



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS



Produção de β -glicosidase pelo fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa* utilizando resíduos agroindustriais por Cultivo em Estado Sólido (CES)

Flávia Regina da Silva Santos

DOURADOS, MS
2011

Flávia Regina da Silva Santos

Produção de β -glicosidase pelo fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa* utilizando resíduos agroindustriais por Cultivo em Estado Sólido (CES)

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação do Prof. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

DOURADOS, MS
2011

Dedico:

À Deus, aos meus pais e amigos.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente,
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por guiar meus caminhos e conceder saúde sempre.

Aos meus pais Vanda e Laudelino, e minha irmã Claudia por todo amor e força que sempre precisei.

Ao professor Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pela orientação, aprendizagem ao longo desses anos, confiança e dedicação desde o começo.

Ao professor Dr. Marcelo Fossa da Paz pela oportunidade e confiança concedida.

Aos meus amigos mais queridos por sempre estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins, Bruna, João, Juliana, Joyce, Natiele, Gleyson, Everton, Nayara, Patrícia, Jessica, Gisele, Claudia e Andressa.

À Universidade Federal da Grande Dourados por oferecer a estrutura necessária.

A todos que estiveram ao meu lado no laboratório e que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho, principalmente a Nayara Fernanda Lisboa Garcia, que esteve ao meu lado, pela amizade e ajuda, sem qual esse trabalho não seria o mesmo. À técnica de laboratório Fabiana Gomes da Silva, por sua paciência e dedicação. Ao professor Gustavo Graciano Fonseca, e ao Fabiano Avelino Gonçalves pela contribuição no processo desse trabalho.

E à todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Celulose	3
2.2. Enzimas celulolíticas.....	3
2.3. Microrganismos celulolíticos.....	4
2.4. Fungos filamentosos.....	5
2.5. Enzimas microbianas.....	5
2.6. Aplicações industriais da β -glicosidase	6
2.7. Cultivo em Estado Sólido (CES).....	8
2.8. Vantagens e desvantagens do CES).....	9
2.9. Produção de β -glicosidase por microrganismos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismo utilizado	11
3.2. Inóculo.....	11
3.3. Produção β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES).....	12
3.3.1. Seleção de substratos.....	12
3.3.2. Determinação da melhor umidade.....	12
3.3.3. pH inicial do meio.....	12
3.3.4. Melhor temperatura para o cultivo.....	12
3.3.5. Tempo de cultivo.....	13
3.4. Extração da enzima.....	13
3.5. Determinação da atividade de β -glicosidase.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Seleção de substratos para a produção da enzima.....	14
4.2. Variação da umidade do meio de cultivo.....	15
4.3. Efeito do pH para a produção de enzima.....	16
4.4. Temperatura ótima para a produção da enzima	17
4.5. Tempo de cultivo.....	18

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
6. REFERÊNCIAS.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da celulose	3
Figura 2: Produção de β -glicosidase em função da umidade inicial do meio de cultivo.....	15
Figura 3: Produção de β -glicosidase em função do pH inicial do meio de cultivo.....	16
Figura 4: Produção de β -glicosidase pelo fungo <i>L. ramosa</i> em função do tempo de cultivo	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de β -glicosidase pelo fungo *L. ramosa* em diferentes substratos por CES.14

Tabela 2: Produção de β -glicosidase em função da temperatura de cultivo.....17

LISTA DE ABREVIATURAS

CES: Cultivo em Estado Sólido

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

pNPβG: p-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo

RPM: Rotações por minuto

I. RESUMO

A atividade agrícola que o Brasil desempenha o faz ser um dos países que mais produzem resíduos agroindustriais, e geram grandes volumes de resíduos, sendo necessário o melhor aproveitamento desses resíduos. Esses podem ser utilizados para serem convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

O Cultivo em Estado Sólido é muito atrativo por utilizar esses resíduos agroindustriais como substratos, e os fungos filamentosos apresentam grande potencial para a produção de enzimas de interesse biotecnológicos.

As β -glicosidases são enzimas que possuem diferentes aplicações biotecnológicas. Essas enzimas hidrolisam celobiose liberando monômeros de glicose que podem ser utilizados em bioprocessos para a produção de etanol. Apresentam aplicabilidade nas indústrias de alimentos e bebidas, aumentando a funcionalidade e valor nutricional de alimentos derivados de soja e realçando a qualidade aromática de sucos e vinhos.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de β -glicosidase pelo fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa*, isolado do solo do Cerrado, utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos em Cultivo em Estado Sólido (CES). Podemos concluir que o fungo *Lichtheimia ramosa* apresenta potencial para a produção da enzima β -glicosidase, onde a maior produção de β -glicosidase, cerca de 5.1U/mL, foi obtida pelo cultivo do micro-organismo em farelo de trigo com 60% de umidade, em pH inicial igual a 6,0, após 168 horas de cultivo a 30°C. Esta enzima apresenta grande interesse biotecnológico e a ausência de trabalhos

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sócio-econômico e a evolução dos hábitos e modos de vida geram consumo excessivo, conduzindo a um uso indiscriminado dos recursos e à geração de grandes volumes de resíduos (ZENI; PENDRAK, 2006). O aumento populacional resulta em inevitável necessidade de criarmos novas fontes de alimentos, o que só será possível, com melhor aproveitamento dos recursos naturais. A grande atividade agrícola que o Brasil desempenha, o faz ser um dos países que mais produzem resíduos agroindustriais (VILLAS BÔAS; ESPOSITO, 2000). Estes resíduos são abundantes e podem ser utilizados para a produção de glicose e de produtos derivados (AGUIAR; MENEZES, 2002).

A celulose, principal componente de paredes vegetais, é o polímero mais abundante na Terra, é uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de combustíveis, alimentos, entre outros produtos. Nesse sentido, materiais lignocelulósicos naturais têm sido considerados promissores devido à sua abundância, disponibilidade e baixo custo (RYU; MANDELS, 1980; SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; BHAT; BHAT, 1997; LYND et al., 2002; ARO et al., 2005).

A hidrólise enzimática da celulose em açúcares fermentescíveis é um processo que envolve a ação de um complexo multienzimático denominado complexo celulolítico.

A β -glicosidase é uma importante enzima do complexo celulolítico, sendo responsável pela hidrólise da celobiose a glicose. Com isso, reduz o efeito inibidor da celobiose sobre as outras enzimas celulolíticas, desempenhando o controle da velocidade global da reação de hidrólise celulósica (PARRY et al., 2001).

Portanto, a função desempenhada pela β -glicosidase no processo de degradação enzimática da celulose faz com que esta enzima apresente grande potencial para a indústria de etanol. Deste modo, pesquisas com β -glicosidases microbianas associadas a demais enzimas celulolíticas podem contribuir para viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose (PARRY et al., 2001).

Considerando que, a composição do meio de cultivo influencia diretamente o preço final da enzima, faz-se necessário a busca de substratos de baixo custo para os bioprocessos. Nesse contexto, o Cultivo em Estado Sólido é bastante atrativo, devido ao

uso de resíduos agroindustriais para o cultivo e produção de enzimas microbianas (GRAMINHA et al., 2008; PALMA, 2003).

Diversos parâmetros, entre eles a seleção de micro-organismos e substratos e a determinação das condições ótimas de cultivo devem ser avaliados para o desenvolvimento de qualquer processo de CES, a fim do seu sucesso e viabilizá-lo, uma vez que estes influenciam na concentração do produto, produtividade e rendimento final (HECK et al., 2005; ADINARAYANA et al., 2003; POORNA et al., 2007).

A determinação das condições ótimas de cultivos são fatores importantes que afetam a produção de enzimas, e devem ser avaliados para a otimização de processos biotecnológicos, aumentando a produtividade e diminuindo o custo total da produção.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial para a produção de β -glicosidase em Cultivo em Estado Sólido (CES) a partir do fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa* isolado do bagaço da cana. Diferentes resíduos agroindustriais e alguns parâmetros de cultivo, como: umidade, pH inicial do meio, temperatura e tempo foram testados para a produção da enzima.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Celulose

A celulose é o mais importante composto orgânico existente na natureza. Representa 15 a 60% da matéria seca dos vegetais incorporados ao solo. Encontra-se em plantas, sementes, fungos, algas e cistos de protozoários. É localizada na parede celular, em forma de unidades microscópicas, com formato de bastão chamadas micelas (SIQUEIRA et al., 1994).

A celulose é o composto orgânico mais abundante na biosfera, abrangendo mais da metade de todo o carbono orgânico do planeta (STRYER, 1995). Entretanto, os vertebrados não possuem enzimas capazes de degradar a celulose, por isso, este polissacarídeo apresenta baixo valor nutricional para os seres humanos (CAMPBELL, 2000).

A conformação β permite que a celulose forme cadeias retas bem longas. Várias cadeias retas dispostas paralelamente e interligadas por pontes de hidrogênio formam as microfibrilas que são muito resistentes. As fibras de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, sendo que a região amorfa é mais facilmente hidrolisável enzimaticamente (DA-SILVA et al., 1997; STRYER, 1995).

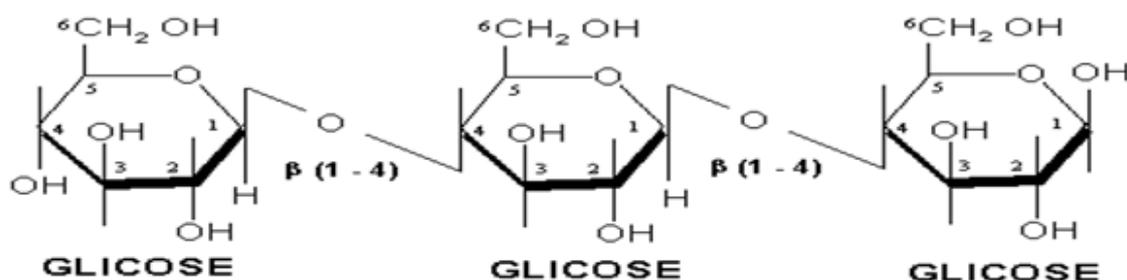


Figura 1 - Estrutura da celulose

2.2. Enzimas celulolíticas

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de agir sobre materiais celulósicos, gerando sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, e a glicose é

o que apresenta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND et al., 2002; TOLAN, 2002).

A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de no mínimo três diferentes enzimas: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21). A endoglucanase ou endo- β -1,4-glucanase (EC. 3.2.1.4) hidrolisa as cadeias ao acaso, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou grau de polimerização. A exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolase (EC.3.2.1.91) atua sobre a celulose, removendo unidades de celobiose a partir de extremidades não redutoras da molécula. β -1,4-glicosidase ou celobiase (EC. 3.2.1.21) hidrolisa celobiose e outras celodextrinas a glicose. (DA SILVA et al., 1997; PALMA-FERNANDEZ, 2002).

O conjunto das enzimas envolvidas nesse processo é denominado sistema enzimático celulolítico ou complexo celulolítico (WARREN, 1996).

A β -glicosidase desempenha um papel crucial na degradação enzimática da celulose, é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, por prevenir o acúmulo de celobiose. (LEITE et al., 2007b; PARRY et al., 2001).

2.3. Micro-organismos celulolíticos

A biodegradação da celulose por celulases e celulosomas, produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, representa o maior ciclo de carbono da biosfera e pode ser amplamente utilizada na produção de bioprodutos, sem emissão líquida de CO² na atmosfera (ARO et al., 2005; LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006).

Micro-organismos celulolíticos podem ser encontrados em toda a biota onde se acumulem resíduos celulolíticos. Eles usualmente ocorrem em populações mistas, incluindo espécies celulolíticas e não celulolíticas, as quais frequentemente interagem sinérgicamente, levando à degradação completa da celulose (LYND et al., 2002).

A degradação da parede celular das plantas por fungos filamentosos celulolíticos é um processo complexo que envolve a ação de um grande número de enzimas extracelulares, celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases, dando a estes organismos meios para a obtenção de energia e nutrientes (ARO et al., 2005).

Devido à complexidade do sistema de conversão da celulose à glicose e com o intuito de viabilizar economicamente a hidrólise enzimática, tem havido muito empenho em se encontrar micro-organismos produtores de celulases. Entre alguns micro-organismos que utilizam glicose como fonte de energia para o crescimento a partir da hidrólise celulósica, estão os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Humicola*, *Phaenorochoete*, *Schizophilium*, *Talaromyces* e em destaque o *Trichoderma*, como um dos maiores produtores de celulases (PALMA-FERNANDEZ, 2002).

2.4. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano, eles apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. No qual tem propiciado ao homem explorar algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, hábeis de produzir substâncias ou, capazes de provocar alterações desejáveis em outras, gerando produtos ou processos comerciais. A descoberta de linhagens microbianas potencialmente interessantes está fundamentada na capacidade e adaptação dos micro-organismos aos diversos ambientes, quanto maior for a variedade de ambientes aos quais estiverem adaptados, em decorrência da complexidade química do mundo que os envolve, maior será a chance de existir linhagens produtoras de alguma substância de interesse. (COLEN, 2006)

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição (BENNETT, 1998). Possivelmente, o meio mais eficiente para encontrar novas enzimas, seja o isolamento e seleção de micro-organismos como consequência das suas características de diversidade e versatilidade (SHIMIZU et al., 1997; OGAWA; SHIMIZU, 1999).

2.5. Enzimas microbianas

As enzimas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores. Elas são bastante ativas, versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas da reação. Ao contrário dos catalisadores não enzimáticos que, em geral, têm ação ampla, as enzimas não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do

meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efetor. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Consequentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

O uso prático das enzimas tem sido explorado pelo ser humano há milhares de anos de forma direta via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal, ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. Por outro lado, a produção e uso de enzimas de origem microbiana, sob uma forma controlada, apesar de serem relativamente recentes constituem hoje, o maior setor da indústria biotecnológica (NEIDLEMAN, 1991)

Comparado com as enzimas animais e vegetais, as enzimas microbianas têm tido cada vez mais sua importância aumentada, pois não estão sujeitas as limitações de produção ou de suprimento. Além disso, a diversidade das enzimas microbianas é enorme, tendo aumentado a cada dia, devido à descoberta de novas enzimas e novas aplicações (COLEN, 2006).

2.6. Aplicações industriais da β -glicosidase

O interesse inicial no estudo das enzimas β -glicosidases surgiu por volta de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006). É foco de vários estudos, devido à possibilidade de sua utilização em grande número de processos biológicos e biotecnológicos (MIRJAN et al., 2001).

As β -glicosidases não são responsáveis apenas pela produção de glicose a partir da celobiose, elas permitem a ação eficiente de exoglucanases e endoglucanases (KAUR et al., 2007).

A enzima β -glicosidase apresenta a propriedade de hidrolisar a celobiose, dissacarídeo de glicose proveniente da ação de enzimas despolimerizantes sobre a cadeia de celulose. O acúmulo de celobiose no meio reacional inibe a atividade das enzimas celulolíticas, desta forma, a β -glicosidase possibilita a continuidade do

processo catalítico porque degrada o principal inibidor das celulases, liberando monossacarídeos fermentescíveis para a produção de etanol (VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000).

Estudos com as β -glicosidases microbianas e a demais enzimas celulolíticas, podem viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose. A β -glicosidase desempenha a função de degradação enzimática da celulose, fazendo que esta enzima apresente grande potencial para a indústria de etanol (PARRY et al., 2001).

A presença de β -glicosidase no processo de vinificação favorece a liberação de compostos aromatizantes a partir de seus precursores glicosídicos. Tais compostos são coletivamente chamados de terpenos, dentre eles estão: nerol, α -terpineol, geraniol, linalool, citronellol e outros, quando glicosilados, apresentam baixa volatilidade e pouco contribuem para a qualidade aromática do vinho (VILLENA et al., 2007). As antocianinas são pigmentos de ocorrência natural, que proporcionam a coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies vegetais (COUTINHO, 2002). β -glicosidases com ampla especificidade podem hidrolisar as antocianinas, produzindo antocianidinas (aglicona) e açúcar livre (LEITE et al., 2007a). As antocianidinas apresentam menor pigmentação e solubilidade, característica que permite a remoção das mesmas, por precipitação e filtração. Este efeito pode ser utilizado na despigmentação de sucos com elevada concentração de antocianinas, ou ainda, na suavização da cor do vinho tinto, para obtenção de vinho rosé (PALMA-FERNANDES, 2002).

A maior parte das isoflavonas da soja se encontram na forma glicosilada (daidzina, genistina e glicetina). Estas moléculas apresentam menor atividade biológica que as suas correspondentes formas desglicosiladas (agliconas), ou seja, daidzeína, genisteína e gliciteína (PARK et al., 2001). Essas enzimas têm a propriedade de desglicosilar as isoflavonas presentes na soja, resultando no aumento da absorção destes compostos pelo intestino humano, potencializando a funcionalidade de alimentos derivados de soja (OTIENO; SHAH, 2007).

Trabalhos anteriores relatam que uma dieta rica em isoflavonas pode contribuir para o controle e prevenção de muitas doenças crônicas, tais como: câncer (mama, próstata e cólon), osteoporose, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e outras (CHUN et al., 2008).

2.7. Cultivo em Estado Sólido (CES)

O descarte de resíduos representa um crescente problema devido ao aumento da produção. Os maiores impactos ambientais provocados por resíduos sólidos orgânicos são decorrentes da fermentação do material, podendo ocasionar a formação de ácidos orgânicos (“chorume” – líquido de elevada DBO formado com a degradação do material orgânico e a lixiviação de substâncias tóxicas) com geração de maus odores e diminuição do oxigênio dissolvido em águas superficiais (GRAMINHA et al., 2008).

O Brasil é um país agroindustrial e se destaca na produção de soja, milho, cana-de-açúcar, mandioca, café, entre outros, que geram uma grande quantidade de resíduos. Portanto, há um grande potencial para a utilização do processo de CES na biotransformação de resíduos agrícolas (SOCCOL, 2003). O CES se torna economicamente interessante para países em abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, que podem ser usados como matérias-primas (PANDEY et al., 1999).

Neste contexto o Cultivo em Estado Sólido (CES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos visando a síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial.

O CES apresenta um grande potencial para a produção de enzimas, já que resíduos agroindustriais, abundantes e baratos, podem servir como substrato para o crescimento microbiano, possibilitando a obtenção de produtos com alto valor agregado. Os micro-organismos mais adaptados a esse tipo de processo são os fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais de desenvolvimento desses fungos e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas. Elas são propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOLE, 1987).

O CES caracteriza-se pelo cultivo de micro-organismos sobre uma matriz úmida sólida, substrato insolúvel, na ausência de uma fase aquosa macroscópica (água livre) (PANDEY et al., 2000). Esta matriz pode ser obtida a partir de substratos naturais, usados como fonte de energia, ou meios inertes como solução nutriente (PANDEY, 2003). Entende-se por ausência de água livre a não separação da água da matriz sólida, que deve conter umidade suficiente, na forma adsorvida, permitindo o crescimento do micro-organismo. O teor de umidade máxima varia em função do tipo de substrato, ou

seja, função das propriedades que o mesmo possui em adsorver água (MITCHELL et al., 2003).

Definições mais detalhadas descrevem o CES como uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre o interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz, essa matriz pode ser classificada em: as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulosicos) e a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes (PALMA, 2003).

A partir de 1980 houveram avanços relacionados aos processos em meio sólido que incluem a diversificação no emprego de novos micro-organismos, melhorias do desempenho dos biorreatores, utilização de novos subprodutos e a descoberta de novos produtos (ZHENG; SHETTY, 1999).

2.8. Vantagens e desvantagens do CES

Entre as vantagens do CES pode-se citar a baixa demanda de água, O espaço requerido para equipamentos é relativamente menor, pois uma pequena quantidade de água é utilizada, utilização de equipamentos menos complexos, menor espaço necessário para o processo de cultivo, meios de culturas mais simples, baixa demanda de energia e baixo custo operacional, além de obtenção de preparações enzimáticas mais concentradas e menor probabilidade de contaminação (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

O processo em estado sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Neste contexto, destaca-se a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano. Além disso, a heterogeneidade da mistura no CES dificulta o controle do crescimento celular e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos, o que torna complicado controlar e automatizar o processo (PALMA, 2003).

A tecnologia do CES não deve ser encarada como uma técnica que substitui o cultivo submerso. Na verdade, cada uma destas técnicas possui suas potencialidades e particularidades. No entanto, existe o consenso da necessidade de investigação continua

dos fatores relacionados ao CES para permitir que o pleno potencial desta tecnologia seja utilizado (PANDEY et al., 2001).

Os processos de Cultivo em Estado Sólido precisam de algumas etapas, entre elas a seleção da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, o controle dos parâmetros de cultivo, separação em alguns casos e a purificação dos produtos (GUTIERREZ-ROJAS et al., 1998). O controle de determinadas variáveis é necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes (DEL BIANCHI et al., 2001).

2.9. Produção de β -glicosidase por microrganismos

SILVA (2008) selecionou o fungo *Aspergillus phoenicis* entre 6 fungos diferentes. O meio de cultivo escolhido era composto por resíduo de uva e peptona, para otimização do processo de cultivo, por meio do cultivo submerso em frascos tipo Erlenmeyers de 250mL, com 50mL do meio de cultivo, na temperatura de 30°C, durante 120 horas em agitador de plataforma, a 120 RPM. Os resultados mostraram que as enzimas endoglicanases e glicosidase presentes no sobrenadante bruto da cultura possuem melhores atividades entre os pHs 3,0 e 5,0, temperatura de 60°C, mantendo-se estável por duas horas de incubação. Após nove dias de cultivo, a produtividade da enzima foi de 0,18U/mL.

Gutierrez-Correa et al. (1999) avaliaram o cultivo simultâneo em fermentação sólida dos fungos, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na produção de celulasas utilizando bagaço de cana enriquecido com fontes de nitrogênio variadas. Em 120 horas de fermentação foi obtido 0,21 U/ml de β -glicosidase, com teor de umidade do substrato de 80% e tendo como fonte de nitrogênio a mistura de sulfato de amônio e uréia.

Kalogeris et al. (2003) variaram algumas parâmetros de crescimento microbiano como, substrato, pH e fonte de nitrogênio, objetivando a otimização da produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em fermentação sólida. Estes apresentam como resultados cerca de 10,1U/ml de β -glicosidase, utilizando a palha de trigo como fonte de carbono, enriquecida com 1% de sulfato de amônio e pH inicial ajustado para 4,0, em 192 horas de fermentação a 50 °C.

BEDANI (2010) obteve ótimos resultados, entre as linhagens de fungos que testou, o fungo *Aspergillus* sp. apresentou a maior produção de β -glicosidase. Na

fermentação em meio semi sólido composto de farelo de trigo, casca de maracujá, água destilada, na proporção 1:1:0,4; foram obtidos, respectivamente, 25,75 U/g, 45,88 U/g e 9,29 U/g de β -glicosidase utilizando-se os substratos p-NPG, celobiose e amigdalina, após 30 minutos a 50°C. A β -glicosidase bruta de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0 - 5,5 e uma fração com atividade em pH 7,0. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 45 - 50°C e mostrou-se estável a 45°C após 30 minutos de incubação em pH 5,0 e na faixa de pH 5,0 - 7,0 após 2 h a 47°C.

Adsul et al. (2004) compararam a produção de celulase e xilanase dos microrganismos *Penicillium janthinellum* e *Trichoderma viride*, em fermentação submersa, e variaram a fonte de carbono utilizada, bagaço de cana e celulose sintética. O bagaço de cana foi o melhor substrato para a produção de β -glicosidase para ambos microrganismos, o maior potencial para a produção desta enzima foi apresentado pelo microrganismo *P. janthinellum*, cerca de 2,3 U/ml, em 192 horas de fermentação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo utilizado

Os cultivos foram realizados com o fungo filamentosamente isolado de amostras do bagaço da cana, identificado como *Lichtheimia ramosa*. O microrganismo foi cultivado em ágar *Sabouraud Dextrose*, em tubos de ensaio na temperatura de 28°C e mantidos na temperatura de 4°C em geladeira.

3.2. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos tipo Erlenmeyer de 250mL contendo 40mL do meio ágar *Sabouraud Dextrose* inclinado, mantidos por 48 horas a temperatura de 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25mL de solução nutriente. A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agrícolas) se deu pela transferência de 5mL desta suspensão.

3.3. Produção β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)

3.3.1. Seleção de substratos

Foram utilizados diferentes tipos de substratos ricos em celulose e hemicelulose: farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz, bagaço de cana, sabugo de milho e palha de milho.

Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. O cultivo ocorreu em frascos tipo Erlenmeyer de 250mL com 5g de substratos umedecidos com solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônia).

Todos os materiais foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após a inoculação do micro-organismo, com os 5mL da suspensão, os frascos tipo Erlenmeyer foram mantidos em incubadoras a temperatura de 28°C

3.3.2. Determinação da melhor umidade

Após a determinação do melhor substrato para o cultivo, foi avaliada a melhor umidade. A variação da umidade foi de 40 a 80%, variando 5% entre elas. A inoculação foi a mesma descrita anteriormente, modificando apenas a quantidade de suspensão do micro-organismo empregado, cada umidade teve diferente valor para a inoculação.

3.3.3. pH inicial do meio

Para a determinação do melhor pH foi preparados cultivos com pH variando de 3 a 9. Foram utilizados os mesmos processos descritos anteriormente, mas o pH foi corrigido com peagâmetro na preparação da salina. O pH só foi ajustado no início da preparação do meio de cultivo, não sendo possível seu controle durante o processo.

3.3.4. Melhor temperatura para o cultivo

Após a determinação do substrato, umidade e pH inicial do meio, foi determinado a melhor temperatura para a produção de β -glicosidase. Após o processo

de inoculação no substrato sólido, cada frasco tipo Erlenmeyer foi mantido, para o crescimento, em incubadoras em diferentes temperaturas, de 25 a 45°C, variando 5°C entre elas.

3.3.5. Tempo de cultivo

O último parâmetro avaliado foi o tempo de cultivo, após a determinação do substrato, umidade, pH, temperatura ideais. O processo de cultivo foram os mesmos descritos anteriormente, mas para a extração da enzima, as amostras foram retiradas de 24 em 24 horas, perfazendo um total de 240 horas.

3.4. Extração da enzima

Para a extração da enzima foi adicionado 50mL de água destilada nos meios cultivados, em seguida foram mantidos em agitação por 1 hora em incubadora Shaker, na rotação de 80 RPM, na temperatura de 28°C. Posteriormente o material foi filtrado para a separação do meio sólido do extrato enzimático.

3.5. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela adição de 50 μ L do extrato enzimático em 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1M e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), a mistura de reação foi mantida por 10 minutos a temperatura de 50°C, em Banho Maria. A reação foi paralisada com 2mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de substratos para a produção da enzima

A maior produção da enzima foi obtida no cultivo do micro-organismo em farelo de trigo, atingindo cerca de 5,6U/mL após 96 horas da inoculação (Tabela 1).

O farelo de trigo se mostra muito interessante para o cultivo microbiano em CES devido seu meio nutricional (HAQUE et al., 2002).

Tabela 1: Produção de β -glicosidase pelo fungo *L. ramosa* em diferentes substratos por CES.

Substratos	Atividade de β -glicosidase (U/mL)
Farelo de Trigo	5, 63
Farelo de Soja	1, 45
Sabugo de Milho	0, 10
Palha de Milho	0, 47
Bagaço de Cana	0, 01
Casca de Arroz	0, 12

Trabalhos anteriores relatam expressivas produções de β -glicosidases pelo cultivo de micro-organismos em Cultivo em Estado Sólido (CES) utilizando farelo de trigo como substrato (KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2008).

BEDANI (2010) com o fungo *Aspergillus* sp. obteve bons resultados quando cultivado em farelo de trigo, em cultivo semi sólido, com produção de β -glicosidase em cerca de 25,75 U/g, utilizando-se os substratos pNP β G, celobiose e amigdalina, após 30 minutos a 50°C.

A produção de enzimas celulolíticas microbianas é dependente da natureza do substrato, e a eficiência na produção dessas enzimas depende também de outros fatores relacionados à composição química da matéria-prima, como a acessibilidade e suscetibilidade de vários componentes, bem como suas associações químicas ou físicas. Então, é importante a escolha do substrato ideal para a produção destas enzimas. Deve ser barato, facilmente processável, disponível em grandes quantidades, e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas, bem como para uma possível hidrólise comercial posterior (KANG et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2005).

4.2. Variação da umidade do meio de cultivo

Nos cultivos realizados com o fungo *L. ramosa* em farelo de trigo, a maior produção de β -glicosidase foi obtida com 60% de umidade inicial, cerca de 7,30U/mL (Figura 1).

Gutierrez-Correa et al. (1999) obteve com as linhagens *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* 0,21 U/ml de β -glicosidase com teor de umidade do substrato de 80% e tendo como fonte de nitrogênio a mistura de sulfato de amônio e uréia, em cultivo solido após 120 horas.

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumentando o risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Baixos níveis de umidade levam a um crescimento baixo em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LOSANE et al., 1985). O teor de umidade pode variar entre 18 a 85%, sendo influenciado do poder de absorção do substrato (PANDEY et al., 2000).

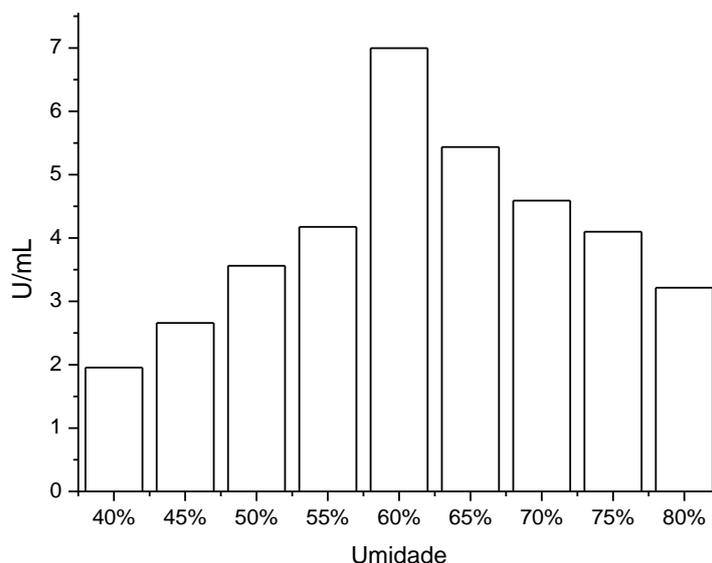


Figura 2: Produção de β -glicosidase em função da umidade inicial do meio de cultivo, em cultivo no farelo de trigo.

O meio de cultivo deve apresentar disponibilidade de água suficiente para permitir o crescimento do micro-organismo, mas não pode haver água livre entre as partículas do meio, pois a presença de água não absorvida ao substrato desfavorece a transferência de massa durante o bioprocessamento (PANDEY et al., 2000; SINGHANIA et al., 2009).

4.3. Efeito do pH para a produção de enzima

No cultivo em farelo de trigo com umidade a 60%, a maior produção de β -glicosidase foi obtida quando o pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 (Figura 2). Neste experimento, o pH foi ajustado durante a elaboração dos meios de cultivo, posteriormente a inoculação do micro-organismo, não foi possível controlar as prováveis alterações provenientes da atividade metabólica microbiana.

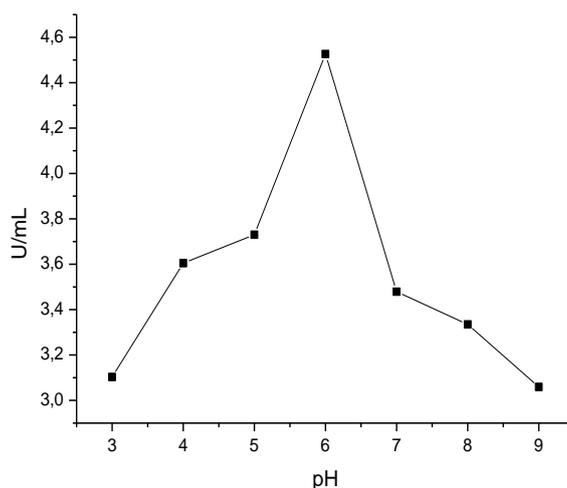


Figura 2: Produção de β -glicosidase em função do pH inicial do meio de cultivo, em cultivo no farelo de trigo com 60% de umidade.

Na literatura há deficiência de informação sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do meio. O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo o tamponamento é difícil, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. Apenas em fermentadores, o pH pode ser mantido constante, automaticamente, durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio

num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (CAELILE & WATKINSON, 1997).

A variação do pH do meio pode protonar ou desprotonar moléculas orgânicas, inclusive proteínas estruturais e enzimas. Dessa forma, a avaliação deste parâmetro é imprescindível para a otimização das condições de cultivo, pois o pH influencia diretamente o crescimento do micro-organismo e conseqüentemente a produção de enzimas (BON et al., 2008).

Mesmo que o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos, o controle e monitoramento não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003). A dificuldade de monitoramento e controle do pH durante o cultivo, é uma das principais desvantagens do Cultivo em Estado Sólido (PANDEY et al., 2000).

4.4. Temperatura ótima para a produção da enzima

Dentre os valores de temperatura avaliados o fungo *L. ramosa* apresentou maior produção de β -glicosidase, aproximadamente 5,4 U/mL, quando cultivado a 30°C (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de β -glicosidase em função da temperatura de cultivo, em cultivo no farelo de trigo com 60% de umidade e pH inicial 6.

Temperatura	U/ml
25°C	3,968
30°C	5,454
35°C	4,721
40°C	4,025
45°C	1,148

SILVA (2008) com a mesma temperatura obtida neste trabalho, apresentou produtividade da enzima de 0,18U/mL com o fungo *Aspergillus phoenicis*, após nove dias de cultivo, em resíduo de uva e peptona, durante 120 horas em agitador de plataforma, a 120 RPM.

Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos (PINTO, 2003). Durante o CES uma grande quantidade de calor é produzida devido à atividade metabólica do micro-organismo. Os materiais sólidos utilizados em CES possuem baixa condutividade térmica, o que faz a remoção do calor ser muito lenta (MITCHELL e LOSANE, 1992).

Dessa forma, o calor produzido durante o processo é acumulado no meio devido à baixa dissipação no substrato sólido. Isto reduz a viabilidade do crescimento microbiano, o que pode interferir no rendimento do produto. Além disso, algumas vezes o acúmulo de calor pode degradar o produto de interesse, principalmente quando o produto de interesse são enzimas (PANDEY, 2003).

Temperaturas excessivamente elevadas podem alterar a estrutura tridimensional de moléculas protéicas, resultando na perda da atividade enzimática (GOMES et al., 2007).

4.5. Tempo de cultivo

O último parâmetro avaliado foi o tempo de cultivo, totalizando 240 horas, as amostras foram retiradas de 24 a 24 e determinada a produção de β -glicosidase, onde se mostrou mais expressiva entre 120 e 168 horas de cultivo, atingindo cerca de 5,1U/mL após 168 horas (Figura 3).

Adsul et al. (2004) com a linhagem *Penicillium janthinellum*, em 192 horas de cultivo.com o substrato sólido de bagaço de cana apresentou produção de β -glicosidase em cerca de 2,3 U/ml.

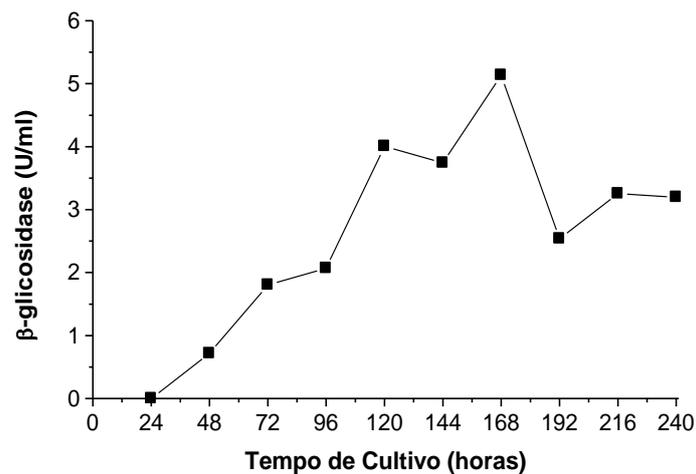


Figura 3. Produção de β -glicosidase pelo fungo *L. ramosa* em função do tempo de cultivo, em cultivo no farelo de trigo com 60% de umidade e pH inicial 6.

A tendência de utilizar enzimas de origem microbiana está intimamente relacionada com o baixo tempo necessário para sua obtenção, principalmente quando comparado com enzimas de origem vegetal e animal. Trabalhos anteriores relatam a produção de β -glicosidasas após tempos de cultivos próximos aos obtidos no presente trabalho (KALOGERIS et al., 2003, LEITE, et al., 2008; PANAGIOTOU et al., 2003).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos permitem concluir que a β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Lichtheimia ramosa* apresenta potencial para a produção da enzima β -glicosidase quando cultivado em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato, sendo a maior produção obtida em farelo de trigo, com 60% de umidade, em pH 6,0 após 168 horas a 30°C.

A importância biotecnológica da enzimas β -glicosidade justifica o bioprocessos e a ausência de relatos na literatura científica de produção de β -glicosidase pelo o micro-organismo *L. ramosa*, permite inferir que nosso trabalho contribuiu significativamente para a seleção de mais uma espécie fúngica de interesse biotecnológico, conduzindo a continuidade deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ADINARAYANA, K.; PRABHAKAR, T.; SRINIVASULU, V.; ANITHA, R. A. O. M.; JHANSI LAKSHMI, P.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for cephalosporin-C production under solid state fermentation for *Acremonium chysogenum*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 171-177, 2003.
- 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*, article in press, 2004.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Conversão enzimática do bagaço de cana de açúcar, Revista: *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, ano V, n. 26, mai/jun 2002.
- ARO, N.; PAKULA, T. PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxfors, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BEDANI, C. C. *Produção, caracterização e purificação de Beta-glicosidases fúngicas e sua ação sobre a hidrólise de amigdalina, celobiose e p-nitrofenil-beta-glucopiranosídeo*. 2010. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role off ungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 66, p. 101-107, 1998.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BON, E. P. S.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Bioprocessos para produção de enzimas. Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal]. Ed. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. p. 95-122, 2008.
- CAELILE, M.J.; WATKINSON, S.C.. The fungi. *Academic press*, London, 1997.
- CAMPBELL, M.K. *Bioquímica*. Porto Alegre, Artmed, cap. 12, p. 410-439, 2000.
- CHUN, J.; KIM, J. S.; KIM, J. H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp.4. *Food Chemistry*, v. 109, p. 278-284, 2008.
- COUTINHO, M. R. Obtenção de antocianinas presentes no repolho roxo (*Brassica oleracea*) 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Cento Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO C.M.L. Pectinases, hemicelulases e celulases substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 249-250, 1997.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido. São Paulo: Editora Edgar Blucher, v.2, 2001.

DZIEZAK, J. D., Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, v. 45, p. 78-85, 1991.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, p. 136-145, 2007.

GRAMINHA, E. B. N.; GONCALVES, A. Z. L; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v.144, p. 1-22, 2008.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGEDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 173-178, 1999.

GUTIERREZ-ROJA, M.; FAVELA-TORRES, E.; CORDOVA-LOPES, J.; GARCIA-RIVERO, M. Kinetics of growth of *Aspergillus Níger* durin submerged, Agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, v. 33, n.2, p. 103-103, 1998.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 453-62, 2002.

HECK, J.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 417-423, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. & VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KALOGERIS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KATAPODES, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MADRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v.38, p. 1099-1104. 2003.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KEKOS, D. E MACRIS, B. J. Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 207-213, 2003.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153-156, 2004.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; KAUR, G. S.; SAINI, H. S. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 260-270, 2007.

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, p. 391-395, 2008.

LEITE, R. S. R., GOMES, E., 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, p. 1101-1106, 2007a.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.137, p. 281-288, 2007b.

LOSANE, B. K.; GHIDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, J. Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, p. 265-285, 1995.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; Microbial cellulose utilization : fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.

MIRJAN, C., MUZAFFER, C.; VRONIQUE, Z.; WIM, P. B.; DAVID, R. B.; BERNAR, H.; ASSIM, E. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-D-thioglucoiside. *Biochemical Journal*, v. 354, p. 37-46, 2001.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characterization and economic evaluation. Solid substrate cultivation. *Elsevier*, London:, p. 1-16, 1992.

NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*, v.45, p. 88-911, 1991.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology*, v.17, p. 13-21, 1999.

ORIOLE, E. *Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau*. Thèse de Doctorat Microbiologie, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, p.113, 1987.

OTIENO, D. O.; SHAH, N. P. Endogenous β -glucosidase and β -galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 910-917, 2007.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus auranticus* em cultivo em estado sólido. 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. P. *Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico Thermoascus aurantiacus* 2002. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 18, p. 37-45, 2003.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, v. 77, p. 149-162, 1999.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. *New Delhi: Asiatech*, 2001.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 20, p. 12-14, 2001.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journal*, v. 353, p. 117-127, 2001.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 804-826, 2002.

PINTO, G. A. S. Produção de tanase por *Aspergillus niger*. 2003. 180f. Tese (Doutor em ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação de Tecnologia de Processos. Rio de Janeiro.

PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

POORNA, C. A.; PREMA, P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 485-490, 2007.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 2, p. 91-102, 1980.

SHIMIZU, S.; OGAWA, J.; KATOKA, M.; KOBAYASHI, M. Screening of novel microbial enzymes for production of biologically and chemically useful compound. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 58, p.45-87, 1997.

SILVA, L. A. D. *Produção e caracterização de enzimas celulósicas por Aspergillus phoenicis*. 2008. 117f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S.; GRISI, B.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. Micro-organismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, p.142, 1994.

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

STRYER, L. *Biochemistry*, New York, W.H. Freeman and Company, cap. 18, p. 463-482, 1995.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK J., Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass & Bioenergy*, Oxford, v. 10, p. 367-375, 1996.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 14, p. 38-42, 2000.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; PÉREZ, A. I. B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 420-425, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES E.; AGUILAR, C. N.; ROMERO-GOMES, S. D.; DIAZ-GODINES, G. AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 157-167, 2003.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, V. 50, p. 183-212, 1996.

ZENI, G.; PENDRAK, I. P. Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Cândida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus*. Ponta Grossa: Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant productio. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 323-329, 1999.