

PRODUÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM MILHETO E FARELO DE TRIGO UTILIZANDO *Trichoderma harzianum*

Jussara Maria Martins de Almeida Afonso¹

Frederico Alves Lima²

Miriam Maria de Resende³

Reutilização e Tratamento de Resíduos (sólidos e líquidos)

Resumo

No Brasil, a agroindústria é um dos seguimentos que mais produz resíduos orgânicos. A utilização de diferentes tipos de biomassas vegetais surge como alternativa de redução do uso de fertilizantes, substituindo-os por fontes orgânicas como forma de reciclagem. O presente trabalho tem como objetivo a produção de fosfatases ácidas por meio de fermentação sólida, utilizando milho, farelo de trigo como fontes de fósforo e o fungo *Trichoderma harzianum*. As fermentações sólidas foram realizadas com 20% de umidade em reator estático por sacrifício. Na fermentação sólida e na extração do complexo enzimático foi utilizado o tampão de acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M. Os substratos milho e farelo de trigo foram previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. Para a fermentação, foram inoculados 25 mL de tampão de acetato de sódio com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de 3×10^7 esporos/mL e com 100 g de substrato. A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O pH do extrato foi medido em pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado. Obteve-se, para o substrato milho, concentração de $7,22 \times 10^8$ esporos/mL, atividade enzimática de 4,85 U/mL e pH de 5,69. Para o farelo de trigo, foram obtidos $13,75 \times 10^8$ esporos/mL, atividade enzimática de 4,85 U/mL e pH de 5,49, demonstrando o importante potencial para produção de fosfatase ácida pelo fungo *Trichoderma harzianum*, além da vantagem de baixos custos de cultivo para os processos fermentativos.

Palavras-chave: Fungos; Processos fermentativos; Resíduos agroindustriais.

¹Jussara Maria Martins de Almeida Afonso: Mestranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, jussarammartins@live.com.

²Frederico Alves Lima: Doutorando em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, alveslimafrederico@gmail.com.

³Prof. Dr. Miriam Maria de Resende da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica, Núcleo de Processos Biotecnológicos, mresende@ufu.br.



INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é o nutriente cuja reduzida disponibilidade limita o crescimento das plantas, apesar de estar presente nos solos, tanto nas formas orgânicas como inorgânicas, sendo fundamental no metabolismo de plantas e microrganismos (Chagas Junior et al., 2010). Uma forma de se obter compostos fosfatados no solo é pela ação de enzimas denominadas fosfatases, que catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel (Souza, 2011).

A enzima fosfatase ácida, secretada pelas raízes das plantas, é responsável pela retirada de grupamentos fosfato de fontes orgânicas no solo, aumentando a absorção a partir de recursos de fósforo não imediatamente disponíveis (Silva, 2020). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (Souchie et al., 2007). Esses microrganismos solubilizam o fosfato insolúvel na forma solúvel e excretam ácidos inorgânicos, ácidos orgânicos e fosfatase para dissolver o fósforo. Contudo, os mecanismos de P-solubilização não diferem apenas entre isolados de fungos, mas também dependem das fontes de P aplicadas (Souchie et al., 2007).

De acordo com Souza (2011), os microrganismos seriam as fontes mais expressivas de fosfatases no solo, por causa da sua grande biomassa, alta atividade metabólica e curto tempo de vida, com várias gerações, permitindo assim a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, quando comparado com as plantas. Estudos mostram que fungos *Trichodermas spp.* são bioagentes altamente desejáveis com potencial duplo para biocontrole, promoção de crescimento vegetal e capacidade de produzir e secretarem fosfatase ácida (Zhao et al., 2017).

O fungo *Trichoderma harzianum* é uma das espécies mais estudadas e utilizadas no controle biológico de diversos fungos e nematoides patogênicos que causam prejuízos na agricultura (Lima et al., 2017). Este fungo foi destacado como um potente agente fertilizante, dada a sua capacidade de induzir a absorção e fornecer fosfato solúvel no solo (Kapri e Tewari, 2010).

Uma vantagem considerável da fermentação sólida (FES) é a utilização de resíduos

agroindustriais como substrato e suporte para o crescimento microbiano. Esses resíduos são subprodutos oriundos da atividade agrícola, gerados em grandes quantidades e apresentam baixo valor comercial. A disposição desse resíduo sem o tratamento adequado pode ocasionar problemas ambientais e proliferação de doenças (Ambrozim, 2019).

O processo de FES é realizado em um substrato sólido com baixo teor de umidade, com as vantagens de uma alta concentração do produto, mas apenas uma energia relativamente baixa sendo necessária (Maruyama, et al., 2000). O conteúdo de água necessário em FES é absorvido pelo substrato em uma matriz sólida e oferece mais vantagens para o crescimento de microrganismos pela transferência de oxigênio (Robinson, et al., 2001). Esta técnica tem se mostrado vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de fungos selvagens (Hansen et al., 2015), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (Rodríguez Zúñiga et al., 2011).

A FES vem ganhando espaço entre as pesquisas, principalmente, para produção de enzimas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos comumente presentes em resíduos agroindustriais. Wisniewski et al. (2010) utilizaram farelo de soja como substrato suplementar aos resíduos do processamento de cerveja, para a produção de amilase; Rodríguez Zúñiga et al. (2011) empregaram bagaço de cana de açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e misturas entre os substratos para obtenção de celulases e endoglucanases; Gusmão et al. (2014) utilizaram casca de café como substrato indutor para produção de amilase, carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e pectinase.

Assim, objetiva-se com esse trabalho avaliar a produção fosfatase ácida por meio da fermentação sólida do fungo *Trichoderma harzianum*, utilizando milho e farelo de trigo como fontes de substrato.

METODOLOGIA

Microrganismos

Os fungos da espécie *Trichoderma harzianum* foram isolados/coletados no Complexo Mineroquímico de Araxá (Vale Fertilizantes), Minas Gerais. O isolado de



fungos foi identificado por testes bioquímicos de taxonomia convencional, pela Fundação Andre Tosello para Pesquisa e Tecnologia (Campinas-SP). Estas culturas fúngicas pertencem ao banco de microrganismos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidas em ultrafreezer a (-70) °C.

Fermentação em estado sólido (FES)

As fermentações sólidas foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume), como mostra a Figura 1. Foi inoculado 25 mL de tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de 3×10^8 esporos/mL com 100 g de substrato previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. A FES foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Os reatores estáticos foram adicionados na estufa BOD Thermostat Cabinets TS 606-G/4-i em temperatura de 25°C.



Figura 1: Reatores estáticos na estufa BOD.

Determinação da umidade

A umidade foi determinada seguindo a Equação 1:

$$U (\%) = \left[\frac{mtampão}{msubstrato+mtampão} \right] * 100 \quad (1)$$

Extração de Enzimas

A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M. Após a adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

Metodologia Analítica

Determinação da concentração celular em fermentação sólida

A concentração celular (densidade microbiológica) para fungos foi determinada pela filtração do caldo fermentado de um volume conhecido. Os filtros de papel, pesados previamente, apresentavam diâmetro 90 mm e retenção de partículas de 4-7 µm. Depois de filtrado, os filtros com a biomassa foram levados para estufa à temperatura de 60±1,0°C e o sobrenadante foi reservado para análises da atividade da fosfatase ácida. Após 24 horas, o filtro foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e, posteriormente, foi pesado. Este procedimento foi repetido até a verificação de peso constante para a medida da biomassa seca. A diferença de massa do filtro antes e depois da filtração foi a massa de células presente no volume do caldo fermentado, sendo que a concentração celular foi expressa em (g/L).

Determinação do pH

O pH foi medido em pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado.

Avaliação da Esporulação

O meio extrativo contendo tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M com células de *Trichoderma harzianum* foi transferido para tubos de ensaio estéreis, devidamente identificados. A partir da suspensão fúngica, foi realizada a contagem de esporos em microscópio luminoso com câmara de Neubauer, utilizando-se diluição da suspensão com a solução de tampão acetato de sódio com pH 5 e concentração 0,005 M, quando necessário.



Ensaio Enzimático

A atividade da fosfatase ácida foi medida de acordo com Leitão et al. (2010), utilizando como substrato fosfato de p-nitrofenilo sal disódico hexahidratado (p-NPP) (Sigma Aldrich™). A mistura para o ensaio consistiu em 50 µL do extrato enzimático, 100 µL da solução de (p-NPP) concentração 5 m.mol/L e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 m.mol/L e pH 5,00. Após a adição dos reagentes, incubou à 45°C em banho termostático por 15 min. Por fim, depois deste período, a reação foi interrompida com a adição de 1000 µL de NaOH na concentração de 0,1 mol/L. A quantidade de (p-NP) liberada foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a 405 nm de comprimento de onda. Uma unidade (1U) de atividade da fosfatase ácida foi definida como 1 µM de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (Ames, 1966).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos de crescimento celular expressa em (g/L), pH e crescimento de esporos (conídios/mL) para FES, utilizando milho e farelo de trigo, respectivamente:

Tabela 1: Fermentação sólida utilizando milho

TEMPO (DIAS)	UMIDADE (%)	CRESCIMENTO CELULAR	pH	ESPORULAÇÃO
3	20	0,84	5,01	6,72x10 ⁷
5	20	1,04	5,39	9,2x10 ⁷
7	20	2,64	5,37	4,57x10 ⁸
9	20	3,52	5,69	7,22x10 ⁸

Tabela 2: Fermentação sólida utilizando farelo de trigo

TEMPO (DIAS)	UMIDADE (%)	CRESCIMENTO CELULAR	pH	ESPORULAÇÃO
3	20	2,8	5,43	7,15x10 ⁸
5	20	3,52	5,54	11,2x10 ⁸
7	20	4,64	5,66	12,2x10 ⁸
9	20	6,19	5,49	13,75x10 ⁸

A umidade da FES foi estabelecida com valor de 20%, isso deve-se ao fato do crescimento do microrganismo. O excesso de umidade em um substrato pode alterar o crescimento do microrganismo e, quando a diminuição ocorre, o crescimento enzimático será cancelado devido à baixa solubilidade de nutrientes (Reinoso, 2015). No caso dos fungos, a umidade do material deve ser em uma faixa de 20 e 70% (Bustamante, 2015).

É importante ressaltar que houve a correção do pH com o tampão acetato de sódio pH 5 e concentração 0,005 M. Bakker (2017) avaliou a atividade enzimática, confirmando a maior expectativa de maior estabilidade na extração de enzima quando realizada com tampão, fator que mantém o pH estável. O fato também foi relatado por Taraboulsi-Jr et al (2010), ao pesquisarem os fatores que afetam a atividade enzimática.

O crescimento celular do fungo *Trichoderma harzianum* atingiu valores máximos de 3,52 g/L para o milho e 6,19 g/L para o farelo de trigo. Os experimentos realizados por Ghazanfar, Raza e Raza (2018) demonstraram um melhor crescimento das espécies de *Trichoderma* testadas em ambiente ácido, quando em comparação ao ambiente alcalino. Todas geraram maior biomassa na faixa de pH 5 até pH 7. Esses resultados corroboram com o atual estudo, cujo maior estímulo da formação de biomassa foi o pH 5,69 e 5,49.

O pH ácido é descrito como o fator chave no crescimento celular de todas as espécies de *Trichoderma*, pois, na natureza, além de crescerem melhor em solo ácido, também modificam a rizosfera ao acidificar o solo, quando necessário, já que é uma condição desfavorável para o crescimento de fitopatógenos (Ghazanfar; Raza; Raza, 2018).

Ao final de 9 dias, foi possível observar que a esporulação do fungo na temperatura



de 25 °C apresentou um valor de $13,75 \times 10^8$ conídios/mL para o farelo de trigo e $7,22 \times 10^8$ conídios/mL para o milho. Aceves et al. (2008) avaliaram 15 substratos orgânicos para a produção massiva de esporos de *Trichoderma harzianum*. Os substratos inoculados foram incubados por um período de 21 dias a 25 ± 2 °C, obtendo uma faixa de produção heterogênea, onde o melhor resultado foi de $4,43 \times 10^8$ conídios/mL para o sabugo de milho.

A Figura 2 (A) mostra a atividade de fosfatase ácida (U/mL) para o substrato milho e a Figura 2 (B) mostra a atividade de fosfatase ácida (U/mL) para o farelo de trigo:

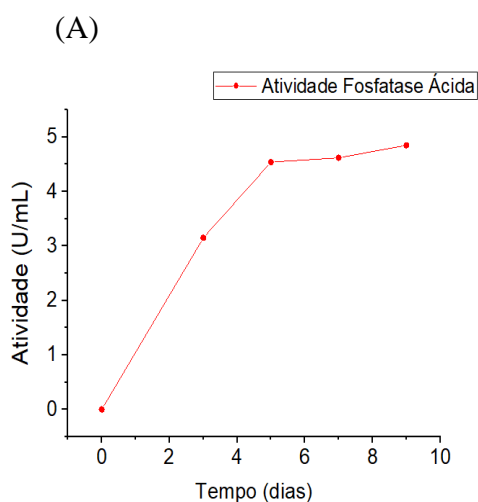


Figura 2: (A) Atividade da fosfatase ácida para farelo de trigo.

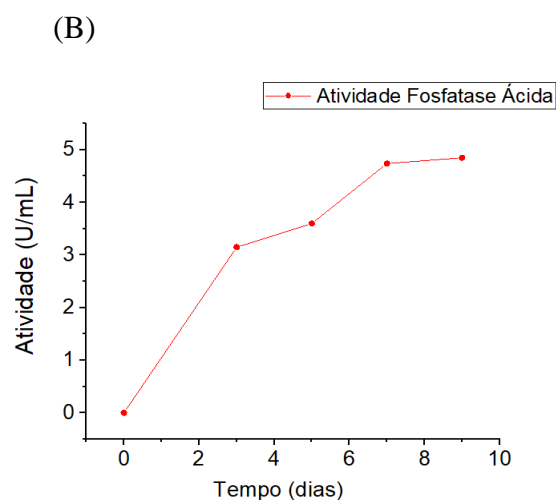


Figura 2: (B) Atividade da fosfatase ácida para milho.

Para esses resultados foram desconsiderados os valores de controle para a atividade de fosfatase ácida. O aumento na atividade enzimática a partir de 2 dias corroborou com dados encontrados na literatura, onde a concentração de fosfato solubilizado aumentou gradualmente (Kapri et al.,2010).

Pode-se observar que, para a produção da enzima em estudo, o substrato milho mostrou-se mais promissor comparado com o substrato farelo de trigo. Ambos os substratos atingiram valor máximo de 4,85 U/mL, mas o substrato milho apresentou uma variação menor até o final da fermentação.

Vale ressaltar que publicações sobre produção de fosfatases ácidas utilizando resíduos agroindustriais são escassas. Dessa forma, os resultados se tornam relevantes por

realizarem outros experimentos visando a condição ótima do processo.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização dos substratos milho e farelo de trigo em fermentação sólida para a produção de fosfatase ácida apresentou grande potencial de aplicação. Houve um crescimento celular final de $7,22 \times 10^8$ para o milho e $13,22 \times 10^8$ para o farelo de trigo. Ambos atingiram pH constante e próximo a 5 e atividade enzimática de 4,85 U/mL.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ACEVES, A. C. et al. **Producción masiva de *Trichoderma harzianum* rifai en diferentes sustratos orgánicos.** Revista Chapingo Serie Horticultura 14(2): 185-191, 2008.

AMES BN. **Assay of inorganic phosphate and phosphatases.** Methods Enzymol. 1966; 8:115–118.

BAKKER, C. **Avaliação e produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo de farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (2012). **Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications.** Process Biochemistry, 47(2), 175–185.

BISCHOF, R. H., RAMONI, J., AND SEIBOTH, B.: **Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*, Microb.** Cell Fact, 15, 106 (2016).

BUCHERT, J., OKSANEN, T., PERE, J., SIIKA-AHO, M., SUURNÄKKI, A., AND VIKARI,



L.: **Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry**, pp. 343e364, in: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis, Bristol (1998).

BUSTAMANTE, J. (2015). **Producción de proteína microbiana con gabazo de manzana**. 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>.

CALASANS, PATRICIA N. **Produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana**. Universidade Federal Sergipe, 2012. Disponível em: <https://ri.ufs.br/handle/riufs/5060>. Acesso: 15 maio de 2021.

CASTILLO, M. R. et al. **Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production**. *biotechnology letters*. V. 16, n. 9, p. 967-972, 1994.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRIGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C. & LÓPEZ-BUCIO, J. ***Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent. plant physio L**. 149, 1579–1592, 2009.

EMBRAPA. **Curso: Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna, SP. 18 a 20 de setembro de 2012. Disponível em: <https://bit.ly/3rmRc8m>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2021.

GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W. **Effect of physiological parameters on mass production of *Trichoderma species***. *Pakistan Journal of Phytopathology*. Volume 30, n. 1, p. 59–65, 2018.

GUSMÃO, R.O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B; ASSIS, F. G.V.; LEAL, P.L. **Produção de enzimas por *Aspergillus pp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café**. *Scientia*. Plena, v.10, n.11, p. 116-202, 2014.

HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J.C.; LÜBECK, P.S.; ANDERSEN, B. **Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation**. *Process Biochemistry*, v.50, n.9, p.1327- 1341, 2015.

KAPRI, A. TEWARI, L., **Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma spp.*** *Brazilian Journal of Microbiology*, ISSN 1517-8382, 2010.

KRELING, N., ZAPAROLI, M., MARGARITES, A., ZAMPIERI, D., COLLA, L. **Biosurfactant production: intracellular manoproteins and extracellular sophorolipids by *Saccharomyces cerevisiae***. *Eng. Sanit. Ambient.* vol.24 no.6 Rio de Janeiro Nov, /Dec. 2019 Epub Dec 20, 2019.

LEITE, P., SOUSA, D., FERNANDES, H., FERREIRA, M., COSTA, A. R., FILIPE, D., SALGADO, J. M. **Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2020.

LIMA, F., FÉLIX, C., OSÓRIO, N., ALVES, A., VITORINO, R., DOMINGUES, P., RIBEIRO, R., ESTEVES, A. ***Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the**

biological control of Guignardia citricarpa. Biological Control 106 (2017) 99–109.

MARUYAMA, J.I., OHNUMA, H., YOSHIKAWA, A., KADOKURA, H., NAKAJIMA, H., KITAMOTOZ, K. **Production and product quality assessment of human hepatitis B virus pre-S2 antigen in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus oryzae*.** J. Ferment. Bioeng. 90 (1) (2000) 118-120.

NAZARI, M., RIGUETOC.REMPEL, A., COLIA, L. **Harvesting of *Spirulina platensis* using an eco-friendly fungal bioflocculant produced from agro-industrial by-products.** Bioresource Technology Volume 322, February 2021.

NORTE, A. ***Trichoderma*.** Revista Especial Pinheiro Silvestre, n. 1, 2007. Disponível em: <http://www.spainbonsai.com>. Acesso em: 28 de jan. 2021.

PASTRANA, L. (2009). **Fundamentos De La Fermentación En Estado Sólido Y Aplicación a La Industria Alimentaria.** Ciencia y Tecnología Alimentaria, 1(3), 4–12.
<https://doi.org/10.1080/11358129609487556>.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. **Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation.** Bioenergy research, v. 7, n. 2, p. 744-752, 2014.

REINOSO, B. (2015). **Diseño de un fermentador de bandeja a escala piloto para la producción de enzimas con actividad ligninolítica y celulolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido con aserrín de eucalipto.** Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial EPN.
<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/10587/1/CD-6265.pd>

REZENDE, L. C., PINTO, Z.V, BETTIOL, W. **Effect of aeration in the spore's production of *Trichoderma asperellum* on liquid fermentation.** Summa Phytopathologica, 2014.

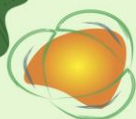
ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P. **Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production,** Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 (2001) 284-289.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

SADH, P., DUHAN, S., DUHAN. J. **Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review.** Bioresources and Bioprocessing, 2008.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. **Solubilizadores de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu.** Bioscience Journal, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

SOUZA, Amanda Araujo. **Production and biochemistry characterization of the acid phosphatase *Trichoderma harzianum* (ALL42).** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.



TARABOULSI Jr et al. **Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana.** São Paulo, 2010. <https://doi.org/10.11606/D.9.2011.tde-28072010-113005>.

ZHAO LEI, LIU QUN, ZHANG YA-QING, CUI QING-YU, LIANG YUAN-CUN. **Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of Arabidopsis under salt stress.** Journal of Integrative Agriculture 2017, 16(6): 1341–1346.

WISNIEWSKI, A.C, DE ALMEIDA, M.A.L, PALMA, M.P., TAVARES, L.B.B. **Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja.** Revista Brasileira de Biociências, v.8, p.285-293, 2010.