,5 \times R}{(0,18 \times 10 \times 0,25)} \quad (5)$$

Onde:

A = absorvância da amostra;

B = absorvância do branco da amostra;

f = fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = diluição da amostra;

0,5 = volume total do meio de reação (mL);

0,18 = fator de conversão de miligramas para  $\mu\text{mol}$  de glicose;

10 = tempo de reação (min);

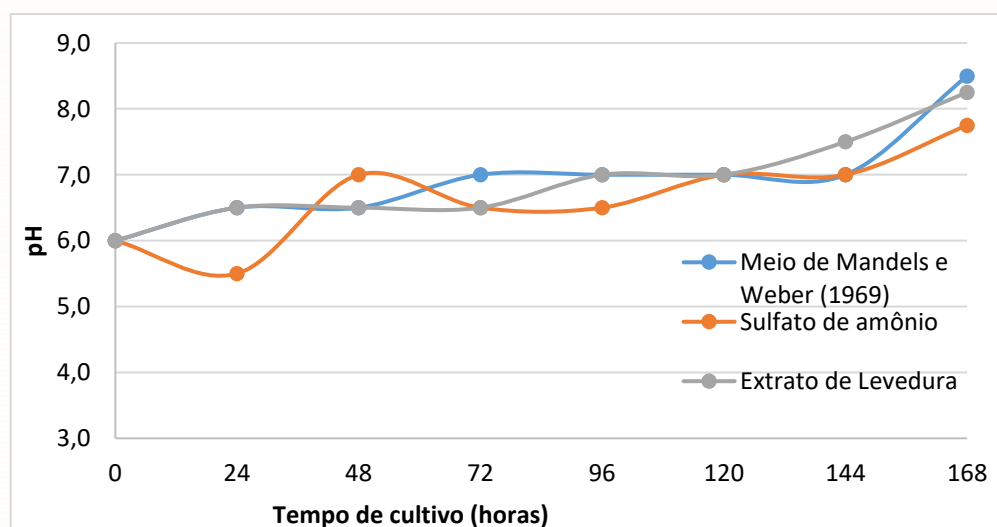
0,25 = volume da enzima no meio de reação (mL);

R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16 apresentou bom crescimento no meio contendo farelo de trigo para as três fontes de nitrogênio que foram avaliadas. Para este experimento realizado à temperatura de 38 °C apresentou crescimento aparente com aproximadamente 24 horas de cultivo. Nas Figuras 1 e 2, podem ser observados as variações de pH e umidade durante os experimentos, respectivamente.

**Figura 1.** Valores de pH durante os cultivos



A partir deste gráfico, pode ser observado variações de pH em cada experimento, os valores tiveram variação de 6,0 a 8,5. Variações de pH durante o cultivo indicam que o fungo

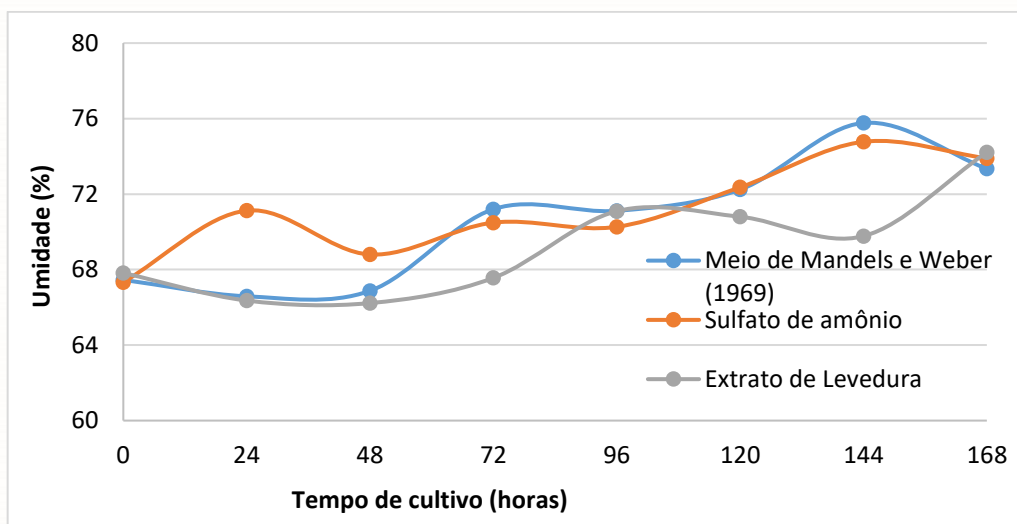
(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

está crescendo no meio. Em todos os experimentos pode ser observado crescimento do fungo. Na maioria dos experimentos se observa a mesma tendência, após o período de 96h o pH subiu chegando ao final do cultivo próximo a 8,0.

**Figura 2.** Valores de umidade durante os cultivos

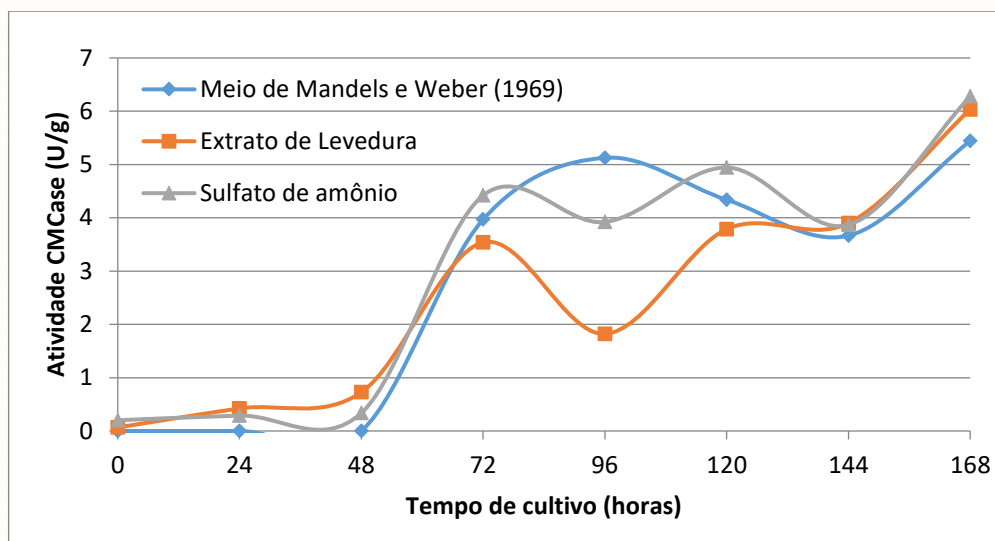


A partir deste gráfico, pode ser observado variações de umidade em cada experimento. Nos três experimentos observa-se o mesmo comportamento da umidade em relação aos cultivos. A umidade cresce até 168h de cultivo com um valor superior ao inicial, percebendo-se que inicialmente a umidade é cerca de 68% e no fim apresenta umidade em torno de 73-74%. Isso acontece devido a hidrólise da celulose presente no farelo de trigo, aumentando a umidade do meio pela água liberada.

No trabalho realizado por BARROS et al. (2014), estudou-se o cultivo em estado sólido do fungo FSDE3 utilizando como substratos farelo de trigo e palha de cana-de-açúcar na proporção de 50% cada, umedecidos com meio de Mandels e Weber (1969), concentração de inóculo de  $10^6$  esporos/g, incubados na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , os resultados obtidos também apresentaram variação em relação ao comportamento da umidade, no início apresentou umidade de 55%, durante o cultivo a umidade caiu para 46% e após subiu chegando a 53%. Estes resultados são semelhantes aos resultados do presente trabalho, mostrando mais uma vez que durante o crescimento do fungo ocorrem variações da umidade do meio devido à hidrólise da celulose presente no substrato.

A Figura 3 apresenta os valores de atividade de CMCase para os cultivos realizados com as três fontes de nitrogênio.

**Figura 3.** Valores de atividade enzimática durante os cultivos



Nas primeiras 24 horas de cultivo a atividade é baixa ou nenhuma. Isso ocorre devido ao fato de que o fungo está se adaptando ao meio. Com 48 horas de cultivo, os experimentos ainda apresentaram baixa atividade enzimática, porém com 72 horas de cultivo a atividade subiu para aproximadamente 4,0 U/g.

O comportamento da atividade enzimática varia nos experimentos, pois cada um está submetido a uma fonte de nitrogênio diferente. Nos três experimentos, o pico de atividade foi com 168h de cultivo, onde o sulfato de amônio apresentou o melhor resultado que foi de 6,28 U/g. Em termos de produtividade, o melhor resultado obtido também foi com o sulfato de amônio, em 72 horas de cultivo, onde apresentou produtividade de 1,11 U/(g dia).

O farelo de trigo é uma ótima matéria prima, pois não é muito utilizada para consumo humano e se torna uma alternativa para o crescimento fúngico tanto para extração de proteínas como para o enriquecimento e/ou disponibilização de nutrientes (PEREIRA, 2014).

CARVALHO-GONÇALVES (2017) realizou cultivo em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16, farelo de trigo como substrato e solução de Mandels e Weber (1969) como fonte de nitrogênio, obtendo um valor máximo de 10,92 U/g, em 120h de cultivo, para a produção de CMCase. O cultivo foi realizado com 50% de umidade e concentração de  $10^6$  esporos/g do isolado fúngico.

CAVALCANTE et al. (2018) realizaram cultivos em estado sólido do fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos lignocelulósicos para a produção de celulases, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar, utilizando solução nutriente  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 10 \text{ g/L}; \text{KH}_2\text{PO}_4, 3$



g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L;  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0016 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0014 g/L) para ajuste da umidade até 55%, concentração de inóculo de  $2 \times 10^7$  esporos/g, incubados na temperatura de 30°C, obtiveram pico de atividade enzimática de CMC<sub>ase</sub> de aproximadamente 2,40 U/g com 72h de cultivo, apresentando um valor inferior ao resultado obtido no presente trabalho.

ARAÚJO (2013) estudou a atividade enzimática de celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* por cultivo em estado sólido utilizando alguns resíduos lignocelulósicos como substrato, dentre eles a casca de coco verde, umedecido com solução nutritiva (10 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,005 g/L  $\text{MnSO}_4$ ; 1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,005 g/L  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,5 g/L  $\text{CaCl}_2$ ), umidade de 70%, concentração de esporos de  $10^7$  esporos/g, temperatura de incubação de 30°C, obtendo o maior resultado de produção enzimática de 0,39 U/g com 168 h de cultivo, quando comparado ao resultado do presente trabalho apresenta valor inferior.

Nos estudos de SALAZAR (2016), realizou-se cultivo em estado sólido do microrganismo *Penicillium* CLF1 utilizando casca de soja como substrato, meio umedecido com água destilada, umidade de 70%, concentração de inóculo de  $10^7$  esporos/g, temperatura de incubação de 30°C, e o melhor resultado obtido de atividade enzimática de CMC<sub>ase</sub> foi de aproximadamente 9,11 U/g com 408 h de cultivo, valor este um pouco maior ao obtido no presente trabalho, porém o pico de atividade foi com um tempo de cultivo muito maior.

Devido a estes fatores, a substituição da solução de Mandels por solução de sulfato de amônio torna o processo economicamente viável, pois além do fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16 apresentar bom crescimento e bons resultados de produção de enzimas, o farelo de trigo possui rica composição nutricional para crescimento de fungos sendo deficiente apenas em relação ao nitrogênio presente, para preparar a solução de sulfato de amônio utiliza-se apenas um reagente, enquanto que para o preparo da solução de Mandels utilizam-se vários outros reagentes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para todos os experimentos foram satisfatórios quando comparados com os resultados da literatura. O fungo *Aspergillus* sp. FSDE 16 apresentou bom crescimento em meio contendo farelo de trigo, se mostrando bastante promissor para a

produção de celulases. Também apresentou bons resultados em relação às fontes de nitrogênio estudadas.

Foi possível identificar que sulfato de amônio foi a melhor fonte de nitrogênio para produção de celulases, pois apresentou como a alternativa mais economicamente viável.

Para trabalhos futuros, se torna interessante o estudo da variação de concentração desta fonte de nitrogênio com o intuito de melhorar a atividade enzimática de celulases, bem como a utilização desta fonte de nitrogênio em outros tipos de resíduos lignocelulósicos.

## **REFERÊNCIAS**

ARAÚJO, M. L. **Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas.** 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

BARROS, et al. Produção de celulases pelo fungo FSDE3 em cultivo semissólido utilizando resíduos da cana-de-açúcar. **Revista Saúde e Ciência Online**, v.3, n.3, p. 164-173, 2014.

BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido.** 2017. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

BOMTEMPO, F. V. S.; CARREIRO, S. C.; PIMENTA, R. S.; GUARDA, E. A. Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 7, n.1, p. 26-44, 2017.

CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T. **Bioprospecção de fungos celulolíticos provenientes da agroindústria para produção de bioetanol.** 2017. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

CAVALCANTE, et al. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v.14, n.6, p. 1-9, 2018.

COELHO, G. et al. 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. **Revista Saúde & Ciência**, v.7, n.2, p. 323-338, 2018.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem**, v.59, p. 257-268, 1987.

INÁCIO, R. M. **Panorama da utilização de resíduos do beneficiamento do arroz para a geração de energia no Brasil e formas de aplicação**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo, 1985.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances Chemical Ser**, 95, p. 391-414, 1969.

MARRA, I. F. et al. Efeito do pH, umidade, e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma* sp. em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.2, p. 125-131, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NISHIDA, V. S.; OLIVEIRA, R. F.; INÁCIO, F. D.; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. Produção de  $\beta$ -Glicosidases por *Aspergillus* spp. em cultivos em estado sólido. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.3, p. 388-391, 2013.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. .C; PAMPFILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus Oryzae* através de fermentação no estado sólido**. 2014. 56 f. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2014.

RÊGO, A. P. et al. Produção de enzimas CMCase e pectinase por processo fermentativo utilizando casca de café suplementada com manipueira como substrato. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.1, p. 104-121, 2019.

SALAZAR, L. N. **Produção e caracterização parcial de enzimas lignocelulolíticas por um novo isolado de *Penicillium* sp. em cultivo em estado sólido**. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016.