

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD)
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS (FCBA)**

HAROLDO MARTINS DE FREITAS

**PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE PELO FUNGO *Byssochlamys
spectabilis* POR MEIO DO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO - CES**

Dourados – MS

2018

HAROLDO MARTINS DE FREITAS

PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE PELO FUNGO *Byssochlamys spectabilis* POR MEIO DO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO - CES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Biotecnologia, para fins de obter aprovação na disciplina. Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Orientador: Profº Dr. Marcelo Fossa da Paz

Coorientador: Profº Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados - MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F866p Freitas, Haroldo Martins De

Produção de β -glicosidase pelo fungo *Byssochlamys spectabilis* por meio do cultivo em estado sólido - CES / Haroldo Martins De Freitas -- Dourados: UFGD, 2017.

28f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcelo Fossa da Paz

Co-orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Cultivo em estado sólido. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Produção. 4. β -glicosidase. 5. Otimização. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Haroldo Martins de Freitas

Produção de β -glicosidase pelo fungo *Byssochlamys spectabilis* por meio do cultivo em estado sólido – CES

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito necessário para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciência Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, pela banca examinadora formada por:

Professor Dr. Marcelo Fossa da Paz
Universidade Federal da Grande Dourados

Professora Dra. Gisele Jane de Jesus
Universidade Federal da Grande Dourados

Doutoranda Gabriéla Finoto Cavalheiro
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 26 de Fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ser meu porto seguro, por nunca desistir de mim e por ter me concedido a graça de ter chegado até aqui.

A minha mãe Roseli Martins de Freitas por ter sido minha mãe e meu pai, pelo amor, por sempre me apoiar, por me dar conselhos e me ajudou mesmo estando longe durante boa parte da graduação, por sempre ligar pra ver como eu estava, por sempre me incentivar a nunca desistir diante dos momentos de dificuldade passados ao longo desses anos e por sempre acreditar em mim, TE AMO MÃE.

Agradeço ao meu pai José Aroldo de Freitas (in memorian) pelos valores morais deixados de herança. Nunca vou esquecer-me do senhor, PAI TE AMO.

Aos meus irmãos Marlon Martins de Freitas e Marcelo Martins de Freitas também pelo incentivo e por me ajudarem quando necessitei tanto de apoio moral quanto de apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz e ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro leite por aceitarem me orientar, pelo conhecimento passado, pela paciência e também por sempre estarem dispostos a esclarecer minhas dúvidas. Aqui fica minha admiração pelos dois e tomara que algum dia eu possa chegar ao nível de profissionalismo e ao nível intelectual que esses professores possuem.

Aos amigos e membros do grupo de pesquisa LEPPER, Ana Carolina da Costa, Gabriela Finoto, Nayra Fernanda, Paula Mirella, Rodrigo Prudente e Tobias Pereira de Moraes pela convivência, ensinamentos e momentos de descontração.

A III turma de biotecnologia da FCBA/UFGD pela amizade, convivência, por ter sido a melhor de todas e também aos professores do curso, pois estes foram espetaculares.

Agradeço a todos o meus amigos, mas em especial aos amigos feitos dentro do curso de biotecnologia, aos meus amigos Caique Fernando, Guilherme Parpinelli, Fabrício Ely, Isaque de Souza Lucas (in memorian), João Fernando, Juliana Justoriz, Karen Kimura, Marcos André, Romulo Rodrigues, Stephany Lillian e Vinicius Camargo que de alguma forma marcaram minha vida, pois estes são os melhores.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	01
2. INTRODUÇÃO.....	02
3. OBJETIVO.....	08
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
4.1 Microrganismo.....	08
4.1.1. Isolamento do microrganismo.....	08
4.1.2. Armazenamento do microrganismo.....	09
4.2. Cultivo em estado sólido para produção de β -glicosidase.....	09
4.3. Inóculo.....	10
4.4. Extração das enzimas.....	10
4.5. Determinação da atividade de β -glicosidase nos extratos enzimáticos.....	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5.1. Produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido de <i>B. spectabilis</i> em diferentes substratos.....	11
5.2. Variações da umidade e tempo de cultivo do <i>B. spectabilis</i> utilizando como substrato o farelo de trigo.....	12
6. CONCLUSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS	17

1. RESUMO

As celulasas são enzimas que constituem um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise, dentro desse complexo enzimático encontram-se as β -glicosidases hidrolisam a ligação β -glicosídica de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos liberando glicose. A produção destas enzimas para a aplicação em grande escala muitas vezes possui elevados custos, uma alternativa para baratear a produção dessas enzimas celulolítica é a utilização de resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção da enzima β -glicosidase pelo fungo *Byssoschlamys spectabilis* por meio do cultivo em estado sólido (CES). O processo fermentativo para determinar a produção inicial de β -glicosidase pelo fungo termofílico *B. spectabilis* ocorreu a 45°C variando diferentes tipos de substratos (casca de arroz, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho e palha de milho), umidade de (50 a 80%) e o tempo de cultivo (24 a 144h). O microrganismo apresentou melhores resultados no CES em farelo de trigo com 65% de umidade em 96h de cultivo, produzindo em torno de 51 U/g. Para a otimização do cultivo envolvendo o farelo trigo foram analisadas a umidade inicial do meio (50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80%) e o tempo de cultivo (24, 48, 72, 96, 120 e 144h), visando determinar as condições ótimas de cultivo para produção de β -glicosidases pelo *B. spectabilis*. A maior atividade foi observada no fungo cultivado em farelo de trigo contendo 55% de umidade inicial por 96 horas, com uma produção de 77 U/g. Dessa forma constatou-se que houve uma maior produção de β -glicosidase passando de 51 U/g para 77 U/g após a otimização do processo de CES, ou seja, totalizando um aumento de cerca de 51% a mais de enzima produzida por grama do substrato pelo fungo *B. spectabilis*.

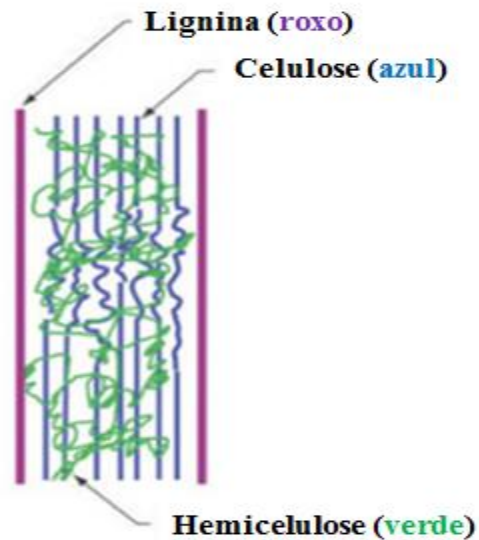
Palavras-chave: Cultivo em estado sólido; Produção; β -glicosidase.

2. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se uns dos principais focos da era biotecnológica, visto que estes microrganismos podem ser utilizados na busca de soluções nas mais diversas áreas como, por exemplo, a de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria, desse modo à utilização de enzimas oriundas de microrganismos vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA et al. 2006).

A biomassa vegetal é composta de lignina, hemicelulose e celulose, figura 1, segundo Sánches (2009) a lignina na biomassa vegetal encontra-se ligada à hemicelulose e celulose formando assim uma barreira na parede celular vegetal de difícil penetração o que acaba dificultando o ataque de microrganismos e a ação de agentes químicos, desse modo à lignina confere além de resistência, impermeabilidade e suporte estrutural a planta.

Figura 1. Estrutura da matéria lignocelulósica.



Fonte: Adaptada de Balat (2011)

As hemiceluloses são polissacarídeos e possuem a função de unir quimicamente a celulose e a lignina, podem ser classificadas de acordo com os principais açúcares presentes, por exemplo, glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas e ao contrario da molécula de celulose as hemiceluloses não possuem regiões cristalinas sendo mais facilmente hidrolisadas (THOMPSON, 1983; BASTAWDE, 1992; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As enzimas presentes nos mais diversos microrganismos principalmente em fungos e bactérias atuam na degradação da matéria orgânica, dando destaque para os fungos filamentosos, pois estes são considerados mais propícios para produção enzimática, uma vez que possuem uma elevada capacidade de secretar enzimas e também devido a sua estrutura, o que lhes conferem uma melhor capacidade de hidrólise (SUN; CHENG, 2002; ARANTES; MILAGRES, 2009; ROSA, 2014).

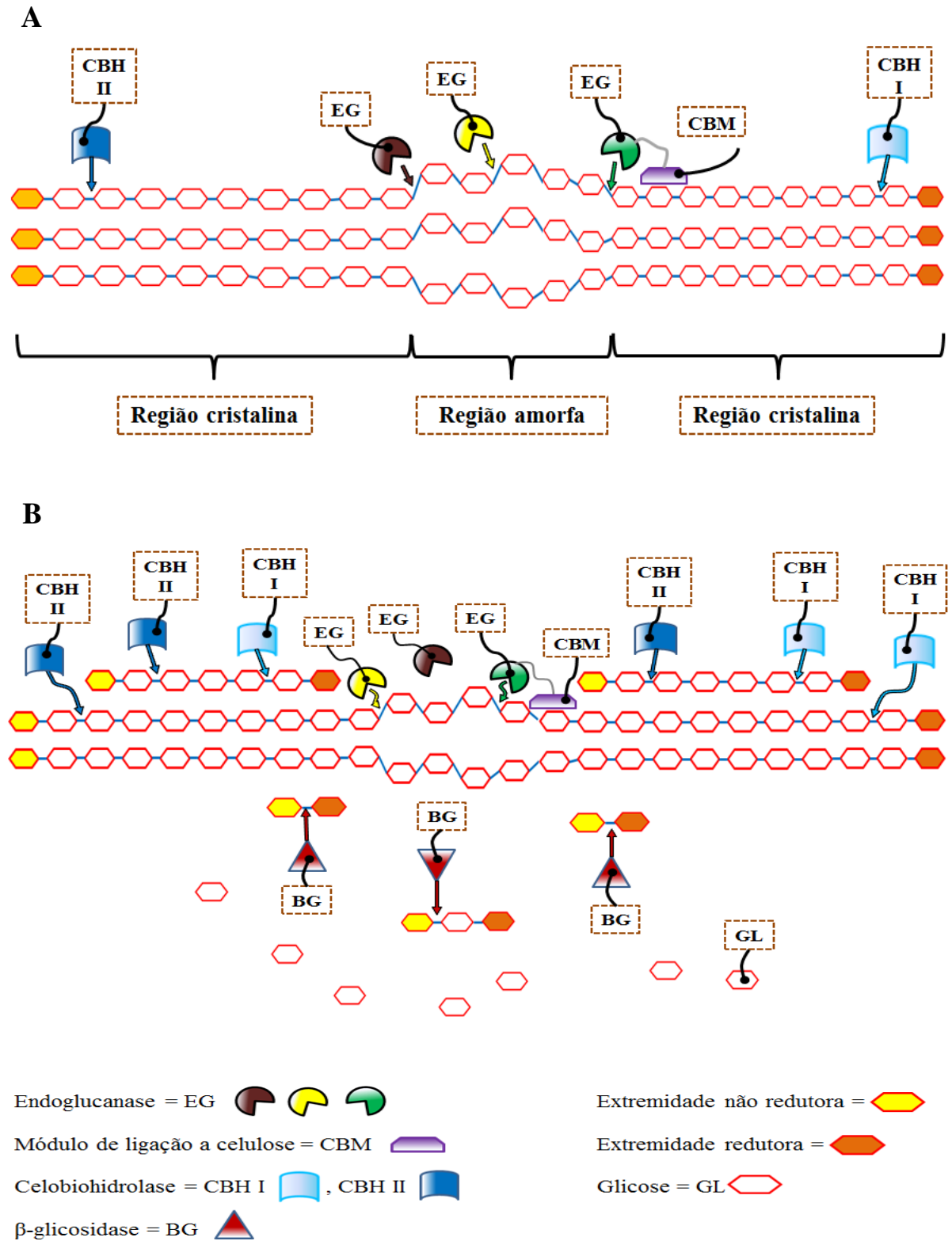
As Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, causando hidrólise dos mesmos. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia, ou seja, as diferentes celulases agem ao mesmo tempo, porém cada uma com sua função, mas com o mesmo objetivo que é a liberação de açúcares, dos quais a glicose que é resultante da hidrólise total da celulose é o açúcar redutor que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND; WEIMER; VAN ZYL, 2002; TOLAN, 2002).

As celulases têm sido utilizadas para melhorar a palatibilidade e textura de alimentos (BIGELIS, 1993), na indústria têxtil para aumentar o brilho do tecido, desbotar o tecido, deixar a superfície do tecido mais lisa (ANDREAUS E CAVACO-PAULO, 2008), na reciclagem de papel, removendo partículas de tintas aderidas a fibra, como agentes enzimáticos para serem utilizadas com aditivos na alimentação animal, como aditivos na indústria de detergentes, entre outros (BHAT, 2000).

Os fungos filamentosos principalmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Phanerochaete*, de acordo com Singhania et al. (2010) industrialmente falando são os mais utilizados na produção de celulases.

Segundo Lehninger (1985) nas regiões amorfas da molécula de celulose as ligações de hidrogênio ocorrem em menor grau, desse modo estas regiões estão relacionadas com a hidrólise da molécula de celulose seja por substâncias químicas ou por via enzimática, pois devido ao fato dessas regiões estarem menos ordenadas acabam por permitir a entrada de enzimas celulolíticas. Por outro lado as regiões cristalinas são menos acessíveis a agentes químicos e enzimáticos, pois estão organizadas na forma de microfibrilas, desse modo conferem resistência a molécula da celulose, ou seja, acabam dificultando a hidrólise. Fan, Lee e Beardmore (1980), estimam que 50 a 90% da molécula de celulose seja constituída de regiões cristalinas, figura 2-A.

Figura 2. Estrutura de uma fibrila da celulose e hidrólise da celulose



Legenda: A- Estrutura de uma fibrila da celulose mostrando a estruturas cristalinas e amorfas e B- Esquema da hidrólise completa da celulose.

Fonte: Adaptada de Phitsuwan et al. (2013).

As endoglucanases agem hidrolisando, ou seja, quebrando as ligações glicosídicas na parte interna da região amorfa da fibra de celulose. Segundo Castro (2010) posteriormente a hidrólise pela endoglucanase ocorre à liberação de oligossacarídeos, desta maneira novos terminais são gerados, sendo um terminal redutor e outro não redutor. Como essas enzimas agem no produto da hidrólise da outra, as exoglucanases agem nas extremidades da fibra de celulose, ou seja, nos terminais redutores e não redutores e dessa forma liberam a celobiose que é formada por dímeros de glicose além de liberar glicose livre, figura 2-B. Por fim as β -glicosidases irão quebrar as ligações químicas existentes entre os dímeros glicose e dessa forma liberar glicose livre.

As β -glicosidases geralmente são classificadas de duas formas, a primeira tem haver com a especificidade que ela apresenta em relação ao substrato, a segunda é baseada na similaridade entre sua sequência de aminoácidos e conformação, que acaba por ser a mais aceita, pois pode refletir as características estruturais, relações evolucionárias e os mecanismos catalíticos (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

As β -glicosidases têm papel fundamental na indústria de alimentos devido à capacidade que essas enzimas possuem de realçar o sabor de bebidas e alimentos, liberar vitaminas e antioxidantes capazes de melhorar a qualidade nutricional de alguns alimentos (FLORINDO, 2015), também são usadas na extração da vanilina a partir da glicovanilina em vagens de baunilha, substituindo processos microbiológicos tradicionais (RANADIVE, 1992; RUIZ-TERÁN; PEREZ-AMADOR; LÓPEZ-MUNGUÍA, 2001), nas plantas essa enzima atua no mecanismo de defesa (XU et al., 2004), nos insetos as β -glicosidases possuem funções digestivas (ZALGROBELNY; BAK; MØLLER, 2008). Portanto, conclui-se que as β -glicosidases possuem inúmeras aplicações e funções.

O CES tem sido uma alternativa para baratear a produção de enzimas microbianas entre elas às celulasas, hemicelulasas, ligninases, entre outras, pois é um bioprocesso que tem sido utilizado em diferentes resíduos provenientes da agroindústria que podem apresentar problemas de disposição final e elevado potencial poluente. Exemplos de resíduos são a palha de arroz (KHAN et al., 2007), farelo de arroz (LATIFIAN; HAMIDI- ESFAHANI; BARZEGAR, 2007), farelo de trigo (CAMASSOLA; DILLON, 2007), bagaço de cana-de-açúcar (MASSADEH et al., 2001; MUTHUVELAYUDHAM e VIRUTHAGIRI, 2006), deste modo segundo Soccol e Vandenberghe, (2003) o CES tem sido apontado como uma importante alternativa para minimizar os impactos ambientais referentes ao descarte inadequado destes resíduos agroindustriais.

Singhania et al. (2009) define o CES como sendo o processo fermentativo que ocorre próximo ou na ausência total de água livre entre as partículas de um substrato sólido. Nesse tipo de cultivo o substrato é utilizado como fonte de carbono e energia ou apenas como um suporte inerte, de modo que quando usado sob esta condição o substrato deve ser enriquecido com outras fontes de carbono e nutrientes. Toda via o substrato deve conter umidade necessária para sustentar o desenvolvimento do microrganismo, sendo que as moléculas de água podem estar nas formas adsorvidas ou ligadas com o substrato sólido.

Resíduos agroindustriais representam uma fonte alternativa para o cultivo em estado sólido de microrganismos, pois visa à redução dos custos dos processos industriais e aplicabilidade desses resíduos para que os mesmos não fiquem sem um destino correto, dessa forma amenizando impactos ambientais.

Os resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos vegetais podem ser utilizados para as mais diversas finalidades, todas com o intuito de dar um destino correto a esses resíduos e dessa forma diminuindo os impactos ambientais causados. Os resíduos originários da agroindústria podem ser empregados na alimentação de ruminantes (CARVALHO, 1992), o rejeito da polpa de eucalipto aliado com outros resíduos e outras fibras são utilizados na fabricação de telhas para cobertura de construções de baixo custo (JUNIOR, 2003), utilização de antioxidantes naturais na indústria de alimentos, provenientes do bagaço da uva resíduo de vinícolas e do bagaço da goiaba proveniente da indústria de sucos como uma alternativa de substituir os de origem sintética (MELO et al, 2011).

O arroz é um dos principais alimentos presentes na mesa dos brasileiros. Para que o arroz chegue aos pontos de venda logicamente este precisa ser colhido e posteriormente pré-limpo, seco, armazenado e beneficiado, porém desde o processo de colheita até o processo de beneficiamento do grão de arroz há a geração de uma série de resíduos ou subprodutos. Para Amato (2002), os principais resíduos desse processo são: a casca do arroz, o farelo e os grãos quebrados (quirera). Dando destaque para casca desse grão, pois quando eliminada na natureza pode causar desequilíbrios ambientais, devido sua absorção natural ser muito lenta, (MAYER; HOFFMANN; RUPPENTHAL, 2006), porém podendo ser aplicada para o CES de microrganismos.

O bagaço de cana é resíduo mais abundantemente produzido, considerado como uma extraordinária fonte de material lignocelulósico, desse modo acaba sendo uma alternativa significativa para o aumento da produção de etanol, também tem utilidade como substrato para o cultivo de microrganismos, sendo constituído de aproximadamente por 15% de celulose,

38% hemicelulose, 28% lignina e 18% proteínas e cinzas (FLORENTINO; MORENO; SARTORI, 2008; REYES; PERALTA-ZAMORA; DURÁN, 1998; CANILHA et al., 2010; VASQUEZ, 2007; DING; HIMMEL, 2006). O bagaço da cana-de-açúcar pode ser empregado como ração animal, especialmente para ruminantes e na cogeração de energia elétrica (COSTA; BOCCHI, 2012), as cinzas resultantes da queima do bagaço são utilizadas para a fabricação de cimento substituindo a areia, as fibras como uma nova fonte para a produção do fibroconcreto dessa maneira substituindo as fibras de amianto que devido ao fato de serem muito pequenas e finas e levando em consideração o longo tempo de exposição podem ocasionar problemas pulmonares (UNICA, 2011; COUTTS, 2005) esse resíduo também pode ser utilizado para a produção do etanol de segunda geração.

Na cultura do milho indiferentemente das outras culturas também há a geração de resíduos, tais como folha, colmo, sabugo e a palha, dando destaque para os dois últimos. Estima-se que para cada 100 kg de milho aproximadamente 18 kg são de sabugo (TORRE et al., 2008; TSAI et al., 2000). O sabugo de milho assim como muitos outros resíduos de origem agroindustrial, também pode ser utilizado para a produção de ração animal, alimentação bovina, na confecção de feno, adubo, bem como para o cultivo em estado sólido de microrganismos, contudo, seu potencial ainda não foi totalmente explorado (SILVEIRA, 2010; ZIGLIO et al., 2007).

O farelo de trigo é um resíduo da moagem do trigo, porém devido as suas qualidades nutricionais é amplamente comercializado (SWENNEN et al., 2006). Dentre alguns exemplos que se pode dar da utilização do farelo de trigo é como ração animal, em produtos integrais fabricados através da farinha integral tais como pães, bolos e massas que acabam por possuir um maior valor devido ao fato que este tipo de produto tende a ser mais saudável, devido a sua rica composição este resíduo pode ser usado para a obtenção de produtos com alto valor agregado (LEÃO D.P., 2013). Pode-se citar como exemplo a produção de enzimas como um processo que gera um produto de alto valor agregado.

De acordo com todo conteúdo exposto anteriormente pode-se concluir então que os resíduos agroindustriais por serem abundantes em celulose são uma grande alternativa para o barateamento dos custos de produção das enzimas microbianas o que acaba por contribuir também na redução dos custos finais dos processos nos quais as enzimas serão empregadas.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi otimizar da produção da enzima β -glicosidase pelo fungo *B. spectabilis* por meio do cultivo em estado sólido - CES.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

4.1.1. Isolamento do Microrganismo

O microrganismo foi coletado de um fruto natural do cerrado denominado de seriguela, dentro da região de Dourados/MS. Para o processo de isolamento do fungo foi retirado e pesado um pequeno fragmento da fruta de aproximadamente 1g contendo os esporos do fungo. Tubos de ensaio contendo solução salina para realizar as diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram esterilizados em autoclave a 121 C por 20 min. Posteriormente o fragmento da fruta com os esporos foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), agitado no equipamento vórtex com a pretensão de que ocorresse o desprendimento dos esporos do microrganismo para o meio, a esta etapa denominou-se (diluição 10^{-1}), posteriormente retirou-se 1 mL da diluição 10^{-1} e adicionou-se em um outro tubo contendo 9 mL de salina esterilizada, agitou-se o tubo novamente no vórtex com o intuito de se homogeneizar o prospectado com a solução salina (diluição 10^{-2}) e dessa maneira sucessivamente até a diluição 10^{-4} . O processo de diluição seriada foi feito com a finalidade de diminuir a concentração de células presentes no meio e assim fazendo com que ocorra a formação de colônias de fungos mais puras/mais isoladas.

Posteriormente a diluição dos microrganismos ocorreu o plaqueamento, onde foi adicionado 200 μ L das respectivas diluições no centro de placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. mais 0,25 g/L de antibiótico tetraciclina e com o auxílio de uma alça de Drigalski espalhou-se o conteúdo por todo o perímetro da superfície do meio cultura contido na placa. Ao todo foram utilizadas 12 placas sendo realizadas triplicatas para cada diferente diluição, posteriormente essas placas foram transferidas para incubadoras B.O.D. em diferentes temperaturas (28°C, 35°C e 45°C) para a avaliação do melhor crescimento do microrganismo a ser isolado

constatando-se assim que o mesmo se caracterizou como sendo um fungo termofílico, ou seja, resistente a temperaturas acima de 45°C.

4.1.2. Armazenamento do Microrganismo

Após o crescimento a cultura foi transferida para 4 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Sabouraud inclinado cada e posteriormente levados para incubadora B.O.D a 45°C durante 72 horas para o desenvolvimento do microrganismo, transcorrido esse período os tubos contendo o microrganismo foram armazenados no banco de linhagens fúngicas no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, LEPPER/FCBA/UFGD, de maneira que dois dos 4 tubos foram adicionados óleo mineral até cobrir o fungo e mantidos em refrigerador tendo como finalidade a estocagem do mesmo, os outros dois tubos restantes contendo somente o meio de cultura com o fungo termofílico também foram armazenados em refrigerador, porém com o objetivo de manutenção mensal da cepa. Inicialmente, o microrganismo foi denominado como isolado 45 até a sua respectiva identificação como sendo o fungo *Byssochlamys spectabilis*.

4.2. Cultivo em Estado Sólido para a produção de β -glicosidase

Inicialmente todos os substratos foram lavados para a retirada de açúcares redutores, pois a presença desses açúcares pode inibir a produção da enzima pelo fungo. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5 g de substrato umedecido com solução nutriente composta de 0,1% de sulfato de amônia, 0,1% sulfato de magnésio heptahidratado e 0,1% nitrato de amônia, onde % = (m/v). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. O processo fermentativo do substrato ocorreu na temperatura de 45°C. Os parâmetros como: diferentes substratos (casca de arroz, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho e palha de milho), umidade inicial do meio (50% a 80%) e o tempo de cultivo (24 a 144 h) foram avaliados para se determinar as melhores condições de cultivo e produção da enzima β -glicosidase por meio da linhagem fúngica escolhida.

4.3. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose inclinado que fora previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. O fungo termofílico *B. spectabilis* foi mantido por 72 horas a 45°C em estufa B.O.D., a suspensão do microrganismo foi obtida através da raspagem suave da superfície do meio de cultura, logo após foi empregando 25 mL de solução nutriente devidamente esterilizada. A inoculação do fungo nos substratos se deu pela transferência de 5 mL do inóculo para os frascos Erlenmeyers contendo os resíduos agroindustriais também previamente autoclavados a 121 °C por 20 min. e que serviram como meios de produção/cultivo.

4.4. Extração das enzimas

Depois do desenvolvimento do microrganismo foi adicionado 50 mL de água destilada esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 min. nos frascos Erlenmeyer contendo os meios fermentados, os micélios foram quebrados utilizando-se um bastão de vidro. Em seguida essa mistura contendo a água, o substrato fermentado e os micélios fúngicos foi colocada sob agitação orbital em Shaker durante o período de 1 hora, a temperatura de 25°C, a 100 rpm. O conteúdo enzimático proveniente de cada substrato foi filtrado em um tecido sintético de nylon, popularmente chamado de ``voal`` e mantidos em tubos falcon de 50 mL. Os tubos falcon contendo os conteúdos enzimáticos foram centrifugados 1500 x g por 5 min. O precipitado oriundo dessa centrifugação foi desprezado e o sobrenadante foi considerado o extrato enzimático bruto, sendo utilizado nos ensaios seguintes.

4.5. Determinação da atividade de β -glicosidase nos extratos enzimáticos

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando 50 μ L do extrato enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio (0,1M, pH 5,0) e 250 μ L do substrato sintético p-nitrofenil β -Dglicopiranosídeo (pNP β G, Sigma) (4mM), reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C, a reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio (2 M). O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria, onde a leitura foi regulada para 410 nm. Desse modo a atividade enzimática foi expressa em U/g do substrato nas condições

do experimento, onde uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido de *B. spectabilis* em diferentes substratos.

Para a produção de β -glicosidase foram avaliados os seguintes substratos: farelo de trigo, farelo de soja, palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana, os resultados para as respectivas produções estão expressos na tabela 1.

Tabela 1. Produção de β -glicosidase em diferentes substratos através do cultivo em estado sólido pelo fungo termofílico *Byssochlamys spectabilis*, em 96 horas de cultivo, contendo 65% de umidade a 45°C.

Substratos	<i>B. spectabilis</i>	<i>B. spectabilis</i>
	U/mL	U/g
Farelo de trigo	5,100	51 \pm 0,75
Farelo de soja	0,110	1,1 \pm 0,40
Palha de milho	0,190	1,9 \pm 0,95
Sabugo de milho	0,110	1,1 \pm 0,05
Casca de arroz	0,025	0,25 \pm 0,00
Bagaço de cana	0,170	1,7 \pm 0,10

Fonte: O autor.

Como demonstrado na tabela, houve o crescimento do *B. spectabilis* e a produção de β -glicosidase em todos os substratos testados. Para a escolha dos substratos a serem utilizados sempre se leva em consideração a composição, natureza, o custo e disponibilidade dos mesmos (COUTO; SANROMÁN, 2005; BASSO; GALLO; BASSO, 2010).

Apesar do crescimento ter sido satisfatório em todos os substratos testados a maior produção da enzima ocorreu no farelo de trigo 51 U/g e a menor produção se deu no substrato de casca de arroz 0,25 U/g. Isso mostra que é bastante importante a escolha do substrato a ser aplicado no CES, portanto, constatou-se que o substrato mais propício para dar seguimento no processo de otimização do CES para a produção da enzima β -glicosidase pelo fungo *B. spectabilis* foi o farelo de trigo, dessa forma corroborando com outros trabalhos descritos na

literatura, onde os autores também afirmam que o farelo de trigo é o melhor substrato para a produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido.

Leite et al. (2008) ao cultivarem o fungo *Thermoascus aurantiacus* por 96 horas a 50 °C em diferentes substratos também obtiveram a maior produção de β -glicosidase no cultivo de farelo de trigo com aproximadamente 5,8 U/mL o que equivale a 58 U/g.

Santos (2014) relata que ao testar a produção de β -glicosidase do fungo *Penicillium sp* em diferentes substratos de originários da agroindústria por CES sob condições de 60% de umidade durante 96h a 28 °C, também observou que a maior produção da enzima ocorreu no cultivo do farelo de trigo, produzindo 39, 93 U/g. O interessante é que no trabalho desta autora o CES do farelo de trigo resultou também numa ótima produção de CMCase 212,33 U/g e Xilanase 562,57 U/g.

Garcia (2014) também confirma em seu trabalho que o farelo de trigo obteve o maior êxito na produção de β -glicosidase por meio do CES do fungo *Lichtheimia ramosa*, produzindo 162,2 U/g (16,22 U/mL) sob condições de 75 % de umidade, 96 h de cultivo a 28 °C.

Leite, Gomes e Silva (2007) afirmam que o farelo de trigo por possuir em sua composição cerca de 14% de proteína, 27% de carboidratos, 05% de minerais, 06% de gordura e 17% de vitaminas do complexo-B, acaba por favorecer o desenvolvimento dos microrganismos e conseqüentemente a produção de enzimas.

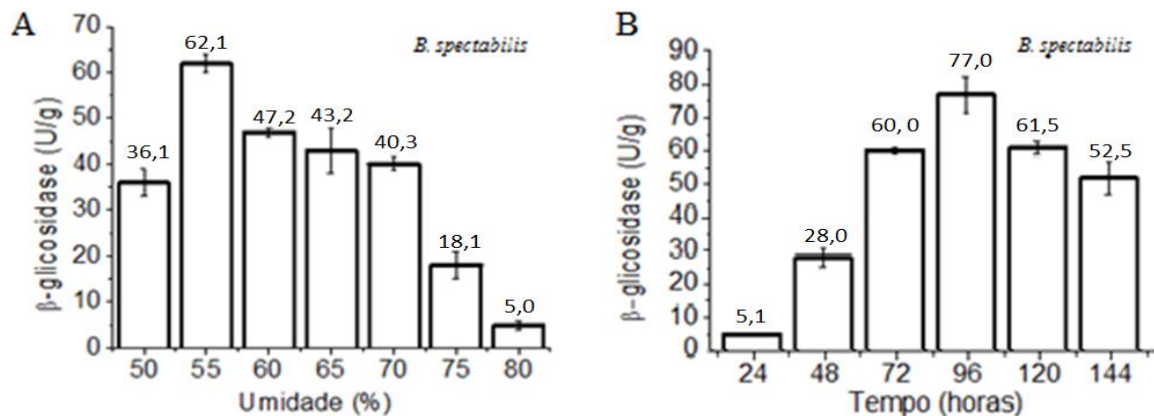
5.2. Variações da umidade e tempo de cultivo do *B. spectabilis* utilizando como substrato o farelo de trigo.

Na otimização do processo de cultivo, O fungo *B. spectabilis* foi cultivado em diferentes condições de umidade (50 a 80%) (Gráfico 1 A), e posteriormente submetido ao crescimento durante um período de 24 em 24h até o limite de 144 h (Gráfico 1 B). Desse modo, a variação da umidade resultou em uma maior produção da enzima no farelo de trigo cultivado a 55% de umidade.

Se tratando da umidade, esta pode influenciar na síntese e secreção de enzimas extracelulares, assim sendo é considerada um dos fatores que estão diretamente ligados ao melhor crescimento e atividade microbiana, porém elevadas taxas de água diminuem a porosidade do substrato comprometendo o desenvolvimento micelial e favorecendo a contaminação do meio de cultivo por bactérias, já a umidade muito baixa pode comprometer o

acesso aos nutrientes, portanto, altas e baixas taxas de umidade são prejudiciais para o desenvolvimento do microrganismo (ELLAIAH et al., 2002; PANDEY; SOCCOL; MITCHEEL, 2000; PANDEY, 2003).

Gráfico 1. Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido pelo *B. spectabilis* em farelo de trigo.



Legenda: **A** - Produção de β -glicosidase em função da umidade inicial do meio. **B** - Produção de β -glicosidase em função do tempo de cultivo.

Fonte: O Autor.

Na otimização do processo, dentre os valores de umidade avaliados a maior produção de β -glicosidase ocorreu no substrato farelo de trigo para a umidade inicial de 55 %. No trabalho de Brijwani, Oberone e Vadlani (2010) a maior produção de β -glicosidase foi em 70% de umidade com 10,71 U/g produzidas, o substrato utilizado para o CES misto dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* foi um mix de casca de soja e farelo de trigo.

Santos (2014) em sua avaliação da umidade do meio constatou que a melhor taxa de umidade inicial para a produção da enzima β -glicosidase no farelo de trigo pelo fungo *Penicillium sp* foi de 55% com um produção de 31,4 U/g.

Segundo Singhania et al. (2009) a umidade do meio estando entre 40 a 60% já é o suficiente para o crescimento fúngico, pois esses valores são similares aos encontrados na natureza. Portanto, este trabalho se encontra dentro dos valores de umidade considerados satisfatórios.

Na avaliação do tempo de cultivo para a otimização, as amostras foram retiradas a cada 24 horas até atingir o tempo total de 144h . O ápice para a produção de β -glicosidase foi obtido com 96 h de cultivo, produzindo 77 U/g de substrato ou 7,7 U/mL, tabela 2. Após o período de 96h de cultivo notou-se a perda da atividade enzimática. Haq, Javed e Khan (2006) dizem que esse fato ocorre devido à liberação de subprodutos oriundos da fermentação do

substrato de cultivo o que acarreta em interferências tanto na síntese proteica como na atividade enzimática.

No trabalho de Garcia (2014) a maior produção da enzima β -glicosidase foi obtida em 96 horas de cultivo a 35 °C, utilizando farelo de trigo como substrato para o CES do fungo *Lichtheimia ramosa*. Produzindo 274,0 U/g de substrato.

Delabona et al. (2012) constataram em seus experimentos que o auge para a produção de β -glicosidase se deu em 96 h de cultivo do fungo *Aspergillus fumigatus* em farelo de trigo, produzindo 105,82 U/g de substrato.

Santos (2014) demonstrou em seu trabalho que atividade de β -glicosidase em farelo de trigo se mostrou mais expressiva entre 120 e 144 horas de cultivo do fungo *Penicillium sp*, produzindo 69,4 U/g (6,94 U/mL).

Adsul et al. (2004) em seu trabalho relatam uma produção de β -glicosidase de 23 U/g em 196 h de cultivo, utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar para o cultivo em estado sólido do fungo *Penicillium janthinellum*.

Dados da literatura apresentam valores de produção de β -glicosidase menores ou próximos dos descritos neste trabalho, corroborando assim para a validação e importância dos resultados descritos, tabela 2.

Tabela 2: Produção de β -glicosidase de diferentes linhagens fúngicas e em condições de cultivo otimizadas.

Linhagem	Substrato	Condição (CES)	Atividade β-glicosidase	Autor (es)
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	Farelo de trigo	55% e 96 h	77 U/g	Este trabalho
<i>Lichthemia corymbífera</i>	Farelo de trigo	75% e 144 h	39 U/g	Morais et al., (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	60% e 72 h	62,3 U/g	Pirota et al., (2014)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de trigo	55 % e 120-144 h	69,4 U/g	Santos (2014)
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	65% e 96 h	274,0 U/g	Garcia (2014)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Farelo de trigo	75% e 120 h	13 U/g	Leite et al. (2008)

Continua...

Continuação tabela 2.

Linhagem	Substrato	Condição (CES)	Atividade β-glicosidase	Autor (es)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	60% e 72 h	70 U/g	Leite et al. (2008)
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	120 h	172,6 U/g	Golçalves et al. (2013)
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Pequi	48 h	0,61 U/g	Silva et al. (2013)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Farelo de trigo	96 h	105,82 U/g	Delabona et al. (2012)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Bagaço de cana	192 h	23 U/g	Adsul et al. (2004)

Fonte: Adaptação construída pelo autor.

Ao comparar este trabalho com o de Santos (2014) constata-se que o *B. spectabilis* foi mais produtivo que o *Penicillium sp* no farelo de trigo, além de precisar de um menor tempo de cultivo para atingir seu auge de produção, mas quando comparado com trabalho de Adsul et al. (2004) que utilizam como substrato o bagaço de cana para o cultivo do *Penicillium janthinellum*, confirma-se o que já havia sido dito anteriormente que o farelo de trigo se sobressai em relação aos outros substratos, pois além da produção de β -glicosidase pelo *B. spectabilis* ser superior o tempo de cultivo para se atingir o auge da produção foi menor que o do trabalho comparado.

Após a otimização do processo de cultivo, constatou-se que a produção de β -glicosidase do *B. spectabilis* em farelo de trigo aumentou de 51 para 77 U/g de substrato nas condições de 55% de umidade a 50°C durante 96 horas de cultivo, portanto, resultando no aumento de 50,98 (51%) de produção. Vale ressaltar que além do aumento da produção da enzima, também há a redução do tempo de cultivo do *B. spectabilis* para produção da enzima β -glicosidase, conclui-se então que a redução do tempo de produção para um processo industrial é de grande importância, pois contribui para a redução do custo da enzima de interesse, portanto, favorecendo sua aplicação em larga escala.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o fungo termofílico *B. spectabilis* apresentou uma significativa produção da celulase β -glicosidase no cultivo em estado sólido do farelo de trigo.

Obteve-se um o aumento de 51 % de produção de β -glicosidase pelo fungo *B. spectabilis* em CES. O tempo de produção da enzima estudada foi relativamente baixo em comparação com outros trabalhos descritos na literatura o que torna o fungo *B. spectabilis* viável para sua aplicação em processos industriais.

Pode-se confirmar então que os resultados encontrados nesse trabalho são condizentes com os presentes na literatura.

7. REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.
- AMATO, G.W. **Casca**: agregando valor ao arroz. Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA). Porto Alegre, RS, 2002. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: 07/ fevereiro/2018.
- ANDREAUS, J.; CAVACO PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxtil, In: BOM, E.P.S.; Ferrara, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado, Rio de Janeiro, Interciência, p. 179-200, 2008.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BASSO T.P.; GALLO C.R.; BASSO L.C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar, **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, 2010.
- BASTAWDE, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiol.and Biotechnol**, v. 8, p.353-368, 1992.
- BIGELIS, R. Carbohydrases, In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**, 3 ed. San Diego: Academic, p. 121-158, 1993.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology, **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-83, 2000.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbiological β -glucosidase: Cloning properties, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado, Rio de Janeiro, **Interciência**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CAPES, FAPERJ, FCT (Portugal), 2008.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 120-128, 2010.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 2196-2204, 2007.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 8, p. 48-54, 2010.

CARVALHO, F.C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas, **Informações Econômicas**, SP, v. 22, n. 2, p. 31-46, 1992.

CASTRO, A.M. Produção, propriedades e aplicação das celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

COSTA, W.L.S.; BOCCHI, M.L.M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, v.4, n.1, p. 1-13, 2012.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

COUTTS, R.S.P. A review of Australian research into natural fibre cement composites. **Cement & Concrete Composites**, n. 27, p. 518-526, 2005.

DELABONA, P.D.S; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon Forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DING, S.Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

ELLAIHAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, p.615-620, 2002.

FAN, L.T.; LEE, H.Y.; BEARDMORE, D.H. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. **ADV. Biochemical Engineering.**, v. 14, p. 101-117, 1980.

FLORENTINO, H. DE O.; MORENO, E. V.; SARTORI, M. M. P. Multiobjective optimization of economic balances of sugarcane harvest biomass. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 561-564, 2008.

FLORINDO, R.N. **β -glicosidases das famílias GH 1 e GH 3: caracterização estrutural, bioquímica e mecanismos estruturais de transglicosilação**, 150 f, 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

GARCIA, N.F.L. **Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduos agroindustriais: caracterização e propriedades catalíticas do extrato enzimático**. 2014. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

GONÇALVES, F.A.; LEITE, R.S.R., RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E.J.S.; FONSECA, G.G. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 377-384, 2013.

HAQ, I.; JAVED, M.M.; KHAN, T.S. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-1 and *Trichoderma viride* MSK-10. **African Journal of Biotechnology**, v. 5 (8) p. 609-614, 2006.

JUNIOR, H.S. Capítulo 4: Sistemas de cobertura para construções de baixo custo: Uso de fibras vegetais e de outros resíduos agroindustriais. **Coletânea Habitar**, Utilização de resíduos na construção habitacional, Porto Alegre – RS, v. 4, p. 107, 2003.

KHAN, M.H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 42, p. 381-386, 2007.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v.98, p.3634-3637, 2007.

LEÃO D.P. **Avaliação comparativa do potencial de farelo de trigo comercial e pericarpo de pequi como substratos na produção de fibras com capacidade antioxidante**, 88 f. 2013, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LEHNINGER, A.L. **Biochemistry**: The molecular basis of cell structure and function. New York: Worth Publishers, 1985, 833p.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LEITE, R.S.R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1101-1106, 2007.

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; Pretorius, I. S.; **Microbiology and Molecular and Biology Review**, v. 66, p. 506, 2002.

MASSADEH, M.I.; YUSOFF, W.M.W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1771-1774, 2001.

MAYER, F.D.; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J.E. Gestão Energética, Econômica e Ambiental do Resíduo Casca de Arroz em Pequenas e Médias Agroindústrias de Arroz. In:

XIII SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO DA UNESP (XIII SIMPEP), 13. Bauru, SP. **Anais eletrônicos...** Bauru: UNESP, 2006.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MORAIS, T.P.; BARBOSA, P.M.G.; GARCIA, N.F.L.; FONSECA, G.G.; PAZ, M.F.; LEITE, R.S.R. **Produção, purificação parcial, caracterização enzimática e termodinâmica da β -glicosidase de *Lichtheimia corymbífera* e *Byssoschlamys spectabilis*, 2015**, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p.1873-1881, 2006.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINI F.F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais** #7. Outubro 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCOOL, C.R.; MITCHEEL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products, **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

PHITSUWAN, P.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O.; KYU, K.L.; RATANAKHANOKCHAI, K. (2013). Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. **Folia Microbiologica**, 58(2), 163-176. <http://doi.org/10.1007/s12223-012-0184-8>

PIROTA, R.D.P.B.; DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using enzyme extract and whole solid-state fermentation medium of two newly isolated strains of *Aspergillus oryzae*. **Chemical Engineering**, v. 38, p.259-264, 2014.

RANADIVE, A.S. Vanilin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1922-1924, 1992.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

ROSA, I.Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**, 77 f, 2014, Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, 2014.

RUIZ-TERÁN, F.; PEREZ-AMADOR, I.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic extraction and transformation of glucovanilin to vanilin from vanilla green pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 5207-5209, 2001.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advance**, v. 27(2), p. 185-94, 2009.

SANTOS, F.R.S. **Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense**, Dissertação (Mestrado em Ciência E Tecnologia Ambiental), 2014, 68 f., Faculdade e Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SILVA, C.A.A.; LACERDA, M.P.F.; LEITE, R.S.R.; FONSECA, G.G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid-state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-9, 2013.

SILVEIRA, R. F. de M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**, 2010, 86 f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : A review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SWENNEN, K.; COURTIN, C.M.; LINDEMANS, G. CJE; DELCOUR, J.A. Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinooligosaccharides, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p.1722-1731, 2006.

THOMPSON, N.S. Hemicellulose as a biomass resource. In: Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals. Soltes, Journal. (ed), **Journal New York, Academic Press**, p. 101-119, 1983.

TOLAN, J.S. Logens process for producing ethanol from cellulosic biomass. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 3, n. 4, p. 339-345, 2002.

TORRE, P.; ALIAKBARIAN, B.; RIVAS, B.; DOMÍNGUEZ, J.M.; CONVERTI, A. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 40, p. 500-506, 2008.

TSAI, W.T.; CHANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHANG, C.F.; CHIEN, S.F.; SUN, H.F. Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresour. Technol.**, v. 78, p. 203-208, 2000.

UNICA, União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Bagaço de cana pode ganhar valor substituindo areia na construção civil**. 04/02/2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 04/Fev/2012.

VASQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 205f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

XU, Z.; ESCAMILLA-TREVINO, L.L.; ZENG, L.; LALGONDAR, M.; BEVAN, D.R.; WINKEL, B.S.J.; MOHAMED, A.; CHENG, C.; SHIH, M.; POULTON, J.E.; ESEN, A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 343-367, 2004.

ZALGROBELNY, M.; BAK, S.; MØLLER, B.L. Cyanogenesis in plants and arthropods. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1457-1468, 2008.

ZIGLIO, B.R.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaborações de pães com sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 117-128, 2007.