

TOLERÂNCIA À AGITAÇÃO MECÂNICA DO FUNGO *Myceliophthora thermophila* I1D3b CULTIVADO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO

L.M. GRAJALES^{1,2*}, P. P. DODORICO¹, E.O. IGNÁCIO¹, J.C. THOMÉO^{1**}

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos,

²Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos,

E-mail para contato: *grajales@uft.edu.br, patriciapdodorico@gmail.com,
eo_ignacio@yahoo.com.br, **thomeo@ibilce.unesp.br

RESUMO – A presente pesquisa dá suporte ao desenvolvimento de um biorreator rotativo para a produção de celulasas por Fermentação em Estado Sólido, utilizando o fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b e empregando bagaço de cana e farelo de trigo como substratos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância do fungo à agitação mecânica, determinando a atividade das endoglucanases produzidas em cultivos com e sem agitação. Fermentações em sacos plásticos de polipropileno foram utilizadas como referência. O equipamento utilizado foi um biorreator rotativo de 10cm de diâmetro por 20cm de comprimento, com alimentação de ar através de um tubo interno de 0,5cm de diâmetro externo e 19cm de comprimento, perfurado a cada 1cm. De forma geral, as fermentações realizadas neste equipamento revelaram que o fungo *Myceliophthora termophila* I1D3b é tolerante à rotação do tambor e as atividades enzimáticas obtidas foram em média superiores às dos sacos plásticos de polipropileno.

1. INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira tem se desenvolvido notavelmente nos últimos quarenta anos devido à necessidade de produzir um combustível alternativo aos combustíveis de origem fóssil (GOES; MARRA, 2008). Atualmente, a plantação de cana de açúcar no Brasil ocupa cerca de 10.000.000 hectares (ÚNICA, 2013), de cujo processamento sobram 12 toneladas de bagaço e 12 toneladas de palha por hectare (SANTOS et al., 2014). O bagaço e a palha de cana, junto com outros resíduos agroindustriais, como palha de milho, farelo de trigo e gramíneas, dentre outros, se constituem uma matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo, com grande potencial de aplicação biotecnológica, dentre as quais o etanol de segunda geração. O emprego desses resíduos pode proporcionar algumas vantagens ambientais como a diminuição de problemas relacionados à acumulação de materiais de lenta degradação, produção de etanol sem necessidade de aumentar a área plantada e redução dos custos de produção (RABELO, 2007).

Em termos gerais, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve etapas de pré-tratamento, em que ocorre a deslignificação do material, o processo de hidrólise, em que ocorre a liberação dos açúcares fermentescíveis, a fermentação alcoólica e a destilação. A etapa de hidrólise pode ocorrer de duas maneiras, a hidrólise ácida, uma tecnologia já desenvolvida, mas que possui a desvantagem da geração de resíduos perigosos, e pelo processo

de hidrólise enzimática, que usa vários tipos de enzimas como ligninases, celulases e hemicelulases, tornando o processo ambientalmente amigável (MISHIMA et al., 2006). No entanto, o alto custo das enzimas é um dos principais obstáculos dessa etapa, de modo que sua produção em grande quantidade e a baixo custo é um desafio a ser vencido.

Uma das alternativas para a produção de celulases a baixo custo é através da fermentação em estado sólido (FES), empregando-se os resíduos lignocelulósicos provenientes do agronegócio, em particular o bagaço de cana (PANDEY, 1992) e fungos termofílicos (GRAJALES, 2014). O fungo filamentosso *Myceliophthora thermophila IID3b* foi testado com sucesso por Zanelato et al. (2012) para produção de endoglucanases e xilanases por tecnologia FES, empregando como substratos bagaço de cana e farelo de trigo em um reator de leito fixo. Como resultado altas atividades enzimáticas foram obtidas embora os efeitos de migração de umidade e heterogeneidade na distribuição espacial das atividades enzimáticas tenham sido observados. Uma alternativa é uso de reatores de leito móvel, tais como os de tambor rotativo. Estes são mecanicamente mais complexos e operacionalmente mais trabalhosos, porém dão flexibilidade na remoção do calor, pois o ar percola longitudinalmente o tambor, de modo que o contato entre a fase sólida e a fluida é intenso conferindo grande homogeneidade térmica a estes sistemas (DURAND, 2003). Também, é possível fazer-se a inoculação da cultura fúngica no próprio equipamento e adicionar-se água ao sistema para repor a água perdida para o ar e para os próprios microrganismos. A fim de aproveitar as vantagens deste tipo de equipamentos um biorreator de tambor rotativo foi testado por Grajales (2014). No desenvolvimento do equipamento foi necessário avaliar e conhecer diferentes etapas do processo como as características de movimentação das partículas sólidas, as propriedades de retenção de água do leito, aspectos básicos de transferência de calor e massa e da adaptação do microrganismo às tensões de cisalhamento provenientes do movimento do sistema. Desta forma, o presente trabalho forma parte desse projeto e propôs-se conhecer unicamente o comportamento do fungo frente a tensões de cisalhamento próprias do movimento do equipamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Substrato: Neste trabalho foram utilizadas como substrato partículas de bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. O bagaço de cana foi fornecido pela Usina Colombo, de Ariranha/SP e o farelo de trigo foi adquirido no comércio local. A proporção da mistura bagaço e farelo, usada em todos os experimentos foi 70% de bagaço de cana e 30% de farelo de trigo (em massa), levando-se em consideração os resultados obtidos por Zanelato et al. (2012), nos quais foi alcançada a maior atividade enzimática de celulases, produzidas por FES em reator de leito fixo.

Microrganismo: O fungo termofílico utilizado foi o *Myceliophthora thermophila I-1D3b*. Este foi conservado em tubos criogênicos com o meio de Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado, com adição de glicerina a 15% e armazenado em criostato à temperatura de -80°C. Para o uso habitual do fungo, este foi mantido em tubos de ensaio com meio BDA inclinado à temperatura de 5°C, preservando-o com repiques periódicos.

Equipamento: Foi utilizado um biorreator construído em alumínio, de 10cm de diâmetro interno por 20cm de comprimento, totalizando aproximadamente 1,6L de volume. O biorreator possui um sistema de alimentação de ar através de um tubo de 0,5cm de diâmetro externo e 19cm de comprimento com perfurações a cada 1cm, como apresentado no esquema da Figura 1. A

temperatura foi controlada por uma camisa de refrigeração, na qual a água de circulação provinha de um banho termostático. O equipamento permaneceu suportado em uma estrutura metálica, a qual contou com dois roletes que foram movimentados através de um motor elétrico.

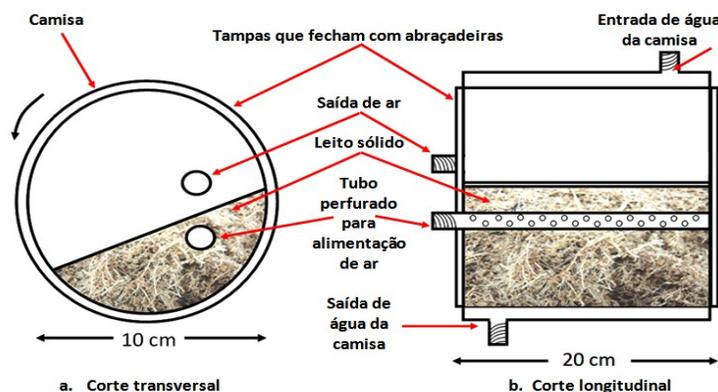


Figura 1 - Esquema do biorreator rotativo construído em alumínio.

2.2 Metodologia

Pré-inóculo: O fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b, armazenado em câmara fria a 5°C, foi deixado à temperatura ambiente durante 3 horas. Após este período, a superfície do meio de cultivo foi suavemente raspada com alça de platina, e os esporos transferidos para um erlenmeyer contendo 50mL do meio BDA inclinado, previamente esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos, e solidificado. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Uma vez o fungo introduzido no erlenmeyer, este foi incubado em estufa termostaticada BOD a 45°C durante 96 horas.

Solução nutriente e suspensão de esporos: A solução nutriente foi composta de 10g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3g/L MAP (fertilizante agrícola), 2g/L de KCl, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1mL/L CaCl_2 e 1g/L de Tween 80. O pH foi ajustado para 5 com NaOH e/ou HCl (MORETTI, 2013). Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e deixada à temperatura ambiente até resfriamento. Em câmara de fluxo laminar, os esporos do fungo presentes no pré-inóculo foram suspensos na solução nutriente raspando-se gentilmente a superfície do meio de cultura com alça de platina e ajustando-se a concentração para aproximadamente 10^7 esporos/mL, com auxílio de uma câmara de *Neubauer*.

Substrato: Na maioria dos trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Bioenergia e Meio Ambiente, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Campus de São José do Rio Preto, que envolveram bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, realizou-se um tratamento prévio destes materiais anterior à fermentação (CASCIATORI, 2012; MORETTI, 2013; SHIOTA, 2013; ZANELATO et al., 2012). O pré-tratamento consistiu em lavar o bagaço de cana com água corrente para retirar terra e sacarose residual, secagem em estufa de convecção forçada a 60°C até peso constante, peneiramento em tamiz de 3mm para retirada do material mais grosseiro e peneiramento em tamiz de 1,41mm para retirada de poeira e partículas mais finas. O farelo de trigo submetido ao mesmo pré-tratamento, sem o peneiramento. No entanto, prevendo-se a aplicação em larga escala deste processo, as etapas de lavagem, secagem e peneiramento, demandam estrutura física, tempo e gastos energéticos. Por este motivo, decidiu-se comparar as atividades enzimáticas de endoglucanase

utilizando os substratos com e sem pré-tratamento (nas condições como foram entregues pelos fornecedores). Ambos os materiais com e sem pré-tratamento foram armazenados em sacos plásticos de polietileno de alta densidade, em câmara fria a 5°C até sua utilização.

Fermentações em sacos de polipropileno: Uma massa correspondente a 5g de substrato seco (com e sem pré-tratamento) foi introduzida em saco de polipropileno de 12cmx20cm. No interior do saco foi colocada uma espiral metálica, para evitar a compactação do meio e facilitar as trocas gasosas, e na parte superior foi fixado um tubo de PVC de 3,6cm de diâmetro, ao qual foi aplicado um tampão de algodão, como apresentado na fotografia da Figura 2. O sistema completo foi levado para autoclave a 120°C por 20 minutos para sua esterilização. O saco estéril foi deixado à temperatura ambiente até resfriamento. Em câmara de fluxo laminar, a suspensão de esporos foi adicionada ao meio sólido em quantidade suficiente para o substrato atingir umidade final de 75%, seguido de manipulação manual do material para homogeneização. Os sacos de fermentação foram levados a uma câmara climática DBO por 96 horas à temperatura de 45°C, seguindo-se recomendação de Zanelato et al. (2012).



Figura 2 - Sistema de fermentação em saco de polipropileno.

Extração das enzimas e determinação das atividades enzimáticas: Uma vez concluído o processo fermentativo, a cada saco foi adicionada água destilada (100mL) ao material fermentado, que foi revolvido e levado à agitação por 30 minutos em agitador orbital a 100rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 10000g, durante 15 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante ou solução enzimática bruta foi utilizada na determinação da atividade de CMC_{Case}. A técnica usada foi o método do Ghose (1987). O qual consiste em colocar 0,1mL da solução enzimática com 0,9mL de substrato, solução de carboximetilcelulose (CMC – Sigma), incubado a 60°C em banho Maria. Esta reação teve lugar durante 10 minutos e foi interrompida pela adição de 1,0mL do reagente DNS e o aumento da temperatura. Para isto, essa solução foi mantida em água em ebulição durante 10 minutos. O DNS permitiu quantificar os açúcares redutores liberados a partir da curva padrão de glicose (concentração de glicose versus absorbância a 540nm). Posteriormente, essa segunda reação, de liberação de açúcares redutores, foi interrompida com a diminuição da temperatura colocando-a em um banho de gelo. Após este procedimento, foram adicionados 8,0mL de água destilada, seguida de agitação em um agitador para tubos de ensaio e determinação da absorbância. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro UV-VIS Perkin Elemer Lambda 25, a 540nm de comprimento de onda. Com as amostras controle foi realizado o mesmo procedimento, porém adicionado 0,1mL de água destilada em lugar do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0μmol de glicose, por minuto de reação e por mL de enzima.

Fermentações no protótipo de biorreator de alumínio: O pré-inóculo, a solução nutriente e a suspensão de esporos foram preparados conforme descrito. O substrato, em quantidade suficiente para atingir o grau de enchimento a ser avaliado, foi esterilizado em autoclave (1,1Kgf/cm²) a 120°C durante 20 minutos dentro de um saco de polipropileno, juntamente com o biorreator protótipo de alumínio. Em câmara de fluxo laminar, o meio foi inoculado da seguinte forma: a suspensão de esporos junto com a solução nutriente foi introduzida no saco de polipropileno que continha o substrato, este foi revolvido manualmente até observar a absorção do líquido pelas partículas de forma homogênea. Posteriormente, o meio já inoculado foi colocado dentro do biorreator e cultivado por 96 horas. A temperatura do reator foi mantida em 45°C e o ar foi introduzido à vazão de 5L/min e a 45°C. Ao final da fermentação, foram coletadas seis amostras em diferentes regiões do biorreator, na parte frontal, intermediária e traseira, conforme apresentado no esquema da Figura 3, sendo que é considerado como “Frontal” a região próxima à alimentação de ar.

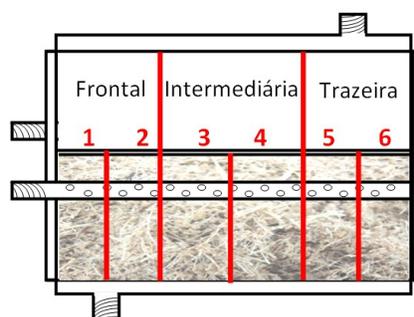


Figura 3- Diagrama de coleta de amostras no biorreator de alumínio.

As variáveis adotadas neste ensaio foram a massa de substrato a 75% de umidade, 254,78g, 318,48g e 382,17g a 75% de umidade, correspondentes ao primeiro, segundo e terceiro grau de enchimento, respectivamente, do biorreator desenvolvido por Grajales (2014) e; a intermitência de rotação do tambor (a cada 12 e 24 horas), sendo que a frequência de rotação do tambor foi mantida em 18rpm devido às características construtivas do equipamento. O número de rotações foi estabelecido em 12, 15 e 17 giros para o primeiro, segundo e terceiro grau de enchimento, respectivamente, de acordo com os resultados de mistura de partículas encontrados por Grajales (2014). Na Tabela 1 são apresentadas estas variáveis com seus respectivos níveis. A variável de resposta foi a atividade de endoglucanase.

Tabela 1 - Variáveis independentes nos experimentos de tolerância do fungo em relação à rotação realizados no protótipo de alumínio.

Variável	Níveis		
Massa de substrato a 75% de umidade (g)	254,78	318,48	382,17
Rotações diárias	0	1	2

3. RESULTADOS

3.1 Experimentos preliminares

As atividades enzimáticas das fermentações realizadas em sacos plásticos de polipropileno com os substratos com e sem pré-tratamento foram 44,43U/mL±7,116U/mL e

68,44U/mL±18,31U/mL, respectivamente. Dado que as fermentações realizadas com o substrato sem pré-tratamento apresentaram valores de atividades enzimáticas ligeiramente superiores às realizadas com o substrato com pré-tratamento, sugere-se que as partículas de pequenas dimensões presentes no bagaço de cana de açúcar sem lavar, denominadas bagacilho, as quais correspondem entre 35 e 45% do bagaço (SOAREZ; ROSELL; 2009), aumentam a área superficial para o ataque das enzimas, e dado que essas partículas possuem entre 27 e 55% de celulose (SILVA; GOMES; ALSINA, 2007), contribuem para o aumento da atividade enzimática. Por este motivo decidiu-se empregar o substrato sem pré-tratamento para todos os experimentos fermentativos realizados neste trabalho.

3.2 Fermentações em biorreator de alumínio

A Tabela 2 sintetiza os resultados para os três graus de enchimento, em termos de atividade enzimática relativa, que representa a razão das atividades enzimáticas obtidas no biorreator pelas atividades enzimáticas dos experimentos sem agitação nos sacos de polipropileno. Observe-se que para o primeiro e segundo grau de enchimento, a rotação do tambor não teve um efeito prejudicial às enzimas, havendo ligeiro aumento da atividade enzimática. No entanto, para o terceiro grau de enchimento o efeito positivo da rotação do tambor foi observado somente para os experimentos realizados com agitação a cada 24 horas, sendo que as atividades enzimáticas obtidas para os experimentos sem agitação e com agitação a cada 12 horas foram inferiores às fermentações realizadas nos sacos de polipropileno. Embora tenha sido observada heterogeneidade das atividades enzimáticas, não é possível sugerir uma tendência definida das mesmas.

Tabela 2 - Atividades enzimáticas relativas para endoglucanases produzidas em biorreator de alumínio.

Graus de Enchimento	Intermitência de Agitação (horas)	Média
0,4	0	1,1
	12	1,0
	24	1,0
0,5	0	1,2
	12	1,2
	24	1,0
0,6	0	0,8
	12	0,7
	24	1,1

Visualmente foi constatado que houve crescimento microbiano, o micélio fúngico ocupou parcialmente os poros interpartículas do meio de cultivo, o que não parece ter comprometido mecanismos de transferência de calor e massa, haja visto os resultados de atividade enzimática anteriormente relatados. Para o terceiro grau de enchimento foi observado um notável aumento no volume do meio fermentativo, que ocupou quase a área total da seção transversal do cilindro, representando uma dificuldade adicional para as grandes cargas de material em biorreatores deste tipo.

Outros microrganismos já foram submetidos ao estresse mecânico obtendo bons resultados dependendo do escopo da pesquisa. Dillon et al. (2012) produziram ácido cítrico por FES em um biorreator de tambor rotativo de 12L, a partir de bagaço de maçã e utilizando o fungo *Aspergillus niger* NRRL567 para fermentações de 12 dias, sendo a maior produção foi obtida quando o microrganismo foi submetido à rotação do tambor a 2rpm a cada 12 horas. Rodriguez-Jasso et al. (2013) estudaram a produção de fucoidanases a partir do fungo *Mucor sp.* 3P, tendo algas como substrato. O estudo foi realizado em um biorreator para FES em escala de laboratório, que girava a 10rpm, constatando que as atividades das fucoidanases foi maior quando o sistema foi submetido à rotação se comparado com o leito estático. Evidentemente, serão necessários estudos estatísticos de repetições mais extensos para que se possa garantir com razoável exatidão as condições operacionais mais favoráveis à metabolização das enzimas mais ativas. No entanto, é possível afirmar-se que o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b é tolerante a agitações moderadas encontradas em um tambor rotativo. Ressalte-se que a frequência de rotação foi de 18rpm, devido às limitações do equipamento, o que tende a aumentar o estresse cisalhante sobre o microrganismo.

4. CONCLUSÕES

As fermentações preliminares, feitas em saquinhos de polipropileno, mostraram que não é necessário realizar o pré-tratamento do substrato - lavagem, secagem, peneiramento e nova hidratação - para obter valores similares ou superiores das atividades enzimáticas de celulases.

As fermentações realizadas no biorreator de alumínio revelaram que o fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b é tolerante à rotação do tambor e as atividades enzimáticas obtidas foram em média superiores às dos sacos plásticos de polipropileno.

5. REFERÊNCIAS

CASCIATORI, F. P. Biorreatores de leito fixo para fermentação em estado sólido: ampliação de escala para produção de celulases de origem fúngica, 2012. 96 f. Tese (Qualificação de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

DILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERM, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial crops and products**, New York, v. 41, p. 78 – 84, 2013.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 113 – 125, 2003.

GHOSE, T K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 59, p. 257 – 268, 1987.

GOES, T.; MARRA, R. A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade. Disponível em: <[www.embrapa.br/.../A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua %20sustentabilidade.pdf](http://www.embrapa.br/.../A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2009.

GRAJALES, L. M. Desenvolvimento de um biorreator rotativo para produção de celulases por fermentação em estado sólido, 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 16, p. 2166 – 2172, 2006.

MORETI, M. Produção de ligno-hemi-celulases por fermentação em estado sólido e avaliação dos efeitos da aplicação das enzimas na composição química e estrutura do bagaço de cana, 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

PANDEY, A. Recent process developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 27, n. 2, p. 109 – 117, 1992.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; MUSSATTO, S. I.; SEPÚLVEDA, L.; AGRASAR, A. T.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Fungal fucoidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate. **Food and bioproducts processing**, Christchurch, v. 91, p. 587 – 594, 2013.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56 – 62, 2014.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27 – 32, 2007.

SHIOTA, V. M. Secagem de celulases de origem fúngica por spray-dryer, 2013. 90 f. Dissertação (Qualificação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

SOARES, P. A.; ROSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia Organosolv**. São Paulo: Nova Série, 2009. p. 29.

UNICA. Área plantada com cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=1360&produto=%C3%81rea+Plantada&anoIni=2011&anoFim=2011&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>>. Acesso em: 10 outubro 2013.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMEIO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora sp.* I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 1536 – 1544, 2012.