



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Táisa Godoy Gomes**

**Caracterização da  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, isolado de material vegetal em decomposição**

**Dourados – MS**

**Abril de 2013**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Taisa Godoy Gomes**

**Caracterização da  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, isolado de material vegetal em decomposição**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade Ciências Biológicas e Ambientais Universidade Federal da Grande Dourados.

**Orientador:** Professor Dr Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

**Dourados – MS**

**Abril de 2013**

**Dedico:**

**Á Deus.**

**Aos meus pais Daniel Gomes Junior e Zélia Márcia Godoy Gomes, meus maiores incentivadores e exemplos.**

**Á minha irmã Larissa Godoy Gomes por sempre fazer valer o significado da palavra irmã.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e ao nosso Senhor Jesus Cristo por sempre guiar meus passos e me livrar de todo o mal.

Aos meus pais Daniel Gomes Junior e Zélia Márcia Godoy Gomes por tudo o que fizeram para eu chegar até esse momento, pelo amor, apoio, incentivo dado em todas as etapas da minha vida, pelo exemplo de caráter e de vida.

À minha irmã e amiga Larissa Godoy Gomes pela ajuda e orações em todos os momentos em que precisei.

À Sámed Hadi pelo companheirismo, carinho e amor durante os quatro anos de graduação.

A meu querido orientador Rodrigo Simões Ribeiro Leite, que foi meu exemplo de profissionalismo e de caráter dentro da Universidade, agradeço aos conselhos e orientações sem o qual não seria possível a realização desse trabalho, agradeço também pela paciência e pelas horas de boas conversas que tivemos.

A toda equipe de pesquisa de enzimologia pela amizade e pelo conhecimento compartilhado: Ana Paula, Ana Caroline, Maria Alice, Marília, Nahara Gabriela, Vinicius Godoy Camargo e em especial a Nayara Garcia que para mim foi um anjo, agradeço a todos do fundo do meu coração.

À coordenação do Curso de Biotecnologia, em especial ao professor Marcelo Da Fossa Paz, que sempre esteve disposto a ajudar e a solucionar os nossos problemas.

À professora Claudia Roberta Damiani pelos conselhos, pelo exemplo de personalidade e pela inestimável amizade.

A Vinicius Godoy Camargo e Lizandro Medeiros pela amizade durante toda a graduação, pelas momentos incríveis que passamos juntos, por sempre estarem ao meu lado nas horas boas e difíceis, meus grandes e eternos amigos.

À Bruna Paulino Conti, Rosana Segatto e Shara Rodrigues pela inigualável amizade e companheirismo, as quais tenho imensa admiração e amor.

A toda equipe de técnicos dos laboratórios da FCBA: Fabiana, Livia, Mara e Marcus Henrique.

A toda minha família pela ajuda e pelo incentivo.

A todos os professores da FCBA que passaram por minha vida e contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

*“Seja sempre uma pessoa digna, você pode não mudar o mundo, mas terá um canalha a menos na Terra.”*

# SUMÁRIO

	Página
<b>1. Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Revisão da literatura</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. <math>\beta</math>-glicosidase</b> .....	<b>13</b>
3.2. Utilização da $\beta$ -glicosidase na Biotecnologia .....	15
3.3. Cultivo em estado sólido.....	17
3.4. Enzimas termofílicas .....	18
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>21</b>
4.1. Microrganismo utilizado.....	21
4. 2. Preparação do Inóculo.....	21
4. 3. Produção $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	21
4. 4. Extração da enzima.....	21
4. 5. Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase.....	22
4. 6. Determinação do pH ótimo.....	22
4. 7. Determinação da temperatura ótima.....	22
4. 8. Determinação do pH de estabilidade.....	22
4. 9. Determinação da temperatura de estabilidade.....	23
4.10. Determinação efeito de etanol.....	23
4.11. Efeito de Glicose sobre a enzima.....	23
4. 12. Reversão de glicose.....	23
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	<b>24</b>
5.1. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade da enzima.....	24
5.2. Efeito de etanol e da glicose sobre a enzima.....	28
<b>6. Considerações finais</b> .....	<b>31</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Atividade de $\beta$ -glicosidase em função da variação do pH. ....	24
<b>Figura 2.</b> Atividade de $\beta$ -glicosidase em função da variação de temperatura. .....	25
<b>Figura 3.</b> Estabilidade enzimática em função do pH após 24h de incubação..	26
<b>Figura 4.</b> Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1h de incubação. ....	27
<b>Figura 5.</b> Efeito da concentração de etanol sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase a 30 C°, 50C°, 65°C. ....	29
<b>Figura 6.</b> Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase. .....	30

## LISTA DE TABELA

Página

<b>Tabela 1.</b> Reversibilidade da inibição por glicose pelo aumento da concentração de substrato.....	<b>30</b>
---	-----------

## RESUMO

As  $\beta$ -glicosidases são importantes enzimas do complexo celulolítico e são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas, atualmente existem várias aplicações biotecnológicas para esta enzima, amplamente utilizada na fabricação de sucos e de vinhos. Nesse trabalho a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* foi caracterizada quanto ao efeito de pH, temperatura, etanol e glicose. A enzima apresentou atividade ótima no pH 5,5 e temperatura de 65°C, manteve-se estável em uma ampla faixa de pH 3,5-10,0 apresentando mais de 70 % da sua atividade original. Nos ensaios de termoestabilidade após 1 hora de incubação a enzima permaneceu estável até 55°C e reteve mais de 60% da sua atividade a 65°C. O etanol em concentrações de 5 a 10% aumentou o potencial catalítico da  $\beta$ -glicosidase devido a atividade glicosil-transferase. A enzima foi inibida por glicose mantendo 50 % de sua atividade original com 60 mM de glicose na reação, a inibição exercida pela glicose foi do tipo competitiva, considerando que o aumento na concentração de substrato reverteu sua atividade original.

## 1. INTRODUÇÃO

A celulose é a fonte de energia renovável mais abundante existente em nosso planeta, com o aumento populacional e com a escassez de nossos recursos é imprescindível o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção desse polissacarídeo (VILLAS BOAS et al., 2000). Sua estrutura cristalina torna a degradação desse polissacarídeo a glicose complexa, envolvendo três tipos diferentes de enzimas, endo- $\beta$ -1-4-glucanase ou endoglucanase, exo-celobiohidrolase ou exoglucanases e a  $\beta$ -glicosidase (CASTRO, 2006).

As endoglucanases atuam sobre os polímeros internamente, reduzindo o tamanho e a organização da cadeia, já as exoglucanases atuam nas extremidades reductoras e não reductoras da celulose removendo unidades de celobiose. A  $\beta$ -glicosidase é responsável pela hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, ela é a responsável por evitar o acúmulo desse dissacarídeo o que reduz o efeito inibidor da celobiose nas demais enzimas, a  $\beta$ -glicosidase, portanto desempenha papel fundamental na degradação enzimática da celulose (LEITE et al., 2008).

Além da grande importância da  $\beta$ -glicosidase no processo de hidrólise enzimática da celulose, esta enzima é amplamente usada nas indústrias de sucos e bebidas, na otimização do aroma e no processo de extração. Os terpenos junto com outros compostos como alcoóis alifáticos e compostos derivados do benzeno são responsáveis pela liberação do aroma no vinho, quando esse terpeno está ligado a um sacarídeo ele não libera o aroma desejado, a  $\beta$ -glicosidase hidrolisa a ligação entre o terpeno e a molécula de glicose, favorecendo a liberação de compostos aromatizantes (MAICAS et al., 2005).

As vantagens de utilizar enzimas na indústria são inúmeras, elas são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de diversos tipos de resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental (AQUINO et al., 2003). Para a

produção de enzimas microrganismos são a melhor escolha, entre os principais produtores de enzimas encontra-se os fungos filamentosos. A síntese da  $\beta$ -glicosidase por microrganismos depende de diversos fatores como: tempo de cultura, presença de compostos indutores no meio e um nível intracelular adequado de nutrientes e minerais (PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados microrganismos termofílicos e são classificados em termófilos moderados (faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55° C) termófilos extremos (quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 65°C a 85°C) ou ainda hipertermófilos (quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 85°C 110°C). Os microrganismos termófilos moderados são geralmente os fungos filamentosos, já os hipertermófilos apenas serão encontrados dentro o domínio Archaea (MAHESHWAR et al., 2000).

Como toda proteína se inativa irreversivelmente pelo calor a busca por enzimas estáveis em alta temperatura tem sido constante, como já foi comprovado enzimas produzidas por fungos termofílicos são mais estáveis que as produzidas por fungos mesofílicos (ORTEGA et al., 2004). Além da estabilidade em altas temperaturas, há um aumento na faixa de estabilidade de pH e mostram-se mais tolerante à ação de agentes químicos.

O crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por termofílicos é motivado por sua capacidade de trabalhar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (GOMES et al.,2007).

O conhecimento dos diversos comportamentos de um organismo frente a variações ambientais resulta na identificação de vias e atividades metabólicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas, as quais definem as habilidades e potenciais dos mesmos, tal fato demonstra a grande importância da caracterização enzimática. É importante e essencial definir padrões ótimos de trabalho da enzima, padrões como pH, temperatura, inibidores entre outros. Dessa forma, haverá uma otimização do processo, melhorando assim tais parâmetros e controlando para que fiquem nos ideais, será possível diminuir o tempo de reação e aumentar a liberação de produto (PARRY et al., 2001).

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar bioquimicamente e avaliar o efeito de etanol e glicose sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase, produzida pelo microrganismo *Thermomyces lanuginosus*, a fim de estabelecer as condições ótimas de aplicação desta enzima.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. $\beta$ -glicosidase

Ligações glicosídicas são ligações covalentes, resultado da reação de uma molécula de carboidrato com álcool, que também pode ser outro carboidrato, essas ligações ocorrem naturalmente em qualquer nível de organização molecular, desde microrganismos até animais superiores como o homem (WHITHERS, 2004; BATHIA, 2002).

Uma grande variedade de enzimas possuem a função de clivar essa ligação, estas são então denominadas glicosidases, essas ligações podem ser  $\alpha$ -1,4 ou  $\beta$ -1,4. As ligações  $\alpha$  são abaixo do plano dos anéis ligando o C1 de um monossacarídeo com o C4 do outro monossacarídeo, já ligações  $\beta$ -1,4 são acima do plano da molécula, como no caso da celulose que possui ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (CERQUEIRA et al., 2007).

Dois diferentes mecanismos de quebra da ligação glicosídica são utilizados por essas enzimas. Algumas enzimas usam o mecanismo de retenção, onde o carbono anomérico permanece na conformação  $\beta$  (acima do plano da molécula) após a quebra da ligação. No outro mecanismo inversão, a configuração do carbono anomérico é alterada para a forma  $\alpha$  (abaixo do plano da molécula) durante a hidrólise (SANDGREEN et al., 2005).

As  $\beta$ -glicosidases são classificadas de dois modos distintos: de acordo com a especificidade com o substrato ou com o grau de similaridade das sequências de aminoácidos e sua conformação (LOPES, 2011). Quando as  $\beta$ -glicosidases são classificadas de acordo com o substrato elas são divididas em três grupos: aril  $\beta$ -glicosidases que hidrolizam aril-glicosídeos, celobiose verdadeira que age sobre a celobiose e por último as  $\beta$ -glicosidases que atuam em vários substratos, sendo a mais comum e por isso mais estudada (BHATIA et al., 2002).

Segundo a classificação por similaridade das sequências, atualmente a mais aceita, as  $\beta$ -glicosidases são reunidas em três famílias, dentro do grupo das acetil-hidrolases que no total estão classificadas em 88 famílias. Dentro da família 3 estão as  $\beta$ -glicosidases originárias de fungos, bactérias e leveduras

(MAITAN, 2011). As diversas formas dessa enzima em geral são codificadas por genes distintos, entretanto alguns fungos secretam diferentes formas da mesma enzima, isso depende da linhagem e das condições ambientais .

O primeiro estudo envolvendo a enzima  $\beta$ -glicosidase surgiu na década de 50, devido ao grande interesse que havia na enzima, já que ela está envolvida na completa degradação da celulose (ZANOELO et al., 2004). A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, é a biomassa mais abundante conhecida na Terra, seu potencial na produção de energias limpas substituindo combustíveis fósseis foi o principal motivo da crescente de pesquisas e tecnologias visando obter produtos a partir dessa fonte de carbono renovável (LEITE et al., 2008; FUJITA et al., 2004).

A hidrólise enzimática da celulose até glicose envolve a ação das enzimas celulolíticas, para esse processo ocorrer é necessário no mínimo três enzimas diferentes: endoglucanase, exoglucanase e a  $\beta$ -glicosidase (PALMA-FERNANDEZ, 2002 ; LEITE et al .,2008).

As endoglucanases atuam sobre os polímeros internamente, reduzindo o tamanho e a organização da cadeia, já as exoglucanases atuam nas extremidades não redutoras da celulose removendo unidades de celobiose. A  $\beta$ -glicosidase é responsável pela hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, a celobiose atua como inibidor das demais enzimas, com a despolimerização da celobiose ocorre à liberação de duas moléculas de glicose. Por evitar o acúmulo desse dissacarídeo inibidor das endo e exoglucanases a  $\beta$ -glicosidase exerce papel fundamental na degradação enzimática da celulose (LEITE et al., 2008).

As enzimas do complexo celulolítico degradam o substrato de forma sinérgica, ou seja, de forma conjunta, o que aumenta a eficiência da ação de dois ou mais componentes de um sistema quando comparado a ação de cada um deles isoladamente. No caso das celulases, esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (SANDGREEN et al., 2005).

As  $\beta$ -glicosidases também são reportadas por sofrerem inibição do seu produto de hidrólise, neste caso a glicose (LYND et al., 2002). A hidrólise enzimática da celulose associado a uma simultânea fermentação alcoólica, na

qual a glicose será microbiologicamente convertida em etanol é uma alternativa para contornar esse problema de inibição (LEITE et al., 2008).

### **3. 2. UTILIZAÇÃO DA $\beta$ -GLICOSIDASE NA BIOTECNOLOGIA**

Além da grande importância da  $\beta$ -glicosidase no processo de hidrólise enzimática da celulose, as  $\beta$ -glicosidases tem aplicabilidade em diversos setores industriais, como em industriais alimentícias, na fabricação de sucos são usadas em processos de clarificação, aumentam o rendimento na extração e reduz a viscosidade do produto, e principalmente na fabricação de vinhos com o objetivo de aprimorar aroma e sabor (TURNER et al., 2007).

Os terpenos (compostos aromatizantes naturais) ou bioaromatizantes são de fundamental importância na produção de bebidas em especial do vinho. Esses bioaromatizantes vêm ganhando espaço no mercado industrial pelo menor impacto causado no meio ambiente e pela tendência do mercado consumidor em preferir um produto natural ao invés do químico. Quando o terpeno está ligado a um dissacarídeo ele não libera o aroma desejado. As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a ligação entre o terpeno e a molécula de glicose, favorecendo a liberação de compostos aromatizantes (MAICAS et al., 2005).

As  $\beta$ -glicosidases também exercem papel essencial na absorção de isoflavonas na forma conjugada. As isoflavonas ocorrem naturalmente nos grãos de várias leguminosas em especial a soja. Estas enzimas junto com enzimas intestinais (MATSUURA et al., 1993) hidrolisam as isoflavonas conjugadas glicosídicas desenvolvendo as formas agliconas que são mais biodisponíveis e biologicamente ativas que em sua forma conjugada, estas são absorvidas ou fermentadas pela microbiota intestinal produzindo seus metabólitos como genisteína, daidzeína e gliciteína (LIGGINS et al., 2000 ).

Segundo Batistuzzo et al. (2006) a isoflavona também chamada de fitoestrógeno, atua na prevenção de várias doenças como o câncer de mama, de colo de útero e de próstata. Sua estrutura química é semelhante ao estrógeno (hormônio feminino), por isso é uma substância capaz de aliviar os efeitos da menopausa e da tensão pré-menstrual, as propriedades estrógenas também ajudam a reduzir os sintomas e a prevenir a osteoporose, doença também causada por deficiência hormonal.

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, produz cerca de 66,37 milhões de toneladas de soja anualmente (CONAB, 2012). Os orientais são os maiores consumidores de produtos derivados de soja, observando-se relação inversa entre o consumo das isoflavonas e a incidência de doenças cardiovasculares na população japonesa, isso porque isoflavonas diminuem os níveis de colesterol do sangue (TODA et al.,2001) .

As celulasas são de fundamental importância na produção de etanol de segunda geração. Biocombustíveis de segunda geração são provenientes do bagaço, no nosso caso cana-de-açúcar. No Brasil, estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado na produção de etanol, permitiria duplicar a produção deste combustível no país sem aumentar as áreas de plantio (VÁSQUEZ, 2007). Estima-se que em 2014 o etanol de segunda geração comece a ser produzido no Brasil. Se tal fato se consolidar seria possível elevar em até 50% a produção atual no país e o custo de produção em relação ao processo tradicional cairia em 40% (CTBE-MCT, 2012).

É importante ressaltar que a  $\beta$ -glicosidase está presente não só em organismos celulolíticos como também naqueles incapazes degradar celulose, o processo de degradação total da celulose é complexo, surgem vários problemas ao longo da degradação, um deles é a deficiência que fungos celulolíticos encontram em secretar  $\beta$ -glicosidases, como mencionado anteriormente essa enzima é fundamental na degradação responsável pelo controle da velocidade da reação. Uma forma de minimizar tal problema é associar linhagens produtoras de  $\beta$ -glicosidase no processo (LOPES, 2011).

A maioria das celulosas são produzidas a partir de fungos mesófilos e grande parte dos processos de aplicação industrial de enzimas ocorrem em altas temperaturas, então o uso de enzimas termoestáveis parece ser apropriada, pois estas preservam sua atividade catalítica em altas temperaturas. Uma série de vantagens, tais como aumento na velocidade da reação, diminuição da viscosidade do fluido processado, o aumento da solubilidade do substrato e a redução do risco de contaminação por organismos indesejáveis têm sido propostos para a utilização de enzimas termoestáveis em processos biotecnológicos (LEITE et al., 2007)<sup>a</sup>.

### 3. 3. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Os processos fermentativos são muito utilizados nas industriais e apresentam importância crescente em diversos setores da economia. Muitos produtos são comercializados através de produtos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI, 2001).

Os processos mais conhecidos são o cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso, eles se divergem quanto a quantidade de água livre no processo. Dentro do cultivo submerso existe o cultivo contínuo, descontínuo e semi-contínuo. Esses tipos de cultivos apresentam grandes vantagens como homogeneização do meio e maior facilidade de controle dos parâmetros reacionais (RAHARDJO et al., 2005). O CES consiste em uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas que pode ser suporte ou uma matriz sólida onde o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (SOCOOL et al., 2005).

Mundialmente, os principais produtos e pesquisas em CES estão voltados para o enriquecimento protéico de resíduos agro-industriais, nos quais os microrganismos selecionados aumentam o teor proteico desses materiais, para serem utilizados na alimentação humana ou animal, destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (PANDEY, 2003).

O cultivo em estado sólido também é aplicado para produção de alimentos, biopesticidas, substâncias químicas diversas, e principalmente na produção de enzimas através de fungos filamentosos os quais apresentam capacidade de crescimento em níveis pequenos de água (DALSENTER et al., 2005). Os fungos representam microrganismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima. O processo é simples, o fungo irá consumir o substrato e secretar metabólitos, dentre esses as enzimas (PINTO, 2003).

O cultivo em estado sólido apresenta várias vantagens tais como: menor custo operacional; simples funcionamento; requer pouco espaço e tecnologia (PANDEY et al., 2005). Outro fator interessante do cultivo em estado sólido é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, barateando ainda mais o cultivo e possibilita que esses resíduos tenham uma importante aplicação, diminuindo os impactos ambientais causados por estes e com potencial de gerar um produto (WINGREN et al., 2003).

De acordo com Santos et al. (2005), o Brasil produz toneladas de diversos resíduos agroindustriais e grande parte desses resíduos servem de substratos para o cultivo de diferentes microrganismos, a matéria orgânica presente nesse material é usada como fonte de energia para o crescimento e para a síntese de biomassa celular, proporcionam condições para o crescimento muitas vezes sem a necessidade de adição de outros compostos. Os resíduos mais explorados e, portanto com maior potencial são: farelo de trigo, palha de milho, bagaço de cana de açúcar, cascas de frutas, polpas de café e fibras de coco.

### **3. 4. ENZIMAS TERMOFILICAS**

Os microrganismos são capazes de crescer em diferentes habitats, com temperaturas e pH diferentes desde temperaturas ambientes até temperaturas extremas, e sua classificação segue esses padrões. A classificação segundo a temperatura inclui os psicrófilos (crescimento entre faixa de temperatura de 15 e 20°C), mesófilos (temperaturas que variam de 25 a 40°C), termófilos (temperatura ótima de crescimento entre 45 a 60°C) e os hipertermófilos (temperatura ótima acima de 80°C) (EGOROVA et al., 2005).

Dentre os termófilos existe ainda duas classificações, os moderados que incluem organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20°C e um máximo de 55°C, sendo as temperaturas ótimas entre 40 e 50°C. Nesse grupo estão incluídos os procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e os eucariotos (Domínio Eukarya - fungos filamentosos); termófilos extremos que incluem microrganismos capazes de crescer otimamente em temperaturas entre 65 a 85°C (GOMES et al., 2007; MAHESHWARI et al., 2000). As enzimas

produzidas por estes microrganismos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis

As vantagens de utilizar enzimas na indústria são inúmeras: são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de diversos tipos de resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental (AQUINO et al., 2003). Para a produção de enzimas microrganismos são a melhor escolha, entre os principais produtores de enzimas encontra-se os fungos filamentosos

Geralmente enzimas termofílicas apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH, a agentes químicos e toleram exposição a elevadas temperaturas. Estas características são responsáveis pelo grande interesse no estudo dos microrganismos termofílicos e de suas enzimas termoestáveis (JANG et al., 2003) .

A adaptação de um determinado microrganismo a termofilia envolve a adequação da membrana citoplasmática onde ocorre a substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, fatores que influenciam na estabilidade da membrana, das proteínas como no caso da DNA girase reversa e da Sac7d que só foram descobertas em termófilos ou hipertemófilos e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Tal fato tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (GOMES et al., 2007).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, uma vez que grande parte dos processos biotecnológicos são conduzidos em elevadas temperaturas, desta forma o risco de contaminação por microrganismos mesófilos são significativamente reduzidos e ainda, temperaturas elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, acarretando em um aumento das taxas de reação devido a redução da viscosidade do meio e pelo aumento do coeficiente de difusão dos substratos (EGOROVA et al., 2005). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (ASGHARI, 2004).

Apesar dessas vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso diário na indústria, a aplicação biotecnológica de microrganismos termofílicos tem sido muito limitada, isso ocorre pelo escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis, disponíveis em coleções (AQUINO, 2003).

Segundo Soccol et al. ( 2005) a caracterização enzimática é um passo fundamental para se conhecer um microrganismo, é através da caracterização que se avaliam parâmetros como pH, temperatura, inibidores entre outros. Tal passo é importante, pois possibilita avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo, além disso, permite controlar a velocidade do processo variando estes parâmetros no meio reacional.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Microrganismo utilizado**

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso termofílico *Thermomyces lanuginosus*, isolado de material vegetal em decomposição e mantido em ágar Sabouraud Dextose.

### **4.2. Preparação do Inóculo**

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextose inclinado, mantido por 48 horas a 50°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônia). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agrícolas) se deu pela transferência de 5 mL dessa suspensão.

### **4.3. Produção $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido (CES)**

A enzima foi produzida pelo cultivo do microrganismo em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de farelo de trigo umedecidos com solução nutriente (descrita no item 5.2). A umidade foi ajustada para 75%, em seguida todo o material foi devidamente autoclavado por 20 minutos a 121°C. Posteriormente a inoculação do microrganismo os frascos foram mantidos a temperatura de 50°C por 120 horas.

### **4.4. Extração da enzima**

Para a extração da enzima foram adicionados 50 mL de água destilada nos meios fermentados e mantidos em agitação por 1 hora. Posteriormente o material foi filtrado para separar o extrato enzimático do meio sólido. Após a filtração o extrato foi centrifugado durante 5 minutos a 1500 x g.

#### **4. 5. Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada pela adição de 50  $\mu$ L do filtrado enzimático, 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ G, Sigma), reagindo por 10 minutos à temperatura de 65°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria com  $\lambda$  de 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto de reação. Seguindo protocolos de Leite (2007) e Matsuura et al. (1993).

#### **4. 6. Determinação do pH ótimo**

O pH ótimo da enzima  $\beta$ -glicosidase foi determinado através da incubação de 50  $\mu$ L do extrato enzimático diluído 10 vezes em 250  $\mu$ L do substrato sintético p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ G), e em 250  $\mu$ L de tampão em diferentes valores de pH variando de 3,0 a 8,0. O tampão utilizado foi McIlvaine 0,1 M. A atividade enzimática foi determinada a 65°C, por 10 minutos. Seguindo protocolos de Leite (2007) e Matsuura et al. (1993).

#### **4. 7. Determinação da temperatura ótima**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado incubando-se 50  $\mu$ L do extrato enzimático diluído 10 vezes, nas mesmas condições descritas para a determinação da atividade de pH, em diferentes temperaturas, variando entre 40 e 85°C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão acetato de sódio 0,1 M no pH ótimo da respectiva enzima. Seguindo protocolos de Leite (2007) e Matsuura et al. (1993).

#### **4. 8. Determinação do pH de estabilidade**

A estabilidade da enzima referente à variação da escala de pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a uma temperatura de 30°C em tampão, variando a escala de 3,0 a 11,0. Os tampões utilizados foram McIlvaine 0,1 M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1 M (8,0 – 8,5) e Glicina-NaOH 0,1 M (8,5 – 11,0). A

atividade residual da enzima foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. Seguindo protocolos de Leite (2007) e Matsuura et al. (1993).

#### **4. 9. Determinação da temperatura de estabilidade**

A termoestabilidade da enzima foi estudada incubando-a diluída em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, durante 1 hora em diferentes temperaturas, que variaram de 40 a 80°C. Posteriormente, a atividade enzimática residual foi quantificada nas respectivas condições de pH e temperatura ótimas (LEITE, 2007; MATSUURA et al., 1993).

#### **4. 10. Determinação efeito de etanol**

Para determinar a influência do etanol sobre a enzima, foram utilizados diferentes concentrações de etanol, essas concentrações variaram de 0% á 30%. A atividade enzimática foi quantificada em diferentes temperaturas (30°C, 50°C e 65°C) para avaliar a associação de temperatura e etanol. O pH usado em todas a reações foi o pH ótimo da enzima (LEITE, 2007).

#### **4. 11. Efeito de Glicose sobre a enzima**

Para determinar o efeito de glicose na atividade enzimática, adicionou-se na reação diferentes concentrações de glicose variando de 0 a 100 mM. A atividade enzimática foi quantificada nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima (LEITE, 2007).

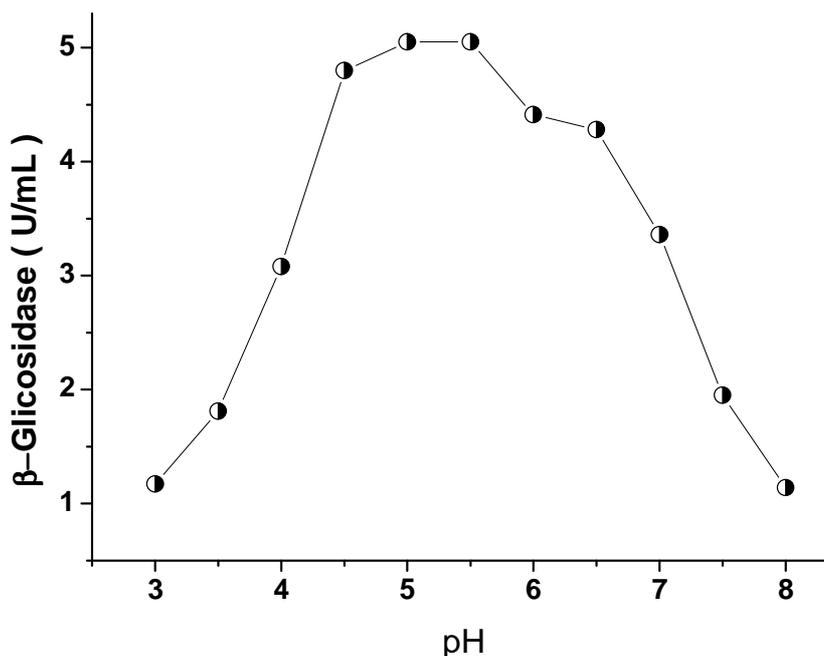
#### **4. 12. Reversão de glicose**

Para a reversão do efeito inibidor da glicose foi usado 60 mM de substrato sintético pNPG e igual concentração de inibidor. A atividade enzimática foi quantificada nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima (LEITE, 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5. 1. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade da enzima

A enzima apresentou atividade ótima nos valores em pH 4,5 – 5,5, apresentando significativa queda a partir do pH 7,0. Desse modo, é possível inferir que a enzima tem a maior atividade em valores ácidos (Figura 1).

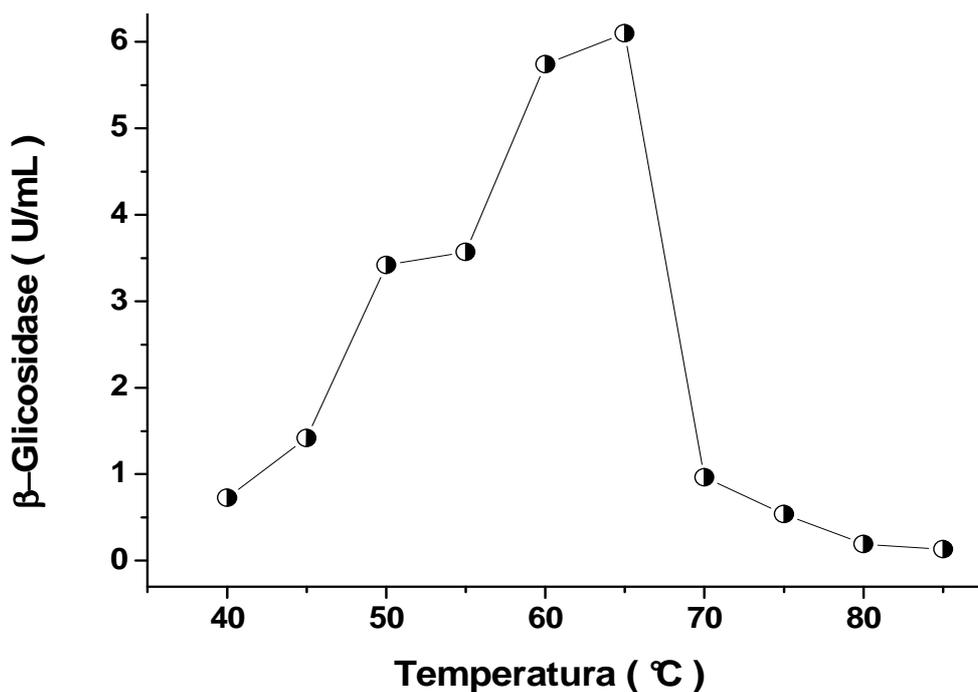


**Figura 1.** Atividade de β-glicosidase em função da variação do pH.

A maior atividade catalítica apresentada pela enzima foi a 65°C (Figura 2). O aumento na temperatura teve efeito positivo na atividade da enzima, apresentando reduzida atividade em temperaturas mais baixas, em torno de 40°C. No entanto, em temperaturas em torno de 70°C pode-se perceber a desnaturação proteica.

Resultados similares aos obtidos no presente trabalho são descritos na literatura, durante a caracterização de uma β-glicosidase termoestável secretada pelo mesmo fungo *Thermomyces lanuginosus*, Lin et al. (1999) descreveram que a maior produção enzimática foi em pH 6,0 e 65°C como sendo a temperatura ótima da enzima.

Segundo Ma et al. (2011) a temperatura ótima da  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus glaucus* é de 60°C, e a  $\beta$ -glicosidase do fungo *Melanocarpus* sp. obteve como temperatura ideal para crescimento 60° e pH 6,0 (KAUR et al., 2007), resultados esses bastante semelhantes à caracterização realizada no presente trabalho.



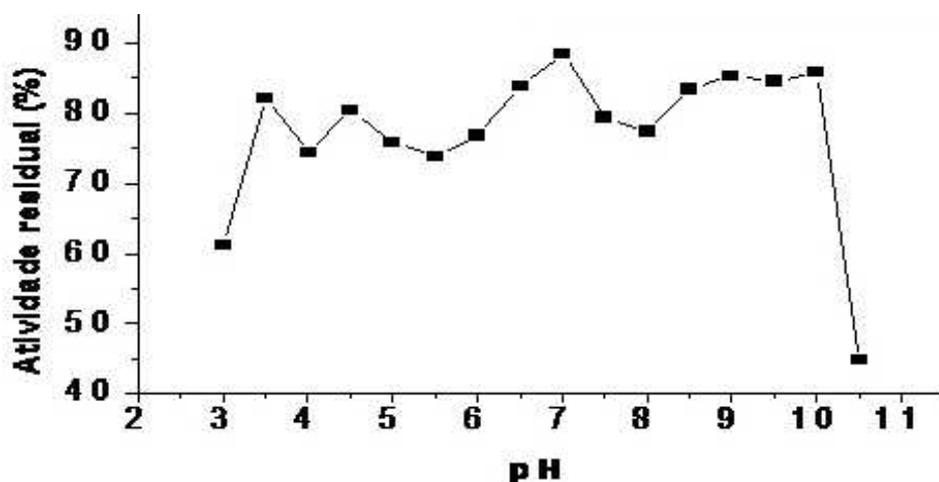
**Figura 2.** Atividade de  $\beta$ -glicosidase em função da temperatura.

A temperatura ótima para a maioria das  $\beta$ -glicosidases fúngicas variam de 40 a 50°C e valores de pH entre 4,0 - 6,0 (BHATIA et al., 2002). Resultados semelhantes foram descritos por Lin et al. (1999), quando caracterizou uma  $\beta$ -glicosidase termoestável secretada pelo mesmo fungo *Thermomyces lanuginosus*.

Leite et al. (2007)<sup>b</sup> estudando a  $\beta$ -glicosidase do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* encontrou valores de pH ótimo de 4,0-4,5 e temperatura ótima de 80°C. Daroit (2007) caracterizou uma  $\beta$ -glicosidase termofílica isoladas de *Monascus purpureus*, onde apresentou temperatura ótima de 50°C e pH 5,5. Segundo Zanoelo et al. (2004) o fungo *Scytalidium*

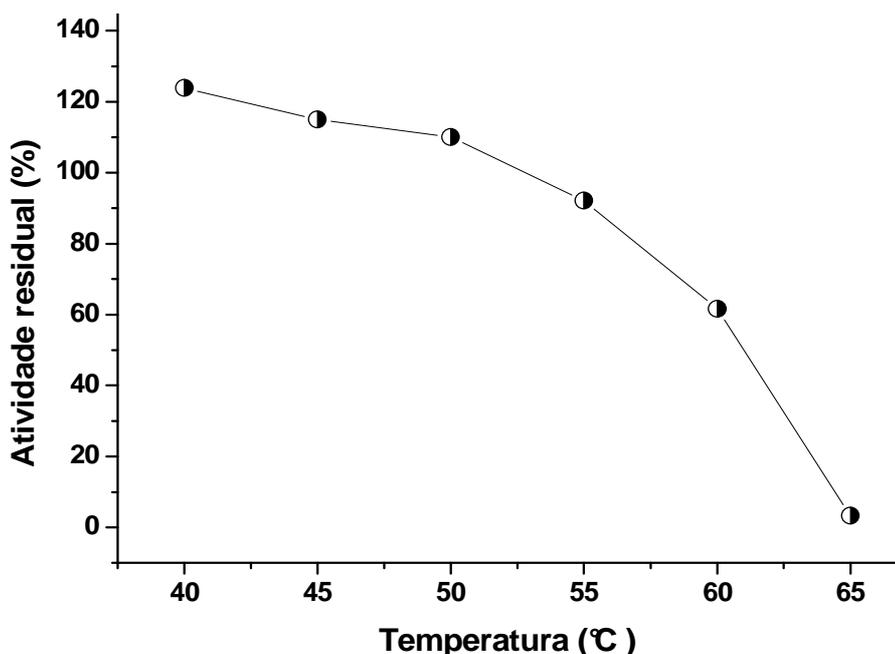
*thermophilum* produtor de  $\beta$ -glicosidase foi caracterizado e apresentou boa atividade enzimática em pH 6,5 a 60° C.

A  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* apresentou expressiva estabilidade estrutural em função do pH e da temperatura. A enzima manteve sua atividade original após 24h de incubação entre os valores de pH 3,5 – 10,0; em pH 3,0 a enzima apresentou cerca de 60% de sua atividade catalítica (Figura 3).



**Figura 3.** Estabilidade enzimática em função do pH após 24h de incubação

Em relação à termoestabilidade a  $\beta$ -glicosidase manteve 100% da sua atividade original após 1 hora de incubação a 55°C, e a 60°C perdeu apenas 38,4% da sua atividade original. Nas temperaturas acima de 60°C a enzima sofreu desnaturação (Figura 4).



**Figura 4.** Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1h de incubação.

Lin et al. (1999), obteve resultados similares sobre a  $\beta$ -glicosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus*, onde a enzima permaneceu estável na faixa de pH 5,0 -10,0 e manteve 100% de sua atividade original a 50°C após 30 minutos de incubação, a 65°C a proteína se desnaturou.

Segundo Maitan (2011) a enzima de *Debaryomyces hansenii* quando incubada por 30 minutos nos pH 2,0 - 8,0 manteve acima de 85% sua atividade no pH 4,5 e apresentou maior estabilidade nos pH 5,5 - 8,0. Em pH abaixo de 3,5 não apresentou nenhuma atividade. Ainda segundo estudos de Maitan (2011) a  $\beta$ -glicosidase quando incubada a 55°C perdeu 82% de sua atividade original em 10 minutos, após 15 minutos de incubação ela foi totalmente desnaturada, a mesma enzima em 50°C manteve apenas 30% de sua atividade em 1h de incubação. Caracterização realizada por Ma et al. (2011) demonstrou que a  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus glaucus* permaneceu estável em pH 2,2 a 7,5 após 3 horas de incubação.

Zanoelo et al. (2004) observaram que a  $\beta$ -glicosidase secretada pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* permaneceu estável por 1 hora a 50°C, porém apresentou meia vida de apenas 20 minutos a 55°C. De acordo com ensaios realizados por Lopes (2011) a  $\beta$ -glicosidase extracelular de

*Trichoderma harzianum* após 15 minutos a 60°C manteve apenas 36% de sua atividade original.

No fungo *Thermoascus aurantiacus* o autor relatou que a enzima manteve sua atividade original após 1 hora a 70°C e a mesma enzima manteve-se estável nos pH 4,5-6,5 em 24 h de incubação, porém constatou-se uma significativa queda quando os valores se aproximam do pH 7,5 de acordo com o mesmo autor a  $\beta$ -glicosidase produzidas pelo microrganismo *Aureobasidium Pullulans* mostrou ser mais estável em uma faixa de pH mais ampla nos pH 4,0 - 10,0 manteve 100% de sua atividade original (LEITE, 2007).

A literatura descreve que em microrganismos termofílicos há tendência das enzimas apresentarem estabilidade térmica mais pronunciada, devido a fatores intrínsecos que fornecem uma maior rigidez da proteína o que diminui o risco de desdobramento, essa rigidez está associada à hidrofobicidade enzimática, grande parte das enzimas termoestáveis possui uma maior quantidade de aminoácidos hidrofóbicos do que as mesófilicas e, também alterações na composição de aminoácidos da sequência primária da molécula acarretam na estabilização da estrutura secundária (GOMES et al., 2007).

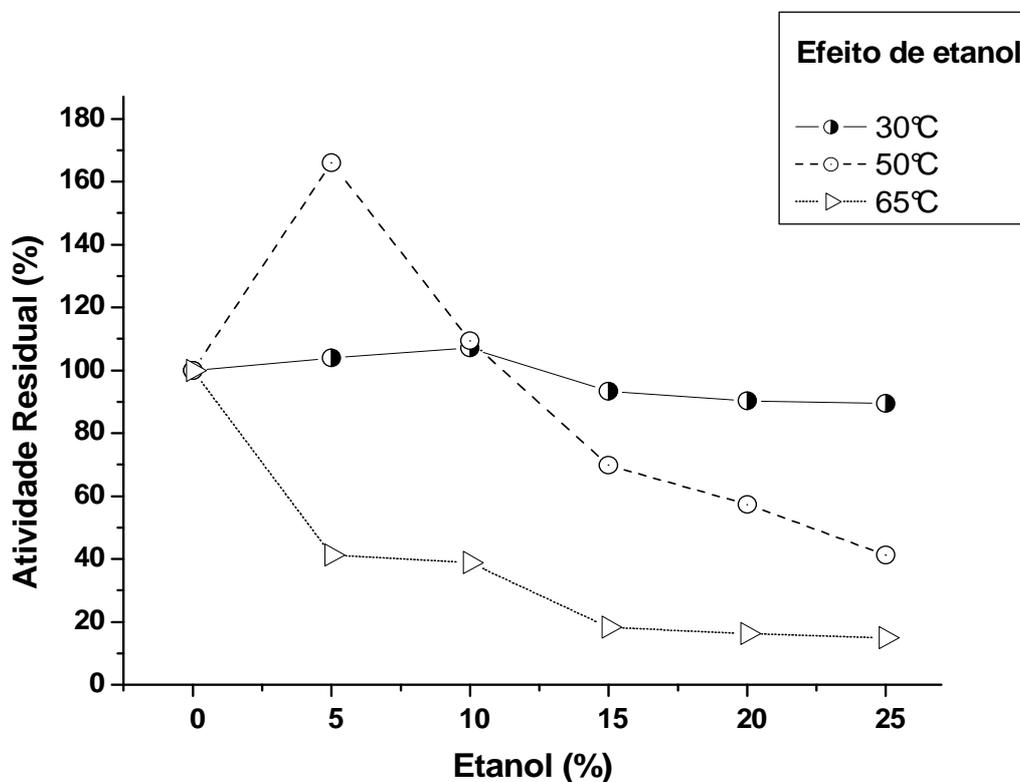
## **5. 2. Efeito de etanol e glicose sobre a enzima**

A figura 5 mostra nitidamente a influência positiva do etanol sobre a enzima. O etanol em determinadas concentrações pode acelerar a velocidade da reação catalisada por algumas  $\beta$ -glicosidases. Essa capacidade de aumentar o potencial enzimático está associada à atividade glicosil-transferase, onde o substrato atua como doador e o etanol como aceptor para o cátion glicosil intermediário. Leite et al. (2007)<sup>b</sup> e Kaur et al. (2007) também constataram essa característica para a  $\beta$ -glicosidase extracelular produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* e *Melanocarpus* sp.

O etanol a 30°C na concentração de 5% (figura 5) aumentou 4% da atividade original da  $\beta$ -glicosidase, a 10% de etanol seu potencial foi ainda maior chegando quase a 10% do original. Ela ainda se manteve estável nas demais concentrações 15, 20 e 25% mantendo mais de 80% de sua atividade residual. Na reação ocorrida a 50°C o aumento do potencial enzimático foi ainda maior, chegando a ser 60 e 10% maior que sua atividade original em concentração de 5 e 10% de etanol, respectivamente. Nas concentrações de

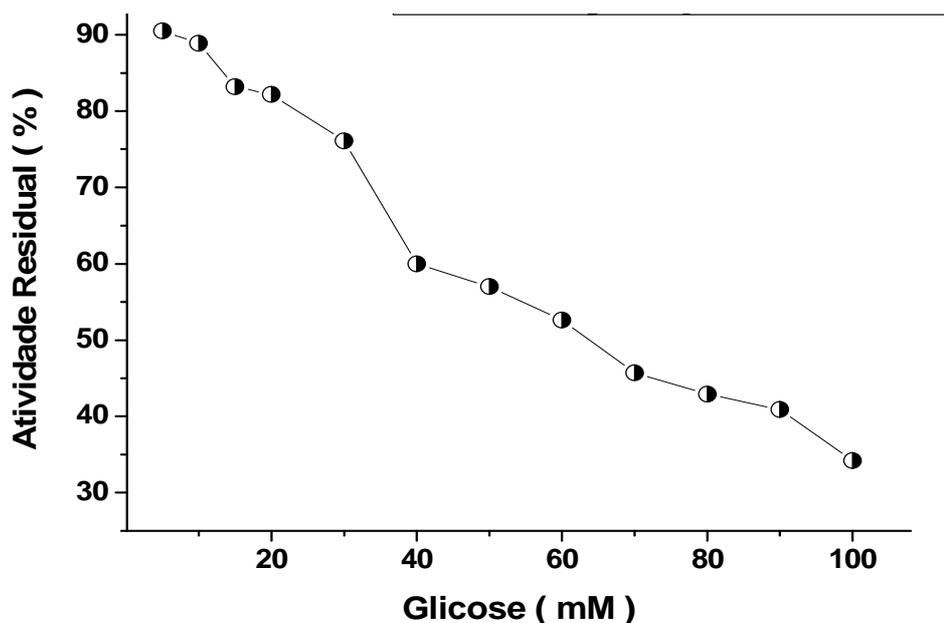
15 e 20% de etanol a enzima ainda apresentou metade de sua atividade, já a 25% de etanol percebe-se uma considerável redução da atividade enzimática. Com o aumento da temperatura para a ótima da enzima, 65°C, não foi possível observar a ativação da enzima em concentrações reduzidas de etanol (Figura 5).

A estabilidade enzimática a solventes orgânicos é inversamente proporcional a temperatura, em temperaturas mais elevadas ocorre à interação do solvente orgânico com as regiões hidrofóbicas localizadas nas porções internas da molécula protéica, resultando em alterações estruturais e consequentemente na perda da função catalítica (LEITE, 2007).



**Figura 5.** Efeito da concentração de etanol sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase a 30°C-50°C-65°C.

Como dito anteriormente, um dos maiores entraves na utilização da  $\beta$ -glicosidase em processos industriais é a inibição exercida pela glicose. Infelizmente a enzima produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* foi inibida pela presença de glicose na mistura de reação (Figura 6).



**Figura 6.** Para a enzima produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* a inibição por glicose foi completamente revertida com o aumento da concentração de substrato.

No entanto, a inibição foi revertida quando a concentração de substrato foi aumentada para valores iguais ao do inibidor (Tabela 1). Essa característica é típica de inibição competitiva, onde o inibidor e substrato competem pelo sítio ativo da enzima (LEITE, 2007). De acordo com a literatura inibições do tipo competitiva são mais comuns em  $\beta$ -glicosidase fúngicas (LEITE, 2007).

**Tabela 1.** Reversibilidade da inibição por glicose pelo aumento da concentração de substrato.

<b>Atividade residual (%) pNPG- 2mM</b>	<b>Atividade residual (%) pNPG- 2mM Glicose- 60mM</b>	<b>Atividade residual (%) pNPG- 60mM Glicose- 60mM</b>	<b>Tipo de Inibição</b>
<b>100</b>	<b>40,95</b>	<b>82,84</b>	<b>Competitiva</b>

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características obtidas a partir das análises de pH e temperatura, permitem inferir que a enzima produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* apresenta elevada estabilidade estrutural, o que estimula sua aplicação em processos industriais.

A reversibilidade da inibição por glicose, associada à elevada estabilidade ao etanol apresentada pela enzima, capacita a utilização desta em processos de sacarificação e fermentação simultânea, onde a glicose liberada pela hidrólise enzimática é convertida em etanol por microrganismos fermentadores.

## 7. REFERÊNCIAS

AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 323-328, 2003.

ASGHARI, S. M.; KHAJCH, K.; RANJBAR, B.; SAEDI, R. J. J.; NADERI-MANESH, H. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 34-173, 2004.

BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. Formulário Médico farmacêutico. 3ª edição, São Paulo: **Pharmabooks**, 2006.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, 254p.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: Cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v 22, p.375–407, 2002.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp). Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2006.

CERQUEIRA, D.A., RODRIGUES, G., MEIRELES, C.D.. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrates Polymers**, v. 69, p. 579–582, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/politica\\_agricola/Safra/avalia.html](http://www.conab.gov.br/politica_agricola/Safra/avalia.html). Acesso em: Dezembro, 2012.

CTBE-MCT. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol-Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – Ministério da Ciência e

Tecnologia. Disponível em: <http://www.bioetanol.org.br>. Acesso em dezembro de 2012.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.,; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.A. Mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p.801-7, 2005.

DAROIT, J.D. Caracterização de uma  $\beta$ -glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). **Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2007.

EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, (6), p. 649-655, 2005.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1207-1212, 2004.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30 (1), p. 136-145, 2007.

JANG, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermoestable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 263-268. 2003.

LEITE, R. S. R. Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de  $\beta$ -glicosidases produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados.

Tese (Programa de pós-graduação em ciências biológicas - microbiologia aplicada). **Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 2007.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136-140, p.281 - 288, 2007.<sup>a</sup>

LEITE, R.S.R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified  $\beta$ -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1101–1106, 2007.<sup>b</sup>

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

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSMICK, S.; ATKINSON, C., COWARD, W.B.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts .**The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.

LIN, J.; PILLAY, B.; Singh, S. Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*–SSBP. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.30, p. 81-87, 1999.

LYND, L.R., WEIMER, P.L., van ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66 (3), p.506-577. 2002.

KAUR. J.; CHADLA.B.S.; KUMAR.B.A.; SAINI.H.S.; Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, v, 10, p. 261-270, 2007.

LOPES, R.M. Identificação e Purificação de uma  $\beta$ -glicosidase extracelular e construção de vetores para expressão constitutiva para celulases em *Kluyveromyces marcianus* UFV-3. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola). **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais, 2011

MA.S.J.; LENG.B.; XU.X.Q.; ZHU.X.Z.;SHI.Y.; TAO.Y.M.; CHEN.S.X.; LONG.M.N.; CHEN.Q.X. Purification and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Aspergillus glaucus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10(84), p. 19607-19614, 2011.

MAICAS, S.; MATEO, J.J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, p. 322-335, 2005.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 461–488, 2000.

MAITAN, P.G. Produção, Purificação e Caracterização de  $\beta$ -glicosidases livres e imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG, 2011.

MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -glicosidase from soybeans hydrolyse daidzeína and genistina. **Journal Food Science**, v. 58, p.1623-1627, 1993.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209– 217, 2004.

PALMA-FERNANDEZ,E.R.D. Purificação e caracterização bioquímica de  $\beta$ -glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*.,**Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical. Engineering Journal*, v.13 (213), p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology*. 1º ed. New Delhi: **Asiatech Publishers**, Inc, p. 760, 2005.

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

PINTO, G. A. S. Produção de tanase por *Aspergillus niger*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 2005.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of gh family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in biophysics and molecular biology*, v.89, p.246-291, 2005.

SANTOS, S. F. M.; NÓBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pendúculo de cajú para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida. IN: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, Recife, 2005.

SOCCOL, C. R.; ROJAN. P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: *Enzyme Technology*. New Delhi: **Asiatec Publishers Inc**, p.221-230, 2005.

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T. & YOKOTSUKA, K. Changes in

isoflavone compositions of soybean during soaking process. **Food Science and Technology Research**, v. 6, p. 314-319, 2001.

TURNER,P.; SVENSSON,D.; ADLERCREUTZ,P.; KARLSSON,E.N. A novel variant of *Thermotoga neapolitana*  $\beta$ -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation. **Journal of Biotechnology**, v.130 p.67-74, 2007.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N.C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA Jr. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 137-140, (1-12), p. 141-153, 2007.

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

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Program**, v. 19 (4), p. 1109-1117. 2003.

WHITHERS, S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate polymers**, Oxford, v.85, p.181-187,2004.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A.  $\beta$ -glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, p. 137-143, 2004.