



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais



**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE INDUSTRIAL
DA β -GLICOSIDASE PRODUZIDA PELO FUNGO**

Lichtheimia ramosa

Nayara Fernanda Lisboa Garcia

Dourados
Mato Grosso do Sul – Brasil
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE INDUSTRIAL
DA β -GLICOSIDASE PRODUZIDA PELO FUNGO**
Lichtheimia ramosa

Nayara Fernanda Lisboa Garcia

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais –
Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação do
Prof^o. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
e co-orientação do Prof^o. Dr. Marcelo Fossa da Paz.

Dourados
Mato Grosso do Sul – Brasil

2011

DEDICO:

Á Miguel e Neli, meus pais, pelo amor, paciência, tolerância, dedicação,
cuidados de uma vida inteira, por deixar os seus sonhos para sonhar os meus,
por me fazer seguir em frente sempre.
Agradeço por me ensinarem que fazemos diferença mesmo
quando não percebemos. Amo vocês.

Á Nighel Fernando, meu irmão, pela amizade, companheirismo,
pela força e por sempre acreditar em mim.
Meu exemplo diário e inspiração.
Você é meu melhor amigo. Te amo.

A minha família por estar sempre comigo.

Dedico também a todos aqueles que não se amedrontam
diante das dificuldades, respiram fundo, erguem
a cabeça e enfrentam todos os obstáculos que a vida lhes impõe,
carregando consigo a certeza de que o conhecimento
é o único bem que ninguém pode lhes tirar.

AGRADECIMENTO

A Deus pelas bênçãos concedidas, grande responsável por permitir que tudo isso fosse possível.

Ao meu pai, Miguel, por sempre me apoiar e incentivar a ir em busca dos meus ideais, por acreditar e confiar em mim e por ser meu exemplo de dedicação e responsabilidade, mesmo um pouco longe.

À minha mãe, Neli, por seu exemplo de força, coragem, amor e dedicação, meu porto seguro, me amparando nas dificuldades e dando suporte para que eu continuasse em frente.

Ao meu irmão, Nighel Fernando, pelo apoio, amizade e incentivo constante. Por me ensinar a ir em busca dos meus sonhos e ideais sempre. O sucesso certamente será consequência em sua vida.

A minha família incansáveis batalhadores pelos valiosos exemplos de vida caráter dignidade e afeto por atuarem como verdadeiros alicerces para esta caminhada. Vocês são a razão maior da minha conquista.

Ao meu orientador Professor Dr. Rodrigo, sempre presente. Pelo incentivo pela paciência, disponibilidade, postura, respeito, atenção, por todos os conselhos pelo meu desenvolvimento acadêmico pela confiança depositada, por ter aberto as portas do laboratório pra mim e por ter sido o responsável pelos meus passos iniciais no mundo da pesquisa durante o período de Iniciação Científica, jamais me esquecerei da oportunidade concedida e de seu contagiante espírito de pesquisador. Obrigada pela dedicação e pela maneira como orientou meus passos preocupando-se a todo o momento com a minha compreensão dos procedimentos realizados, contribuindo para o meu crescimento pessoal e intelectual. Serei eternamente grata e sinto-me honrada em tê-lo tido como orientador.

Ao meu divertido co-orientado, Prof. Dr. Marcelo Paz por toda ajuda, paciência, pela inestimável contribuição nas etapas deste trabalho, e pela composição da banca.

A companheira de laboratório e trabalho, Flávia, pela ajuda, companheirismo e incentivo, obrigada pelas conversas no laboratório quando tudo parecia que não ia dar certo e pelos anos de amizade.

Aos companheiros do laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, Maria Alice, Ana Carolina, Vinicius, Guilherme, Flávia, Paula, Marília pelo convívio enriquecedor pelo esmero e dedicação pela paciência e sabedoria por todo auxílio e cumplicidade, pela torcida pelo meu crescimento profissional. O meu muito obrigado.

Aos laboratoristas, pela dedicação com que realizam seus trabalhos e pelo carinho com que me auxiliaram na parte técnica.

À Fabiana ou carinhosamente Fabi, além da amizade, pela atenção e auxílio prontamente dedicados, pelas risadas e companheirismo por estar sempre disposta a me auxiliar, por toda contribuição e ensinamento se portando como uma verdadeira mestre que és. Muito obrigada.

À futura Mestre em Bioprospecção, Ana Paula. Minha eterna gratidão pela ajuda, companheirismo, amizade e auxílio. Pelas conversas sem pressa, os risos, a confiança, por todas as dicas, conselhos e carinho dispensado a mim.

Ao Prof. Dr Gustavo Fonseca e ao Fabiano, pela contribuição, colaboração e ajuda nos passos iniciais.

Aos professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, pelo conhecimento transmitido e as valiosas colaborações para o meu enriquecimento acadêmico.

Aos meus amigos de graduação... Sei que sempre poderei contar com todos. O caminho teria sido muito mais tortuoso sem vocês.

A todos que me confortaram, ajudaram e me incentivaram durante toda a minha graduação, obrigada por acreditarem sempre em mim.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e durante toda minha trajetória da graduação. Agradeço a todos de coração.

A razão pela qual os anjos voam
é que eles não dão pesos a si mesmos...

E nunca considerem seu estudo como uma obrigação,
mas sim como uma oportunidade invejável de aprender (...)

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.

E para se chegar, onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer.

“(...) e que bom não ter desistido em meio ao dilúvio.”

(Heloísa Chiattonne, 1998)

SUMÁRIO

1. RESUMO	I
2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES	II
3. LISTA DE TABELAS	III
4. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IV
5. INTRODUÇÃO.....	1
6. REVISÃO DA LITERATURA	4
6. 1. Celulose	4
6. 2. Microrganismos celulolíticos:	5
6. 3. Cultivo em Estado Sólido (CES).....	6
6. 4. Produção de enzimas microbianas.....	7
6. 5. β – Glicosidase	7
6. 6. Aplicações industriais de β - Glicosidase	7
6. 7. Características das β - Glicosidasas microbianas	9
7. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
7. 1. Microrganismo utilizado	9
7. 2. Preparação do inóculo	10
7. 3. Produção β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)	10
7. 4. Extração da enzima.....	10
7. 5. Determinação da atividade de β - Glicosidase	10
7. 6. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima	11
7. 7. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade da enzima	11
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

RESUMO

As β -glicosidases tem despertado grande interesse industrial, pois são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, principal produto proveniente da hidrólise enzimática da celulose, em monômeros de glicose podendo ser convertida em combustíveis não fósseis como etanol. A propriedade de atuar em diferentes substratos possibilita a aplicação dessa enzima em diversos processos industriais, tais como: na hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de açúcares fermentáveis, na obtenção de alimentos funcionais derivados de soja ou ainda na indústria de sucos e bebidas aumentando a qualidade aromática de derivados de uva. De modo geral, a aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com o custo de produção e com as características da mesma. Dessa forma, diversos trabalhos descrevem a incessante busca de linhagens microbianas hiperprodutoras de enzimas que apresentem características apreciáveis industrialmente. Neste trabalho foi estudada a caracterização física e química da β -glicosidase produzida pelo fungo filamentosso, *Lichtheimia ramosa*. A enzima apresentou maior atividade catalítica nos valores de pH 5,0 e 5,5 a temperatura de 60°C. Quanto a termoestabilidade, a enzima manteve-se estável de 35 a 55°C no período de uma hora de incubação. A atividade enzimática original foi recuperada em ampla faixa de pH 4,0 - 10,5 após 24 horas de incubação. A β -glicosidase foi inibida significativamente em concentrações superiores a 100mM de glicose e 15% de etanol. Os resultados obtidos demonstram que a enzima produzida pelo microrganismo apresenta expressiva estabilidade ao pH e a temperatura. A inibição ocasionada pela glicose pode ser contornada por processos de Sacarificação e Fermentação Simultânea, onde os monossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática são convertidos em etanol por microrganismos fermentadores.

Palavras-Chave: 1) Celulases Microbianas 2) β -glicosidase 3) Caracterização Enzimática.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação molecular da celulose e pontos de ação da endo e exoglucanase e β - glucosidases. (KUMAR et al., 2008).....	5
Gráfico 1: Atividade de β -glucosidase em função da variação do pH	12
Gráfico 2: Atividade de β -glucosidases em função da variação da temperatura	12
Gráfico 3: Estabilidade enzimática em função da variação do pH.....	13
Gráfico 4: Estabilidade enzimática em função da variação da temperatura.....	13
Gráfico 5: Efeito da concentração de etanol sobre a atividade de β -glucosidase.....	14
Gráfico 6: Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da β - glucosidase.....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNPβG) e inibidor	15
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CES: Fermentação em Estado Sólido

pNP β G: p-nitorfenil β -D-glicopiranosídeo

INTRODUÇÃO

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, biomassa mais abundante do planeta e valiosa fonte renovável de carbono, energia e matéria-prima, sendo que cerca de 10^{12} toneladas são sintetizadas e degradadas por ano na Terra (SCHURZ, 1999). Nesse sentido, o desenvolvimento de tecnologias para a utilização deste polissacarídeo como fonte de energia é de fundamental importância para a manutenção humana (LEITE, 2004).

Estima-se que milhares de toneladas de resíduos agroindustriais são gerados por ano no Brasil. Muitas vezes, grandes partes desses resíduos ficam dispostos ao campo tornando-se um problema ambiental devido a sua lenta degradação natural (YANG et al., 2001). Os resíduos resultantes das atividades agrícolas podem ser utilizados para a produção de celulases, principalmente em países como Brasil, devido à elevada disponibilidade e o baixo custo destes materiais (ZHANG et al., 2006). Diversos trabalhos relatam a produção de diferentes enzimas pelo cultivo de micro-organismos em resíduos agroindustriais (ADSUL et al., 2004; KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2007; WEN et al., 2005).

O grande desafio da produção economicamente viável de etanol a partir da biomassa lignocelulósica consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado (SILVA et al., 2008). A celulose pode ser hidrolisada pela exposição a altas concentrações de ácidos em elevadas temperaturas. No entanto, o processo enzimático apresenta algumas vantagens, como: maior rendimento em glicose pura, menor impacto ambiental e condições moderadas de reação. As tecnologias químicas são caras e originam resíduos tóxicos para as leveduras, o que inviabilizam a fermentação alcoólica (WEN et al., 2004). Por outro lado, o alto custo das celulases dificulta a aplicação dessas enzimas na hidrólise da celulose. Uma alternativa para contornar este problema é a utilização de biomassa vegetal de baixo valor agregado (resíduos) para o cultivo de micro-organismos produtores de celulases (ADSUL et al., 2004).

A hidrólise enzimática do material celulósico envolve a ação sinérgica de no mínimo três enzimas diferentes: a endoglucanase, a exoglucanase e a β -glicosidase. A endoglucanase hidrolisa as cadeias de celulose internamente, resultando em uma rápida redução grau de polimerização; a exoglucanase remove unidades de celobiose a partir

de extremidades não redutoras da molécula e a β -glicosidase hidrolisa celobiose e outras celodextrinas, liberando monômeros de glicose livre. Todas as três enzimas do complexo sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose. Pesquisas com β -glicosidases microbianas, associadas as demais enzimas celulolíticas, podem contribuir para viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agro-industriais ricos em celulose (DA-SILVA et al., 1997; PARRY et al., 2001; LEITE et al., 2007).

As β -glicosidases microbianas podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade ao substrato, sendo distribuídas em três grandes grupos: (1) aril β -glicosidases, enzimas que atuam em substratos aril-glicosídeos; (2) celobiasas verdadeiras, que apresentam elevada especificidade para a hidrólise da celobiose; (3) enzimas que apresentam baixa especificidade, isto é, enzimas que atuam em diferentes substratos glicosídeos (VILLENA et al., 2006). A propriedade de atuar em diferentes substratos glicosídeos possibilita a aplicação desta enzima em vários processos industriais, tais como: na hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de açúcares fermentáveis, na obtenção de alimentos funcionais derivados de soja ou ainda pela indústria de sucos e bebidas aumentando a qualidade aromática de derivados de uva. De modo geral, a aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com o custo de produção e as características da mesma. (LEITE et al, 2008)

Os principais entraves para a utilização industrial das β -glicosidases microbianas são o elevado preço de produção, a baixa estabilidade das enzimas e a forte inibição por glicose. Fato este, justifica a constante busca por linhagens microbianas que apresentem expressiva produção de β -glicosidase com características apreciáveis industrialmente (ZANOELO et al., 2004).

Recentemente foram isoladas 10 linhagens de fungos filamentosos do solo do cerrado, dentre as linhagens, o isolado *Lichtheimia ramosa* apresentou expressiva produção de β -glicosidase, quando cultivado em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido (FES).

Visando contribuir na aplicação industrial destas enzimas, este trabalho teve como objetivos principais:

1) Estudar as características físicas e químicas da β -glicosidase produzida pelo fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa* em fermentação em estado sólido.

2) Delinear as condições ideais para a aplicação industrial da enzima produzida pelo micro - organismo para a sua possível aplicação industrial.

6. REVISÃO DE LITERATURA

6. 1. Celulose

Estima-se que a produção global de matéria lignocelulósica atinja valores entre 120 e 150 bilhões de toneladas (em matéria seca) por ano, algo como 30 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo, ou mais de quatro vezes o total anual do consumo mundial de energia (RAJOKA; MALIK,1997).

A lignocelulose é um polímero complexo, consistindo de feixes fibrosos de celulose cristalina, revestidos por uma matriz polimérica de hemicelulose e lignina. Embora as composições possam variar este material pode ser geralmente considerado como sendo composto por 50% celulose, 25% hemicelulose e 25% lignina (INGRAM; DORAN, 1995).

É o recurso biológico natural mais abundante da biosfera, sendo que cerca de 10^{12} toneladas são sintetizadas e degradadas por ano na Terra. Dado seu caráter renovável e biodegradável, tem sido utilizada para a manufatura de diversos produtos úteis ao homem. (SCHURZ, 1999)

Além disso, é um resíduo predominante na atividade agrícola e neste aspecto, o Brasil conta com grandes vantagens para a produção de celulases, devido à disponibilidade, a baixo custo, de materiais agroindustriais.

A celulose é um homopolímero constituído por monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Cada molécula de glicose relaciona-se com a seguinte por uma rotação de 180 graus, e o átomo de oxigênio do anel estabelece uma ponte de hidrogênio com o agrupamento 3-OH da molécula seguinte. A conformação β -1,4 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 (LEITE, 2007).

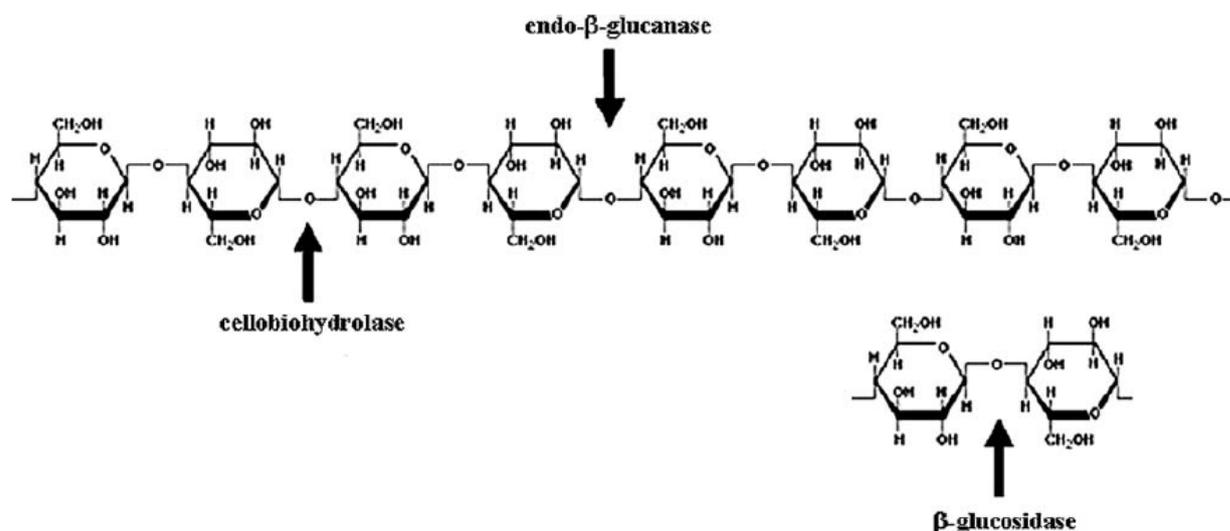


Figura 1: Representação molecular da celulose e pontos de ação da endo e exoglucanase e β glucosidases (KUMAR et al., 2008)

As fibras de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, a porção hidrolisável por enzimas é chamada de região amorfa e a porção resistente constitui a sua porção cristalina (LEITE, 2007).

6. 2. Microrganismos celulolíticos

A grande quantidade de celulose formada anualmente não se acumula sobre o planeta devido à ação de fungos e bactérias que degradam eficientemente os materiais nas paredes celulares de plantas. A biodegradação da celulose por celulases e celulosomas produzidos por uma grande variedade de microrganismos representa o maior ciclo de carbono da biosfera e pode amplamente ser utilizada na produção de bioprodutos, sem emissão de CO² na atmosfera (ZHANG et al, 2006)

Microrganismos celulíticos podem ser encontrados em toda a biota onde se acumulem resíduos celulíticos. Eles usualmente ocorrem em populações mistas, incluindo espécies celulíticas e não celulíticas, as quais frequentemente interagem sinergicamente, 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.

A capacidade de fungos filamentosos em degradar eficientemente polímeros, à ecologia microbiana e aos mecanismos básicos de regulação nutricional, bem como estabelece diversas possibilidades de aplicações industriais (ARO et al., 2005).

6.3. Cultivo em Estado Sólido (CES)

O Cultivo em Estado Sólido caracteriza-se pelo cultivo de micro-organismos em substratos sólidos insolúveis na ausência (ou quase ausência) de água livre. (Pandey, 2003) Avanços tecnológicos estão sendo gradualmente incorporados ao processo em estado sólido, podendo torná-lo viável para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo (SANT'ANA JR, 2001).

O interesse em CES vem da sua simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos microrganismos, especialmente fungos (DEL BIANCHI; et al., 2001), do consumo reduzido de energia, e da ausência de equipamentos complexos e sistema de controle sofisticado. Devido à ausência de água livre, pequenos fermentadores são necessários e os processos de recuperação do produto são feitos com maior facilidade (DEL BIANCHI; et al., 2001). As vantagens do CES para a produção de enzimas ainda incluem maiores níveis de produtividade, baixo nível de repressão catabólica e aumento na estabilidade de enzimas excretadas (CAPALBO, 2001).

Além disso, vários fungos produzem em CES, rendimentos de enzimas compatíveis com a fermentação submersa e em alguns casos produzem enzimas e isozimas que não são produzidas em meio líquido (HOLKER; et al., 2004).

A seleção adequada de substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. O substrato pode estar tanto na forma natural quanto na forma sintética, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter matérias primas ou dos resultados que se quer conseguir. Porém, de forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e ou resíduos agroindustriais (DEL BIANCHI; et al., 2001), devido ao baixo ou nenhum valor comercial. Entre estes, destacam-se bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de café, maçã, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, casca de arroz, palha de trigo, farinha de trigo, farinha de mandioca, farinha de arroz e amido (PANDEY et al., 2000).

6. 4. Produção de enzimas microbianas

Uma das principais características das enzimas é sua especificidade sobre o substrato, agindo sobre um número muito limitado de compostos e sem efeito sobre outros (SANT'ANA Jr., 2001).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto intervalo de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples e de baixo custo; e a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (FELLOWS, 1994).

6. 5. β – Glicosidases

A β -glicosidase apresenta importante papel na hidrólise enzimática da celulose, sendo responsável pela conversão da celobiose em monômeros de glicose. A celobiose é o principal produto formado pela ação das enzimas despolimerizantes sobre a cadeia de celulose, o acúmulo desse dissacarídeo 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 celulasas, liberando monossacarídeos fermentáveis para a produção de etanol (LEITE et al., 2007). Portanto, as β - glicosidases não são responsáveis apenas pela produção de glicose a partir de celobiose, mas permitem também a ação eficiente de exoglucanases e endoglucanases.

6. 6. Aplicações industriais de β - Glicosidase

A função desempenhada pela β -glicosidase no processo de degradação enzimática da celulose, faz com que esta enzima apresente um grande potencial para a indústria de etanol, dessa forma, pesquisas com β glicosidases microbianas associadas as demais enzimas celulolíticas, podem contribuir para viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose (LEITE, 2007).

A propriedade de atuar em diferentes substratos glicosídeos possibilita a aplicação desta enzima em vários processos industriais. A presença de β -glicosidases 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 o aroma do vinho (MAICAS; MATEO, 2005; VILLENA et al., 2007).

A β -glicosidase apresenta importante papel na hidrólise enzimática da celulose, sendo responsável pela conversão da celobiose em monômeros de glicose. A celobiose é o principal produto formado pela ação das enzimas despolimerizantes sobre a cadeia de celulose, o acúmulo desse dissacarídeo 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 celulasas, liberando monossacarídeos fermentáveis para a produção de etanol (LEITE et al., 2007).

Outra aplicação industrial das β -glicosidases consiste no seu potencial de hidrolisar isoflavonas glicosídicas da soja. A maior parte das isoflavonas presentes na soja encontra-se na forma glicosilada (daidzina, genistina e glicitina), estas moléculas apresentam menor atividade biológica que as suas correspondentes formas desglicosiladas (agliconas), ou seja, daidzeína, genisteína e gliciteína (PARK et al., 2001). Somente as isoflavonas livres da molécula de açúcar (agliconas) são absorvidas pelo trato intestinal humano. Como as isoflavonas glicosiladas não conseguem atravessar a barreira epitelial do intestino, não apresentam efeito funcional (OTIENO; SHAH, 2007). Diferentes trabalhos descritos na literatura afirmam que uma dieta rica em isoflavonas pode contribuir no controle e prevenção de muitas doenças crônicas, tais como: câncer (mama, próstata e cólon), osteoporose, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e outras (CARRÃO-PANIZZI; BORDINGNON, 2000; OTIENO; SHAH, 2007).

A importância biotecnológica das β -glicosidases, associada à necessidade de utilização de processos industriais menos danosos ao meio ambiente, justificam a prospecção de micro-organismos com potencial para a produção desta enzima em meios de cultivo de baixo valor agregado.

6. 7. Características das β - Glicosidases microbianas

A caracterização física e química da enzima é um passo importante para se estabelecer as condições do processo, pH e temperatura, que resultem máxima atividade e também determina a faixa de pH e temperatura nas quais a enzima se mantém estável. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo, além disso, permite controlar a velocidade do processo variando estes parâmetros no meio reacional (LEITE, 2004).

A especificidade enzimática reside no fato de que cada enzima apresenta um centro ativo formado por resíduos de aminoácidos, o que forma uma cavidade com estrutura definida, onde o substrato, que apresenta forma espacial adequada e grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo, possa se alojar. Vários fatores podem interferir na atividade de uma enzima e devem ser cuidadosamente observados para que se tenha um melhor resultado no processo de atuação da mesma. (MARZZOCO; TORRES, 1999).

O parâmetro mais importante que deve ser considerado na quantificação de uma enzima é a sua atividade (CHAPLIN; BUCKE, 1992). Essa atividade geralmente é medida como uma unidade enzimática (U), unidade internacional, a qual é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto em condições definidas no ensaio como temperatura, pH e concentração de substrato (CHAPLIN; BUCKE, 1992).

7. MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização bioquímica da β – Glicosidase foi realizada no laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul.

7.1 Microrganismo utilizado

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosamente inicialmente denominado “MR-10” e posteriormente identificado como *Lichtheimia ramosa*, isolado de amostras de bagaço de cana e mantido em ágar Sabouraud Dextrose.

7. 2. Preparação do inóculo

O micro-organismo foi cultivado em frascos tipo Erlenmeyer de 250mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextose inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do micro-organismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25mL 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 5mL dessa suspensão.

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

A enzima foi produzida pelo cultivo do microrganismo em frascos tipo Erlenmeyer de 250mL contendo 5g de farelo de trigo umedecidos com solução nutriente (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 micro-organismo os frascos foram mantidos a 28°C por 120 horas.

7. 4. Extração da enzima

Para a extração da enzima foram adicionados 50 mL de água destilada nos meios fermentados e mantidos em agitação de 80 RPM por 1 hora a 28°C. Posteriormente o material foi filtrado para separar o extrato enzimático do meio sólido.

7. 5. Determinação da atividade de β - Glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela adição de 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos a temperatura de 60°C. A reação enzimática 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 (UI).

7. 6. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 60°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão Citrato-Fosfato a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (35 a 70°C), no respectivo pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram Citrato-Fosfato 0,1M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 – 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 – 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em valores de temperatura que variaram de 30 a 70°C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

7. 7. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade da enzima

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de glicose e etanol, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0 - 200mM de glicose e 0 - 30% de etanol). Os ensaios foram realizados a 60°C em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,5.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente estudou-se o efeito do pH e temperatura sobre a atividade catalítica da enzima produzida pelo fungo *L. ramosa*, onde a mesma apresentou uma maior atividade em pH 5,5 e temperatura ótima de 60°C (Gráficos 1 e 2).

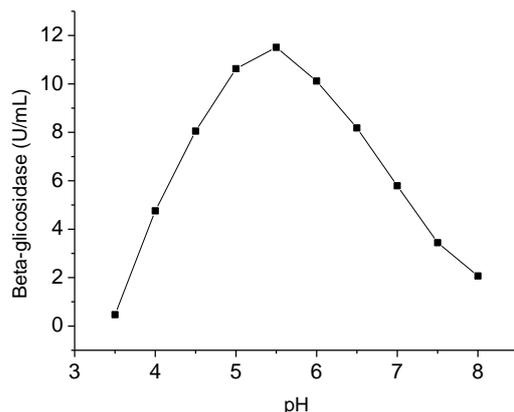


Gráfico 1: Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH.

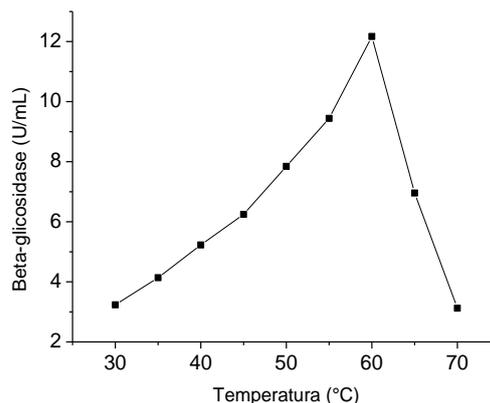


Gráfico 2: Atividade de β -glicosidases em função da variação da temperatura.

A figura 1 mostra maior atividade da enzima em valores de pH ácidos entre 5 e 6, sendo possível observar significativa queda na atividade quando o valor do pH se distancia dos descritos como ótimos, sendo recuperado menos de 50% da atividade máxima em pH 4,0 e 7,0. Surpreendentemente a enzima apresentou maior atividade catalítica em temperaturas superiores a 50°C, fato não corriqueiramente observado em enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos, apesar de trabalhos anteriores relatarem a produção de β -glicosidases extremamente estáveis por linhagens mesofílicas (LEITE et al., 2008).

A maioria das β -glicosidase fúngicas exibem temperaturas ótimas para atividade entre 40°C e 50°C, e valores ótimos de pH entre 4,0 e 6,0 (BHATIA et al., 2002; SARRY; GUNATA, 2004). BELANCIC et al., (2003) encontrou temperatura ótima de 40°C e pH 5,0 para a β -glicosidase de *Debaryomyces vanriijae*. Particularmente, em espécies do Gênero *Aspergillus*, observa-se que as temperaturas ótimas das β -glicosidases variam entre 50°C e 70°C, enquanto que os valores de pH variam de 4,0 a 5,5 (JAGER et al., 2001).

A β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* 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 4 – 10, restando ainda cerca de 70% de atividade em pH 10,5 (Gráfico 3). Quanto a estabilidade térmica, cerca de 90% da atividade catalítica foi recuperada após 1 hora a 55°C (Gráfico 4). Os resultados obtidos ficam mais significativos quando comparados com dados descritos na literatura científica.

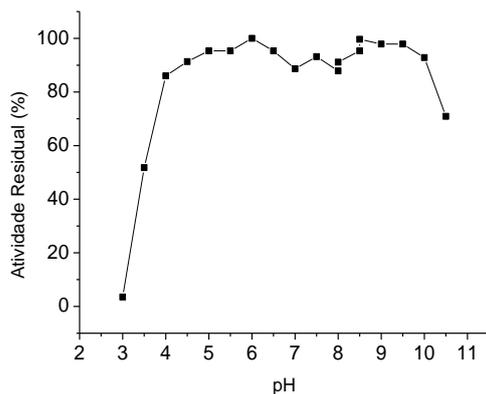


Gráfico 4: Estabilidade enzimática em função do pH após 24h de incubação

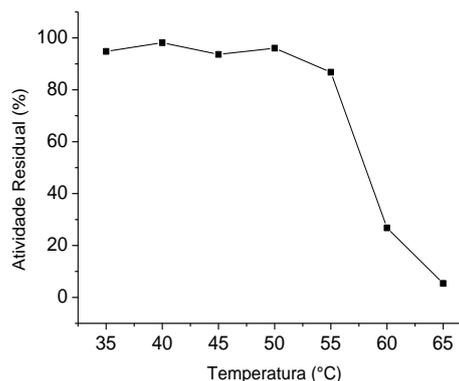


Gráfico 5: Estabilidade enzimática em função da temperatura após 24h de incubação.

A β -glicosidase produzida pelo fungo *Xylaria regales* manteve aproximadamente 78% da atividade após 30 minutos a 50°C (WEI et al., 1996). A enzima produzida pelo fungo *Thichodera harzianum* apresentou estabilidade em temperaturas inferiores a 55°C por 15 minutos, mantendo apenas 36% da atividade inicial após 15 minutos a 60°C (YUN et al, 2001). A literatura descreve que em microrganismos termofílicos há a tendência das enzimas apresentarem estabilidade térmica mais pronunciada. No fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, os autores relatam que a enzima se manteve estável a temperaturas não superiores a 60°C (PERALTA et al., 1997).

A inibição por alcoóis é tópico de interesse no estudo de β -glicosidase, uma vez que estas podem ser expostas a concentrações substanciais durante diversas aplicações comerciais (LO et al., 1990; SUN; CHENG, 2002). O Gráfico 5 apresenta o efeito de diferentes concentrações de etanol (0 – 30%) sobre a atividade enzimática.

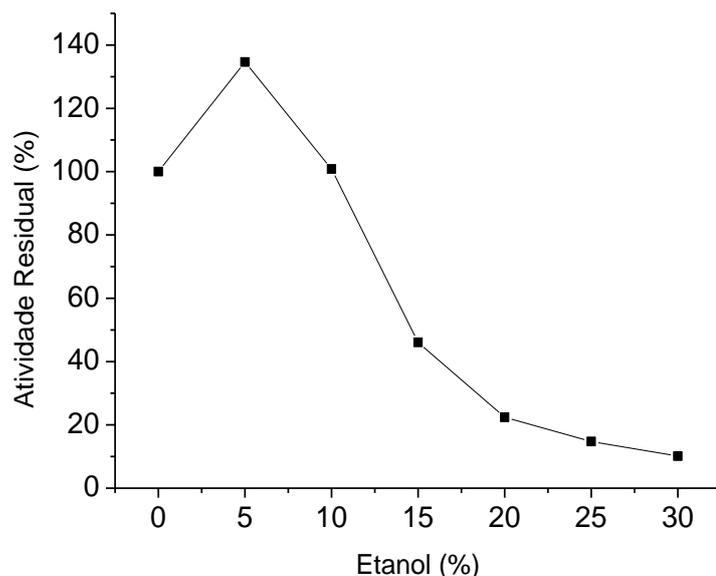


Gráfico 5: Efeito da concentração de etanol sobre a atividade de β -glicosidase.

Concentrações próximas de 5% de etanol estimularam a atividade enzimática em relação ao controle, aumentando em cerca de 35% a atividade inicial da amostra. Quando a concentração foi aumentada para 15% de etanol foi recuperado menos que 50% da atividade inicial. No entanto, com a presença de 10% etanol na mistura de reação a enzima apresentou atividade catalítica idêntica ao controle, isto é, ainda não apresentou perda de sua atividade funcional. Tal característica, favorece o emprego desta enzima em processos fermentativos para a produção de etanol, considerando que a concentração final de etanol dos caldos fermentados obtidos em processos tradicionais giram em torno de 10% (GU et al., 2001).

O aumento do potencial catalítico pelo etanol está associado com a atividade glicosil transferase (VILLENA et al., 2006). O etanol pode aumentar as taxas de reação atuando como aceptores preferenciais dos resíduos glicosil durante a catálise enzimática (BARBAGALLO et al., 2004). A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, diferindo apenas na natureza do acceptor final (ZOROV et al., 2001; BHATIA et al., 2002)

A presença de glicose, conhecido inibidor de β -glicosidases, foi estudada variando a concentrações de glicose de 0 a 200mM. A enzima manteve 46% de sua atividade original em concentração de 100mM de glicose, sendo que com 150mM a atividade da mesma apresentava-se em 30% conforme apresentado no Gráfico 6.

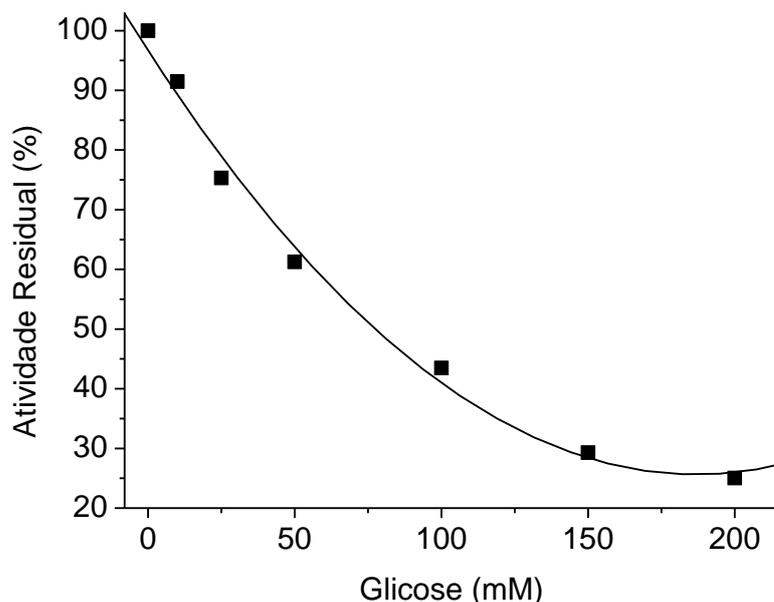


Gráfico 6: Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da β -glicosidase.

A inibição por glicose foi relatada em diversos trabalhos, alguns autores relataram que em concentrações de glicose igual a 5%, a enzima foi fortemente inibida (LEITE et al., 2008). No entanto, quando a concentração do substrato foi elevada para a mesma concentração do inibidor, a inibição da β -glicosidase do *L. ramosa* foi completamente revertida (Tabela1).

Tabela 1: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNP β G) e inibidor.

Enzima	At. Residual (%) pNP β G – 2mM	At. Residual (%)	At. Residual (%)	Tipo de Inibição
		pNP β G – 2mM Glicose-50mM	pNP β G – 50mM Glicose – 50mM	
<i>L. ramosa</i>	100	63,3	108,67	Competitiva

A inibição competitiva pode ser revertida pelo aumento da concentração do substrato, o mesmo não pode ser observado na inibição não competitiva. Na inibição competitiva o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação da enzima (neste caso o sítio ativo), dessa forma, o aumento da concentração de substrato para valores iguais ou superiores aos do inibidor, favorece a ligação enzima ao substrato,

refletindo na reversibilidade da inibição enzimática (CAMPBELL, 2000). Tal característica é apreciável em processos industriais, pois facilita contornar a inibição pelo produto, podendo ser utilizada duas estratégias distintas: adição periódica de substratos para manter a concentração superior aos níveis do inibidor (produto da ação enzimática), ou ainda, remover o produto formado pela ação enzimática (inibidor) para mantê-lo em concentrações inferiores ao do substrato. Nesta última, baseia-se o princípio dos processos de Sacarificação e Fermentação Simultânea onde os monossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática são convertidos em etanol por micro-organismos fermentadores (BON et al., 2008).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enzima caracterizada apresentou maior atividade catalítica nos valores de pH 5,0 e 5,5 a temperatura de 60°C. Quanto a termoestabilidade, a enzima manteve-se estável de 35 a 55°C no período de uma hora de incubação. A atividade enzimática original foi recuperada em ampla faixa de pH 4,0 - 10,5 após 24 horas de incubação. A β -glicosidase foi inibida significativamente em concentrações superiores a 100mM de glicose e 15% de etanol. Os resultados obtidos demonstram que a enzima produzida pelo microrganismo apresenta expressiva estabilidade ao pH e a temperatura. A inibição ocasionada pela glicose pode ser contornada por processos de Sacarificação e Fermentação Simultânea, onde os monossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática são convertidos em etanol por microrganismos fermentadores.

Os presentes resultados demonstram que a β -glicosidase produzida pelo microrganismo *L. ramosa* apresenta características apreciáveis para a aplicação industrial, o que estimula a continuidade do trabalho visionando, em etapas futuras, ensaios pilotos de aplicação desta enzima.

AGRADECIMENTOS

A UFGD pela bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

10. REFERÊNCIAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, 2004.

AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOF, B.J.B. Solid substrate fermentations. **Advance Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.

ARO N.; PAKULA T.; PENTTILA M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Microbiology Reviews** v. 29, p. 719-739, 2005.

BARBAGALLO, R.N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p. 58-66, 2004.

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, Marie-Jose and AGOSIN, Eduardo. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, no. 5, p.1453-1459, 2003.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. Enzimas na Produção de Etanol. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-272, 2008.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre, Artmed, cap. 12, p. 410-439, 2000

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDINGNON, J.R. Activity of β -glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 873 - 878, 2000.

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. **Enzyme technology**. New York: Cambridge University Press, p. 264, 1992.

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. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: Engenharia bioquímica. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 13. p. 247-276, 2001.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios e practicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

GU Y.; QIAO M.; ZHOU Q.; ZHOU Z.; CHEN G. Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium. **Tsinghua Science and Technology**, Tsinghua University, China, v. 6, n. 3, p. 225-230, 2001.

HESSELTINE, C.W. Solid state fermentation – Parte I. **Process Biochemistry**, v.4, p. 24-27, 1977.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solidstate fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175- 186, 2004.

INGRAM, L. O.; DORAN, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v.16, p. 235-241, 1995.

JAGER, S et al. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v.17, p. 455-461, 2001.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KEKOS,D.; 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

KUMAR R, SINGH S, SINGH OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p. 377-391.

LEITE, R.S.R. *Produção, propriedades e purificação de β -glicosidase dos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: comparação das características térmicas das duas enzimas brutas* 2004. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

LEITE, R.S.R. *Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de β -glicosidasas produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados* 2007. **Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

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

LO, A. C.; BARBIER, J. R.; WILLICK, G.E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.192, p. 175-181, 1990.

LYND L. R, WEIMER P. J. VAN ZYL WH, PRETORIUS I. S . Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 66, p.506-77.

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

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

MARZZOCCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TERGERDY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: **The filamentous fungi: Fungal biotechnology**, v. 4. London: Smith Berry; Kristiansen Ed, p. 117-144, 1983.

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.

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.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.

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

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

PERALTA, R.M.; KADOWAKI, M.K.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea*, var *thermoidea*: Purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 146, p. 291-295, 1997.

RAJOKA, M.I.; MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultures in media containing different cellulosic substrates, **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.59, p.21-27, 1997

SANT'ANA JR., G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biociência industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 14. p.351-362, 2001.

SARRY, J. E.; GUNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, Oxford, v.87, p. 509-521, 2004.

SCHURZ, J. Trends in polymer science: A bright future for cellulose. **Journal of Polymer Science** v. 24; p. 481-483, 1999.

SILVA, J. C. GOUVEIA, E. R., Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por streptomyces spp. Em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** v. 2, n. 2; p. 60-70, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.83, p. 1-11, 2002.

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; GUNDLLAPALLI, S.B.; OTERO, R.R.C.; PÉREZ, A.I.B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme Microbial Technology**, v.39, p. 229-234, 2006.

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.

WEI, D.L.; KIRIMURA, K.; USAMI, S.; LIN, T.H. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood grown fungus *Xylaria regalis*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 297-301, 1996.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 491-499, 2005.

WEN,Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p. 31-39, 2004.

Yang, X.; Chen, H.; Gao, H.; Zuohu, L. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Oxford, v.78, p. 277-280, 2001.

YUN, S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H. S. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type c-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 2028-2032, 2001.

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

ZHANG YHP, HIMMEL ME, MIELENZ JR. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Journal of Biotechnology** - Elsevier, v. 24; p. 452-481, 2006

ZHANG YHP, HIMMELME, MIELENZ JR. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Journal of Biotechnology**, v.24 p. 452-481, 2006.

ZOROV, I. N.; GUSAKOV, A. V.; BARAZNENOK, V. A.; BEKKAREVICH, A. O.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P.; KONDRAT'EVA, E. G. Isolation an properties of cellobiase from *Penicillium verruculosum*. Applied **Biochemistry and Microbiology**, New York, v.37, p. 587-592, 2001.