

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Enrico Dinucci dos Santos

Isadora Batista Nunes

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE β -
GLICOSIDASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.**

DOURADOS - MS

2024

ENRICO DINUCCI DOS SANTOS

ISADORA BATISTA NUNES

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE β -
GLICOSIDASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

DOURADOS - MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N972b Nunes, Isadora Batista

Bioprospecção de Fungos Filamentosos para Produção de b-Glicosidase por Cultivo em Estado Sólido [recurso eletrônico] / Isadora Batista Nunes, Enrico Dinucci dos Santos. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. b-glicosidase. 2. Fungos filamentosos. 3. Cultivo em estado sólido. I. Santos, Enrico Dinucci dos. II. Leite, Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro. III. Título.

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

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

ENRICO DINUCCI DOS SANTOS
ISADORA BATISTA NUNES

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE β -
GLICOSIDASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Aprovado em: 04/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE**
Data: 07/11/2024 15:30:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO FOSSA DA PAZ**
Data: 07/11/2024 18:02:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ HENRIQUE BOVI DE QUADROS**
Data: 07/11/2024 15:44:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luiz Henrique Bovi de Quadros
Mestrando do PPGCTA/UFGD

DOURADOS - MS

2024

RESUMO

A parede celular vegetal, composta por celulose, hemicelulose e lignina, é fundamental para a estrutura das plantas. As enzimas celulolíticas, especialmente a β -glicosidase, desempenham um papel crucial na degradação de polímeros lignocelulósicos, sendo utilizadas na produção de biocombustíveis. Este trabalho visou isolar e selecionar fungos filamentosos de ambientes naturais similares em localidades distintas para produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato. Doze isolados foram obtidos, e suas capacidades de produção de β -glicosidase foram avaliadas. Os isolados 2, 6, 9 e 12 demonstraram maior produção enzimática, sendo o isolado 9 o mais eficiente com 36,75 U/g de substrato seco. Embora os resultados obtidos sejam inferiores aos descritos na literatura, eles superaram a produção de algumas espécies previamente estudadas, indicando o potencial desses isolados para futuros estudos de otimização e identificação taxonômica. O trabalho sugere que a continuação das pesquisas pode resultar em maiores rendimentos enzimáticos e na exploração de outras enzimas de interesse industrial.

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

ABSTRACT

The plant cell wall, composed of cellulose, hemicellulose and lignin is fundamental to the structure of plants. Cellulolytic enzymes, especially β -glucosidase are a crucial part in the degradation of lignocellulosic polymers, being used in the production of biofuels. This work aimed to isolate and select filamentous fungi from similar natural environments in different locations for the production of β -glucosidase in solid state cultivation using wheat bran as substrate. Twelve isolates were obtained and their β -glucosidase production capabilities were evaluated. Isolates 2, 6, 9 and 12 demonstrated greater enzyme production, with isolate 9 being the most efficient with 36.75 U/g of dry substrate. Although the results obtained are lower than those described in the literature, they overcame the production of some previously studied species, indicating the potential of these isolates for future optimization and taxonomic identification studies. The report suggests that continued research could result in greater enzymatic yields and the exploration of other enzymes of industrial interest.

Keywords: Solid state cultivation; Filamentous fungi; β -glucosidase.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1. Isolamento.....	10
2.2. Produção do inóculo.....	10
2.3. Cultivo em estado sólido para produção de β -glicosidase	11
2.4. Extração da enzima.....	11
2.5. Determinação da atividade de β -glicosidase.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
5. REFERENCIAL TEÓRICO	16

1. INTRODUÇÃO

A parede celular é uma estrutura externa à célula vegetal que proporciona forma, barreira defensiva, resistência à pressão de turgescência interna, mediação de interações intracelulares, controle da taxa de crescimento e armazenamento de carboidratos estruturais complexos (COSTA, 2019). Os polímeros celulose, hemicelulose e lignina são os principais constituintes da sua estrutura, ademais, em menor proporção, também há pectinas, proteínas e ácidos hidroxicinâmicos (COSTA, 2019).

A celulose é um polímero linear de glicose formado por ligações glicosídicas β 1,4. O número de unidades de glicose que compõem o polímero varia de 15 a 15.000, sendo em média composto por 3.000 unidades. A molécula de celulose é insolúvel em água e corresponde ao principal componente da parede celular vegetal (CASTRO, 2009).

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados na produção industrial de celulase devido à sua capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares que degradam lignocelulose, além da facilidade de extração dessas enzimas. Para reduzir o custo de produção dessas enzimas, é essencial otimizar a eficiência e o processo de cultivo, utilizando meios de cultura mais baratos e ajustando parâmetros como pH, temperatura e oxigênio dissolvido. Diferentes espécies de fungos filamentosos apresentam variações nas composições e características enzimáticas, o que influencia a produção e a eficiência de hidrólise da celulase (ZHANG Z et al., 2024).

As enzimas celulolíticas são hidrolases responsáveis pela cisão das ligações glicosídicas da celulose. A classificação das celulasas advém do local em que atuam no substrato celulósico, assim, dividindo-se em: endoglucanases, as quais quebram as ligações internas da fibra celulósica, exoglucanases, as quais clivam regiões externas da celulose e β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (SINGH et al., 2021). Dentre as utilizações dessas enzimas industriais, destaca-se a bioconversão de biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis para produção de biocombustíveis (SRIVASTAVA et al., 2018).

As β -glicosidases são frequentemente visadas devido à sua aplicação biotecnológica. Os usos potenciais incluem liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante (isoflavonas abundantes na soja) e compostos aromáticos em vinhos, cervejas e sucos (DAROIT, 2007). Ademais, também são utilizadas

para hidrolisar a celobiose, assim, obtendo a glicose, monossacarídeo desejável para produção de etanol celulósico (AHMED et al., 2017; FUSCO et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019).

A bioprospecção é definida como a avaliação proposital de material biológico selvagem em busca de novos produtos valiosos, sendo uma atividade central no desenvolvimento humano. Em sua forma moderna, a bioprospecção envolve a aplicação de tecnologias avançadas, como a biotecnologia e a biologia molecular, para desenvolver novos produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, aromatizantes, fragrâncias, enzimas industriais e outros produtos derivados da biodiversidade. Esse processo não apenas promove a descoberta de compostos bioativos inovadores, mas também tem um papel importante na conservação de ecossistemas, ao valorizar economicamente a biodiversidade de maneira sustentável (ARTUSO A et al., 2024)

A exploração comercial de enzimas industriais enfrenta algumas dificuldades como, por exemplo, baixa estabilidade estrutural, inibição pelo produto formado e o alto custo de produção (GONÇALVES et al., 2013). Dessa forma, o cultivo em estado sólido (CES) é uma alternativa para a redução do custo de produção desses biocatalisadores, dado à utilização de resíduos agroindustriais como substrato (SIMÕES, 2021). Os microrganismos mais utilizados em CES correspondem aos fungos e bactérias, sendo os fungos filamentosos os mais adaptados (AFONSO, 2012).

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato para cultivo em estado sólido apresenta-se como uma alternativa promissora para a redução dos custos na produção de enzimas, além de contribuir para a mitigação de impactos ambientais decorrentes das atividades agroindustriais (SINGHANIA et al., 2009). Esse cenário favorece a busca por linhagens microbianas capazes de produzir enzimas de forma eficiente em processos de fermentação de baixo custo (ALVES-PRADO et al., 2010). A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas pode tornar-se economicamente viável em larga escala, considerando que um dos principais desafios na aplicação de enzimas em processos industriais é o elevado custo dos meios de cultura microbianos, que pode representar de 30 a 40% do total de produção da enzima (ROMERO et al., 2007; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2010).

Destarte, o objetivo do presente trabalho consiste no isolamento e seleção de fungos filamentosos a partir de ambientes naturais similares em localidades distintas, visando a produção da enzima β -glicosidase por cultivo em estado sólido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolamento

Para este trabalho, foram coletadas amostras de solo na profundidade de 3 a 5 cm em três diferentes localidades, sendo elas: Juína - MT (11°41'13.2"S - 59°11'08.3"W) nas margens do rio 21, Vilhena - RO (12°47'57.8"S - 60°08'34.4"W) nas margens do rio Canelinha e em Ladário - MS (19°01'03"S - 57°33'13"W) nas margens do rio Paraguai.

O processo de isolamento dos microrganismos deu-se pelo método de diluição seriada, contendo dez tubos de ensaio com solução salina a 0,9%, onde foram utilizadas 5 g de cada amostra de solo para a criação da solução estoque. Em triplicata, alíquotas de 100 μ L referentes às diluições de 10^{-5} e 10^{-7} foram distribuídas em placas de petri contendo meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (Kasvi), sendo posteriormente incubados a 28 e 45°C até o crescimento de pequenas pontuações.

Após o crescimento, os isolados de cada uma das placas foram repicados até seu crescimento micelial não apresentar contaminação com outros fungos de morfologias distintas. Em seguida, os fungos isolados foram repicados para 2 tubos de ensaio com meio Ágar Sabouraud Dextrose e cobertos com óleo mineral, sendo armazenados no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER/UFGD).

2.2. Produção do inóculo

Para a produção do inóculo, os fungos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Ágar Sabouraud Dextrose, mantido por 96 horas a 28°C. A suspensão dos fungos foi obtida raspando suavemente a superfície do meio de cultura com 30 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônio). A inoculação dos fungos no substrato (farelo de trigo) foi realizada pela transferência de 5 mL dessa suspensão (COSTA et al., 2019).

2.3. Cultivo em estado sólido para produção de β -glicosidase

O substrato utilizado para a produção da enzima foi farelo de trigo, sendo previamente lavado com água destilada e posteriormente seco a 50°C por 48 horas. O substrato (5g) foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos com 4,5 mL de solução nutritiva (descrita anteriormente), seguindo para esterilização em autoclave (20 min, 121°C, 1 atm). Os substratos foram inoculados com 5 mL da suspensão microbiana, resultando em umidade inicial de 65% e foram mantidos a 28°C por 96 horas (COSTA et al., 2019).

2.4. Extração da enzima

Para obtenção dos extratos enzimáticos, 50 mL de água destilada foram adicionados aos frascos Erlenmeyer contendo o resíduo miceliado. O conteúdo foi então macerado com um bastão de vidro por 10 minutos. Após a maceração, os frascos foram agitados a 150 rpm por 1 hora. As amostras foram filtradas usando tecido de náilon e centrifugadas a 1500 $\times$ g por 10 min. O sobrenadante resultante foi considerado extrato enzimático e empregado nos ensaios subsequentes (COSTA et al., 2019).

2.5. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com o substrato sintético p-NP- β -D-glucopiranosídeo (PNPG) 4 mM (Sigma-Aldrich) (PEREIRA et al., 2015). O conjunto reacional foi composto por 50 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e 250 μ L de PNPG. A reação foi incubada em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL de carbonato de sódio (2 M) e o produto formado foi quantificado em um espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação (DE PALMA-FERNANDEZ et al., 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho isolou 12 fungos filamentosos, sendo 3 provenientes da região de Ladário - MS, 1 da região central de Dourados - MS, 6 de Juína - MT e 2 de Vilhena - RO. No isolamento, as amostras foram adicionadas em incubadoras BOD's a

temperatura de 28 e 45°C, no entanto, os microrganismos se desenvolveram somente a 28°C (Tabela 1).

Tabela 1 - Local de coleta e temperatura de crescimento dos fungos isolados.

Nome Referencial	Local de Coleta	Temperatura de Crescimento
Isolado 1	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 2	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 3	Margens do rio Paraguai (19°01'16"S 57°30'03"W)	28°C
Isolado 4	Margens do rio Canelinha (12°47'57.8"S 60°08'34.4"W)	28°C
Isolado 5	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 6	Margens do rio Paraguai (19°01'03"S 57°33'13"W)	28°C
Isolado 7	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 8	Centro de Dourados (22°13'38.1"S 54°48'43.0"W)	28°C
Isolado 9	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 10	Margens do rio Canelinha (12°47'57.8"S 60°08'34.4"W)	28°C
Isolado 11	Margens do rio 21 (11°41'13.2"S 59°11'08.3"W)	28°C
Isolado 12	Margens do rio Paraguai (19°01'08"S 57°34'23"W)	28°C

Organismos termófilos podem ser divididos em moderados e extremos, esses microrganismos apresentam faixa de crescimento ótimas entre temperaturas de 40 e 50°C e 65 a 85°C, respectivamente. A adaptação à termofilia está relacionada principalmente à membrana citoplasmática. A membrana de termófilos apresenta ácidos graxos saturados, os quais conferem equilíbrio entre densidade e fluidez, para a manutenção da integridade física e funcional em temperaturas elevadas. Contudo, a maior parte das espécies fúngicas cultiváveis cresce em temperaturas mesófilas, em uma faixa estreita de temperatura, entre 20 a 40°C (GOMES et. al., 2007). Fato esse que justifica os resultados apresentados na tabela 01, pois a maioria das linhagens fúngicas descritas na literatura cresce na faixa entre 20 a 40°C.

Dentre os microrganismos isolados, os isolados 2, 6, 9 e 12 apresentaram a maior produção de β -glicosidase, destacando-se o isolado 9 com 36,75 U/g para os parâmetros testados na condição de cultivo (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido em farelo de trigo contendo 65% de umidade por 96h a 28°C.

Nome Referencial	β -glicosidase (U/ml)	β -glicosidase (U/g de substrato seco)
Isolado 1	0,44	4,45
Isolado 2	2,66	26,65
Isolado 3	0,13	1,33
Isolado 4	0,60	6,02
Isolado 5	0,46	4,64
Isolado 6	2,62	26,21
Isolado 7	0,06	0,61
Isolado 8	1,51	15,10
Isolado 9	3,67	36,75
Isolado 10	0,59	5,90
Isolado 11	0,53	5,33
Isolado 12	2,53	25,38

Os resultados obtidos inicialmente não foram muito expressivos comparados com a literatura (Tabela 3), no entanto, alterações nos parâmetros de cultivo como, por exemplo, umidade inicial do substrato, temperatura e tempo de cultivo podem aumentar consideravelmente a produção enzimática (GONÇALVES et al., 2013). Trabalhos anteriores relataram ganhos significativos na produção de β -glicosidase após a otimização dos parâmetros de cultivo (GARCIA et al., 2015; SANTOS et al., 2016; GARBIN et al., 2021).

Tabela 3 - Produção de β -glicosidases por cultivo em estado sólido de diferentes espécies fúngicas

Microrganismo	Substrato utilizado	β-glicosidase (U/g de substrato seco)	Nome autor
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	58,0	LEITE et al.,2008
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Farelo de trigo	10	LEITE et al.,2008
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de arroz	319,1	ALIYAH, et al.,2017
<i>Aspergillus sp. DHE7</i>	Farelo de jojoba	174,6	GHONEMY, 2021
<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de arroz	122,8	NG et al.,2010
<i>Thermoascus crustaceus</i>	Farelo de trigo	410,9	GARBIN et al.,2021
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Farelo de trigo	11,6	MORAIS et al.,2018
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	Farelo de trigo	51	MORAIS et al.,2018
<i>Gongronella butleri</i>	Farelo de trigo	213,6	SANTOS et al.,2016
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	162,2	GARCIA et al., 2015
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Farelo de trigo com bagaço de cana	170	BONFÁ et al.,2018

Apesar dos resultados obtidos ser inferior aos descritos na literatura, de forma majoritária, as produções dos isolados 2, 6, 9 e 12 foram superiores aos dos fungos *Aureobasidium pullulans* e *Lichtheimia corymbifera*, descritos respectivamente por Leite et al. (2008) e Moraes et al. (2018). Assim, estimulando a continuidade do trabalho na identificação taxonômica dos microrganismos isolados e na otimização dos parâmetros de cultivo para a produção de β -glicosidase.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos com o presente escopo permitem a descrição de novas fontes fúngicas para a produção de enzimas de interesse industrial e consequentemente a descrição de novos biocatalisadores. A continuidade do trabalho pode apresentar resultados ainda mais interessantes se outras enzimas forem avaliadas como, por exemplo, pectinases, xilanases, amilases e celulasas, considerando que o presente trabalho avaliou a produção de apenas uma enzima (β -glicosidase).

5. REFERENCIAL TEÓRICO

AFONSO, L. C. **Produção de Celulases por Cultivo em Estado Sólido e Aplicação na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. São Paulo, 2012. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-20122012-172140/publico/Dissertacao_LARISSAAFONSO.pdf. Acesso em: 04 maio 2024.

AHMED, A.; NASIM, F.; BATOOL, K.; BIBI, A. 2017. **Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications**. J. Appl. Environ. Microbiol. 5: 31–46.

ALIYAH, A.; ALAMSYAH, G.; RAMADHANI, R.; HERMANSYAH, H. (2017). **Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob**. Energy Procedia, v. 136, P. 418-423.

ALVES-PRADO HF; PAVEZZI FC; LEITE RSR; OLIVEIRA VM; SETTE LD; DA-SILVA R (2010). **Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado**. Appl. Biochem. Biotechnol. 161(1-8): 333-346

ARTUSO, A. (2002). **Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building**, World Development, Volume 30, Issue 8.

BONFÁ, E. C.; MORETTI, M. M. de S.; GOMES, E.; RODRIGUEZ, G. O. B. (2018). **Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 13, 311–318. doi:10.1016/j.bcab.2018.01.008

CASTRO, H. F. **Papel e Celulose**. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena (EEL). 2009. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/apostila4papelecelulose.pdf>. Acesso em: 04 maio 2024.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; QUEIROZ, E.R.V.; GANDRA, J.R.; BUSCHINELLI, R.H.D.T. PAZ, M.F.; LEITE, R.S.R. **Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 19, p. 101161, 2019.

COSTA, R. 2019. **Parede Celular Vegetal**. Rev. Ciência Elem., V7(01):006. doi.org/10.24927/rce2019.006.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma Beta-Glicosidase de *Monascus purpureus***. Porto Alegre, 2007.

DE PALMA-FERNANDEZ, E.R.; GOMES, E.; DA SILVA R. **Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus**

Thermoascus aurantiacus. Folia Microbiol (Praha). v. 47, n. 6, p. 685-690. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02818672>.

FUSCO, F. A.; FIORENTINO, G.; PEDONE, E.; CONTURSI, P.; BARTOLUCCI, S.; LIMAURO, D. 2018. **Biochemical Characterization of a Novel Thermostable β -glucosidase from Dictyoglomus Turgidum**. Int. J. Biol. Macromol. 113: 783–791.

GARBIN, A.P.; GARCIA, N.F.L.; CAVALHEIRO, G.F.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. 2021. **β -Glucosidase from Thermophilic Fungus Thermoascus crustaceus: Production and Industrial Potential**. An Acad Bras Cienc 93: e20191349. DOI 10.1590/0001-3765202120191349.

GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R. da S.; GONÇALVES, F.A.; PAZ, M.F da; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. 2015. **Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by Lichtheimia ramosa in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract**. Electronic Journal of Biotechnology 314–319.

GHONEMY, D. H. E. (2021). **Optimization of extracellular ethanol-tolerant β -glucosidase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 via solid state fermentation using jojoba meal as substrate: purification and biochemical characterization for biofuel preparation**. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, V. 19, Issue 1, 45.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. da. 2007. **Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto – SP, Brasil.

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

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

MORAIS, T. P. ; BARBOSA, P. M. G. ; GARCIA, N.F.L. ; ROSA-GARZON, N. G. ; FONSECA, G. G. ; PAZ, M. F. ; CABRAL, H. ; LEITE, R. S. R. . **Catalytic and thermodynamic properties of β -glucosidases produced by Lichtheimia corymbifera and Byssoschlamys spectabilis**. PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY, p. 1-10, 2018.

NG, I-S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. D. (2010). **High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran.** Bioresource Technology, v. 101, Issue 4, p. 1310-1317.

PEREIRA, J.C.; MARQUES, N.P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T.B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; MARTINS, D.A.B. **Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification.** Journal of applied microbiology, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

ROMERO E, BAUTISTA J, GARCIA-MARTINEZ AM, CREMADES O, PARRADO J (2007). **Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones.** Process Biochem. 42(11):1492-1497.

SANTOS, F.R. da S.; GARCIA, N.F.L.; PAZ, M.F. da; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. 2016. **Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation.** African Journal of Biotechnology, DOI: 10.5897/AJB2015.15025.

SIMÕES, A. L. de C. C. **Produção de Amilases por Cultivo em Estado Sólido e Hidrólise Enzimática de Resíduos de Mandioca.** João Pessoa, 2021.

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. **An Overview on the Recent Developments in Fungal Cellulase Production and their Industrial Applications.** Bioresource Technology Reports, v. 14, p. 100652, 2021.

SINGHANIA RR; PATEL AK; SOCCOL CR; PANDEY A (2009). **Recent Advances in Solid-State Fermentation.** Biochem. Eng. J. 44(1):13- 18.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; COUTO, S. R.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. 2018. **Applications of Fungal Cellulases in Biofuel Production: Advances and limitations.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 82, n. June 2016, p. 2379–2386.

SRIVASTAVA, N.; RATHOUR, R.; JHA, S.; PANDEY, K.; SRIVASTAVA, M.; THAKUR, V. K.; SENGAR, R. S.; GUPTA, V. K.; MAZUMDER, P. B.; KHAN, A. F.; MISHRA, P. K. 2019. **Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application.** Biomolecules 9: 220.

ZHANG Z; XING J; LI X; LU X, LIU G; QU Y, ZHAO J. **Review of research progress on the production of cellulase from filamentous fungi,** International Journal of Biological Macromolecules, Volume 277, Part 4, 2024,