

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

SUSAN MICHELZ BEITEL

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE  $\beta$ -GLICOSIDASES POR  
*Penicillium miczynskii*

Guarapuava

2012

SUSAN MICHELZ BEITEL

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE  $\beta$ -GLICOSIDASES POR  
*Penicillium miczynskii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. (Adriana Knob).

Co-orientador: Prof. Dr. (Paulo Roberto Da Silva).

Guarapuava

2012

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Adriana Knob, além de orientadora profissional também orientadora na vida diária, incentivadora, e, sobretudo amiga, agradeço a dedicação e conhecimentos a mim transmitidos.

Ao Dr. Paulo Roberto Silva pelo auxílio e atenção.

A todos os colegas de laboratório que fizeram parte do meu dia-a-dia, Simone, Mariana, Diana e Alison, agradeço o companheirismo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

## Resumo

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas essenciais na hidrólise eficiente da celulose, capazes de hidrolisar celobiose e pequenos oligossacarídeos em glicose. Esta enzima tem sido amplamente utilizada em vários setores biotecnológicos, como na produção de bioetanol, em processos vinícolas para liberação de aromas, assim como na indústria de sucos. Neste trabalho, o efeito de diversos parâmetros físico-químicos sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases extracelulares pelo fungo *Penicillium miczynskii* foi investigado, a fim de elevar os níveis de enzimas produzidos. Para tanto, o potencial de diversos resíduos agroindustriais em induzir a síntese e liberação destas enzimas foi avaliado. Outras condições de cultivo como a concentração da fonte de carbono previamente selecionada, cinética de produção enzimática em cultivo estacionário e agitado, pH e temperatura foram avaliadas. As  $\beta$ -glicosidases produzidas foram caracterizadas bioquimicamente, avaliando-se sua termoestabilidade e estabilidade frente ao pH, temperatura e pH ótimos de atuação, bem como o efeito de diferentes substâncias sobre sua atividade. A casca de abacaxi foi o resíduo agroindustrial que induziu maior produção de  $\beta$ -glicosidases, na concentração de 3%, sob cultivo estacionário, por nove dias, a 20 °C, em pH 5,5 (2,82 U/mL). As  $\beta$ -glicosidases apresentaram-se mais ativas a 65 °C, em pH 4,5-5,0, mantendo-se estáveis à 55 °C e 60 °C. O íon  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$  foram capazes de ativar a atividade  $\beta$ -glicosidásica, assim como o agente redutor  $\beta$ - mercaptoetanol. Outras substâncias como SDS,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ , citrato de sódio,  $\text{NH}^{+4}$  e  $\text{Ba}^{+2}$  foram capazes de inibir a enzima. Este trabalho revela o potencial do fungo *P. miczynskii* em se desenvolver e produzir elevados níveis de  $\beta$ -glucosidase em um resíduo agroindustrial disponível em larga escala e de baixo custo. As enzimas produzidas, por serem termoestáveis, ativas em altas temperaturas e estáveis em ampla variedade de pH mostram-se interessantes para determinadas aplicações industriais, como a produção de bioetanol, indústrias de sucos e de vinhos.

**Palavras-chave:** celulases, fungos filamentosos, resíduos lignocelulósicos, propriedades bioquímicas.

## Abstract

$\beta$ -Glucosidases have a great potential to be used in various biotechnological processes, such as in food and feed industries, biomass hydrolysis for bioethanol production and its use to enhance the flavor of wine, tea and fruit juice. This work describes the  $\beta$ -glucosidase production by *Penicillium miczynskii*. The effect of pH, time and condition of cultivation, temperature, different carbon sources and concentration of the selected agro industrial waste on extracellular  $\beta$ -glucosidase production was studied in submerged fermentation. Additionally, the enzyme produced was biochemically characterized. The best conditions for *P. miczynskii*  $\beta$ -glucosidase production were 3% pineapple peel as carbon source, under stationary condition, for 9 days, pH 5.5 and temperature of 20 °C, achieving to 2,82 U/mL. The enzyme showed best activity on pH 4.5-5.0, at 65 °C. It was stable at 55 °C and 60 °C, with a half-life of 50 and 40 min, respectively. The  $\beta$ -glucosidase was slight activated in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol and  $\text{Ca}^{2+}$  and strongly inhibited by SDS,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ . Also, sodium citrate,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  were able to inhibit this enzyme, especially at 10 mM concentration. The article provides a novel  $\beta$ -glucosidase which presents favorable industrial properties, such as its production in pineapple waste, an inexpensive and abundant agro-industrial residue, and high hydrolysis activity at elevated temperatures.

**Key-words:** cellulases, filamentous fungi, lignocellulosic wastes, biochemical properties.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Representação esquemática dos mecanismos de ação de diferentes celulasas sobre a molécula de celulose .....18

**Figura 2.** Disposição dos polissacarídeos constituintes principais da parede celular .....27

**Figura 3.** Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal para a formação de microfibrilas de celulose e sua organização .....29

**Figura 4.** Representação de um conidióforo encontrado em espécies de *Penicillium* .....35

**Figura 5.** Morfologia das colônias, conidióforos e conídios do *Penicillium miczynskii* .....36

### *Capítulo I*

**Figure 1.** Time-course of  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* in stationary and shaking condition .....58

**Figure 2.** Effect of initial pH and temperature on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* .....59

**Figure 3.** Influence of temperature and pH on  $\beta$ -glucosidase activity from *P. miczynskii* .....60

**Figure 4.** Thermal (a) and pH (b) stability of  $\beta$ -glucosidase activity from *P. miczynskii* .....61

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Características bioquímicas de algumas  $\beta$ -glicosidasas fúngicas .....23

### *Capítulo I*

**Table 1.** Influence of agro-industrial wastes on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* .....55

**Table 2.** Effect of pineapple peel concentration on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* .....56

**Table 3:** Effect of different substances on relative activity of  $\beta$ -glucosidase from *P. miczynskii* .....57

## LISTA DE SIGLAS

**β:** Beta

**°C:** graus Celsius

**DP** - grau de polimerização

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**FES:** Fermentação em estado sólido

**FSM:** Fermentação submersa

**g:** grama

**M:** molar

**mg:** miligrama

**mg/mL:** miligramas por mililitros

**min:** minutos

**mL:** mililitros

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**rpm** – rotações por minuto

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**T ½** - meia vida

**U:** Unidade enzimática

**U/mL:** Unidades por mililitros

**v/m:** volume por massa

**μL:** microlitro

**μmol:** micro mol

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 GERAL: .....	12
2.2 ESPECÍFICOS:.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS .....	13
3.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	14
3.3 CELULASES .....	17
3.4 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS $\beta$ -GLICOSIDASES FÚNGICAS .....	21
3.5 PRINCIPAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS $\beta$ -GLICOSIDASES.....	25
3.6 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO .....	27
3.7 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	30
3.8 O RESÍDUO AGROINDUSTRIAL CASCA DE ABACAXI .....	31
3.9 O GÊNERO <i>Penicillium</i> E A ESPÉCIE <i>P. miczysnkii</i> .....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5. RESULTADOS .....	38
CAPÍTULO I .....	39
1. INTRODUCTION .....	42
2. MATERIAL AND METHODS.....	43
2.1 FUNGAL STRAINS AND CULTURE CONDITIONS .....	43
2.2 ENZYME AND PROTEIN ASSAY.....	43
2.3 CULTURE CONDITIONS FOR $\beta$ -GLUCOSIDASE PRODUCTION .....	43
2.3.1 ENZYME PRODUCTION ON DIFFERENT AGRO-INDUSTRIAL WASTES.....	44
2.3.2 EFFECT OF CULTURE CONDITIONS, INITIAL PH AND TEMPERATURE ON $\beta$ -GLUCOSIDASE PRODUCTION.....	44
2.4 ENZYME CHARACTERIZATION .....	44
2.4.1 OPTIMUM PH AND TEMPERATURE $\beta$ -GLUCOSIDASE ACTIVITY.....	44
2.4.2 $\beta$ -GLUCOSIDASE STABILITY AT DIFFERENT TEMPERATURE AND PH .....	44
2.4.3 EFFECT OF METALS AND SUBSTANCES .....	45

<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 INFLUENCE OF THE CARBON SOURCE ON <math>\beta</math>-GLUCOSIDASE PRODUCTION AND ITS CONCENTRATION .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON <math>\beta</math>-GLUCOSIDASE PRODUCTION.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 BIOCHEMICAL PROPERTIES OF <i>P. miczynskii</i> <math>\beta</math>-GLUCOSIDASE.....</b>	<b>47</b>
<b>4. CONCLUDING REMARKS .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURE CAPTIONS .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>

## ***1. Introdução***

Atualmente, as celulases tem sido alvo de ampla investigação, devido ao seu vasto campo de aplicação biotecnológica, incluindo as indústrias têxtil, alimentícia, de papel e celulose, ração animal, farmacêutica, produção de biocombustíveis, entre outras.

A  $\beta$ -glicosidase está inserida no grupo das celulases, que agem de forma sinérgica para a completa degradação da celulose. A atuação da  $\beta$ -glicosidase é essencial para a última etapa desta degradação, onde o açúcar de interesse (glicose) é liberado a partir de celobiose e pequenos oligossacarídeos, tornando esta enzima aplicável em vários processos biotecnológicos (HEIDEMANN et al., 2008). Dentre estas aplicações, destacam-se os setores vinícolas e de produção de sucos para liberação de aromas, de ração animal para melhor aproveitamento das substâncias constituintes, assim como os de síntese de polissacarídeos e de glicoconjugados, por meio de sua atividade de transglicosilação (DAROIT, 2007). Ademais, a aplicação destas enzimas utilizadas na conversão de matérias primas para a produção de bioetanol mostra-se bastante promissora e relevante para a economia sustentável.

Hoje em dia, inúmeras enzimas comerciais estão disponíveis no mercado. No entanto, a principal limitação de sua aplicação é seu custo elevado. Por esta razão, investigações a cerca de micro-organismos que produzam eficientemente enzimas, com características bioquímicas mais interessantes para determinadas aplicações industriais, são de interesse biotecnológico. Dentro deste contexto, se faz necessário o entendimento do comportamento e das necessidades fisiológicas destes micro-organismos mediante os processos de produção, visando desenvolver técnicas que promovam o aumento da produtividade enzimática.

A produção de várias enzimas por fungos filamentosos tem sido relatada, os quais apresentam diversas vantagens neste processo, como sua plasticidade quanto às condições de cultivo, secreção de enzimas diretamente no meio de cultura, produção em níveis elevados quando comparados aos produzidos por bactérias, entre outras. Nesse sentido, esforços tem sido dirigidos no intuito de descobrir novas linhagens microbianas, que sejam eficientes em produzir níveis enzimáticos elevados, empregando-se substratos alternativos e de baixo custo.

Nos últimos anos, tem-se verificado uma maior demanda por produtos advindos de diversos setores industriais, que assumam o compromisso em preservar o meio ambiente. Dentro deste contexto, cabe a investigação a cerca de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas microbianas, visto que sua utilização além de agregar valor a estes materiais e diminuir sua deposição na natureza, pode contribuir, substancialmente, para reduzir seus

custos de produção (ROSA et al., 2011). Diante da expressiva aplicabilidade industrial das  $\beta$ -glicosidases e da necessidade de se desenvolver processos de produção economicamente mais competitivos, este estudo teve como objetivo estabelecer as melhores condições físico-químicas para a produção de  $\beta$ -glicosidases pelo fungo *Penicillium miczynskii*, bem como caracterizar bioquimicamente estas enzimas.

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral:

Determinar a influência de fatores físico-químicos sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases pelo fungo *Penicillium miczynskii* e caracterizar bioquimicamente as  $\beta$ -glicosidases produzidas.

### 2.2 Específicos:

1. Verificar a influência de diferentes fontes de carbono lignocelulósicas de baixo custo sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases, assim como a concentração da fonte selecionada;
2. Avaliar a cinética de produção das  $\beta$ -glicosidases em cultivo estacionário e agitado;
3. Avaliar a influências do pH e da temperatura de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases;
4. Determinar o pH e a temperatura ótimos da atividade;
5. Verificar a estabilidade das  $\beta$ -glicosidases frente à temperatura e ao pH;
6. Avaliar o efeito de íons metálicos e de outras substâncias sobre a atividade das enzimas produzidas.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Produção de enzimas microbianas

Enzimas são proteínas altamente especializadas com funções catalíticas, sendo responsáveis por muitas reações bioquímicas essenciais nos micro-organismos, plantas, animais e seres humanos (ENZYME TECHNICAL ASSOCIATION, 2001).

De acordo com Harger et al., (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e micro-organismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicoseisomerases), de origem fúngica ou bacteriana.

As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo as vantagens de conversões enzimáticas relevantes nos processos industriais (COLEN, 2006). A produção de enzimas para uso industrial teve sua origem na Dinamarca e Japão no final do século XIX, quando se produziram as primeiras preparações de renina, a partir de estômago de bezerros e de amilase, de origem fúngica (CARRERA, 2003).

A utilização das enzimas nos diversos setores industriais tem sido justificada por vários fatores. De acordo com Leathers (2003), o processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se obter rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente.

Os micro-organismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (MEYERS, 1996). Como parte do ciclo do carbono, os principais constituintes da parede celular vegetal não se acumulam na natureza, uma vez que são degradados por sistemas enzimáticos especializados produzidos por estes seres vivos (BIELY, 2003 a).

Sistemas celulolíticos completos são amplamente encontrados entre os micro-organismos, sendo que produtores mais importantes destas enzimas geralmente pertencem aos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002; DONKOR e SHAH, 2008; LIU et al., 2012).

Diversas vantagens são apresentadas pelas enzimas microbianas: seu tempo de geração é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular e de produtos; o conteúdo de proteína dos micro-organismos é geralmente mais elevado que a maioria dos vegetais; seu crescimento e a produção de produtos são independentes de condições sazonais; exigem pequena disponibilidade de água e de espaço, podem utilizar substratos bastante diversos, como os resíduos agroindustriais e produzem uma grande diversidade de enzimas (OLIVEIRA et al., 2005). De acordo com Andreus (2002) e Daroit (2007), a diversidade da capacidade metabólica dos micro-organismos, resultante de sua variabilidade genética, é uma potencialidade que deve ser explorada.

Fellows (1994) recomenda que alguns requisitos para a produção industrial de enzimas microbianas sejam observados, tais como a capacidade dos micro-organismos em crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzimas em ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; o emprego de métodos de recuperação de enzimas simples e de baixo investimento e estabilidade considerável das preparações enzimáticas obtidas.

Segundo Joo e Chang (2005), a produção industrial de enzimas é frequentemente limitada, devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos, os quais compreendem cerca de 30 a 40 % dos gastos envolvidos. De acordo com Silva (2008), os resíduos agroindustriais que possuem em sua constituição material lignocelulósico apresentam grande potencial como meio de cultura para a produção de celulases, a fim de viabilizar economicamente os processos de produção destas enzimas.

### *3.2 Fatores que influenciam na produção enzimática*

A produção de enzimática por micro-organismos depende da natureza do substrato, da acessibilidade e suscetibilidade de seus componentes à hidrólise, bem como suas associações químicas ou físicas. A capacidade dos micro-organismos em produzir diferentes enzimas celulolíticas, com diferentes modos de ação e especificidades permite a exploração de substratos heterogêneos. Diversos resíduos lignocelulósicos têm sido utilizados para a produção de  $\beta$ -glicosidases fúngicas, tais como palha de arroz (NAZIR et al., 2009), bagaço de cana (PERALTA et al., 1997), sabugo de milho (CHEN et al., 2010), farelo de trigo (TAKII et al., 2005), entre outros. Segundo Kang et al. (2004) e Juhász et al. (2005), o substrato lignocelulósico deve ser barato, facilmente processável, disponível em grandes quantidades e sua composição deve favorecer a síntese e liberação de enzimas celulolíticas.

Condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e

concentração de nutrientes afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produtos (SANTANA, 2012). Fungos e bactérias são capazes de produzir enzimas celulolíticas por fermentações submersas (FSM) ou por fermentações no estado sólido (FES) (PERSSON et al., 1991). A FES consiste em uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida). Neste tipo de fermentação, 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 (PALMA-FERNANDEZ et al., 2002). Já a fermentação submersa (FSM) envolve a utilização de fontes de carbono em meios líquidos (FELLOWS, 1994).

A FSM é tradicionalmente utilizada para produção de enzimas, pois há melhor controle de alguns parâmetros importantes do processo, como pH e crescimento celular, além da recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa serem facilitadas (FERNANDES, 2006). Um dos maiores inconvenientes desse processo é o fato de gerar grandes volumes de resíduos (ELLAIHAH et al., 2002).

Por sua vez, a FES apresenta vantagens como menor produção de resíduos, resultantes do processo fermentativo, menor utilização de água, o que evita inclusive a contaminação por bactérias que geralmente requerem maior quantidade de líquido no meio. Ainda, a FES requer menor demanda de energia e apresenta facilidade na aeração do meio, havendo maior difusão de gases (HÖLKER et al., 2004).

Contudo, apesar das vantagens atrativas, a FES apresenta alguns inconvenientes, principalmente em relação ao aumento da escala de produção, ao controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular), a baixa homogeneidade e a necessidade de grandes volumes de inóculo. O principal problema associado ao escalonamento na FES diz respeito à dificuldade de remoção do calor gerado pela atividade metabólica dos micro-organismos, sendo o controle desta variável fundamental para obtenção de produtividade elevada e estabilidade do produto (SHINGANIA et al., 2009). A implantação de sistemas de aeração e/ou remoção de calor muitas vezes é necessária. Entretanto, esta não deve encarecer substancialmente os custos de produção.

Segundo Pandey et al. (2001), cada uma dessas técnicas possui suas potencialidades e particularidades, devendo-se levar em consideração o processo de produção enzimática como um todo.

A temperatura é um fator de grande influência no crescimento de micro-organismos. Sendo este um processo exotérmico, o calor gerado deve ser dissipado, pois temperaturas

elevadas são desfavoráveis ao crescimento microbiano, assim como à formação de produtos (GHILDYAL et al., 1994). Nos fungos filamentosos, a temperatura tem relação direta na germinação dos esporos, no crescimento e na esporulação (PINTO, 2003).

O pH do meio é um fator relevante, porém frequentemente negligenciado. O pH do meio afeta o metabolismo dos micro-organismos por alterar sua produção enzimática (PERAZZO, 1999). Diferentes valores de pH podem ser observados durante a incubação e podem estar relacionados ao transporte e solubilização dos nutrientes, às reações enzimáticas, produtos de excreção ou fenômenos de superfícies (DOELLE et al., 1992). Os efeitos deste processo, acrescidos de uma limitação de nutrientes, tendem a aumentar o nível de estresse celular, levando os micro-organismos à morte (HUMPHREY, 1998). Geralmente, os fungos se desenvolvem em valores de pH baixo (4,5 - 6,0) e as bactérias em valores de pH próximos à neutralidade (6,5 - 7,0). Entretanto, alguns fungos filamentosos podem apresentar crescimento ótimo em condições alcalinas (DEVI, 2008).

O emprego de agitação pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos, impedir a formação de agregados, favorecer a exaustão de gases e a troca de calor do meio (SCHMIDELL et al., 2001). Em contrapartida, quando são utilizados fungos filamentosos, a agitação do substrato pode levar ao rompimento das hifas e liberação de metabólitos intracelulares, afetando a produção e a estabilidade de outros metabólitos produzidos durante o processo fermentativo (MITCHELL, 2002).

A agitação na fermentação submersa está ainda relacionada com a forma como o micélio se desenvolve, o qual pode se dispersar livremente no meio de cultivo, ou emaranhar-se de maneira a formar aglomerados macroscópicos, na forma de *pellets* (CHANG e OLLIS, 1982). A diminuição do comprimento da hifa e o aumento das ramificações ocorrem com o aumento da agitação e, conseqüentemente, diminuem a viscosidade do meio (PETRUCCIOLI et al., 1995). De acordo com alguns estudos, a morfologia do micélio é de grande relevância no processo de fermentação (PAPAGIANNI e MATTEY, 2006). Em alguns casos, a formação de *pellets* é pré-requisito para a produção de metabólitos secundários fúngicos como ácido cítrico e para algumas enzimas como poligalacturonases ou  $\alpha$ -glicosidases (BRAUN e LIFSHITZ, 1991). Em contrapartida, a formação de outros produtos é favorecida quando o fungo se desenvolve na forma de um micélio disperso livre (KNOB e CARMONA, 2009; BRAUN e LIFSHITZ, 1991).

De acordo com Sandhya et al. (2005), a concentração do inóculo é um importante fator biológico, o qual determinará a biomassa produzida pela fermentação. Quando a concentração do inóculo é baixa, a produtividade enzimática é reduzida, possivelmente devido

ao número insuficiente de células microbianas para produzir a enzima. Ainda, com a utilização de baixas concentrações de inóculo, um longo tempo pode ser necessário para a multiplicação das células atingirem um determinado nível capaz de utilizar o substrato e produzir a enzima. Em contraste, células microbianas abundantes originadas a partir de um inóculo maior podem afetar adversamente a produção de enzimas, uma vez que a competição por nutrientes estabelecida entre os micro-organismos presentes resulta em baixa produtividade enzimática (PENGTHAMKEERATI et al. 2012). Desta forma, uma concentração de inóculo adequada é importante para promover o equilíbrio entre a biomassa proliferativa e a quantidade de substratos disponíveis, a fim de elevar ao máximo os níveis de enzimas produzidas.

### 3.3 Celulases

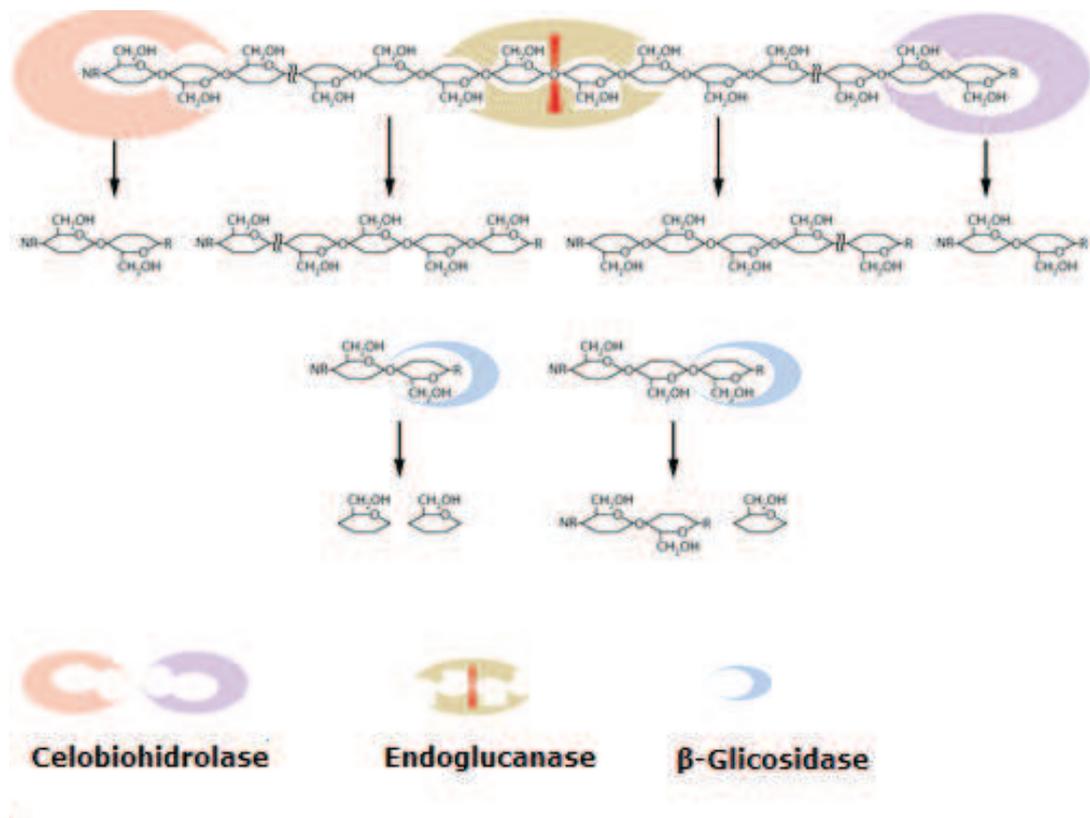
As celulases são enzimas que possuem capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas das cadeias de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004). Para a biodegradação da celulose, as celulases agem de forma sinérgica (Figura 1). As endo- $\beta$ -1,4-glucanases (endoglucanases) (EG; EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas internas da celulose, originando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novas cadeias terminais. Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui gradativamente, conforme o encurtamento da cadeia de celulose (LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006).

As celobiohidrolases (exoglucanases) (CBH; EC 3.2.1.91) clivam nas extremidades da cadeia de celulose, liberando celobiose como produto principal. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando as cadeias do polissacarídeo (LYND et al., 2002).

Os celo-oligossacarídeos e a celobiose originados pela ação das primeiras enzimas são posteriormente hidrolisados pelo terceiro grupo das celulases, as  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (HEIDEMANN et al., 2008). Desta maneira, a denominação  $\beta$ -glicosidase é conferida a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas presentes em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados. Entretanto, sob certas condições, como baixa atividade de água ou alta concentração de substrato, estas enzimas podem catalisar a síntese de ligações  $\beta$ -glicosídicas entre diferentes moléculas (BHATIA et al., 2002).

As  $\beta$ -glicosidases são essenciais na hidrólise eficiente da celulose. Considerando que endoglucanases e exoglucanases são geralmente inibidas por celobiose e celo-oligossacarídeos menores, as  $\beta$ -glucosidases são responsáveis pelo passo limitante do

processo (SORENSEN, 2010). Entretanto, a maioria das  $\beta$ -glucosidases conhecidas são inibidas por glicose, gerando grande interesse por enzimas tolerantes a esta hexose (ZANOELO, 2004). A fim de superar a inibição provocada pela glicose, a conversão de glicose em frutose pode ser realizada, por meio da ação da enzima glicose isomerase. Ainda, os açúcares podem ser removidos por filtração, à medida que forem sendo formados ou então podem ser fermentados a etanol, por meio dos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SUN e CHENG, 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática dos mecanismos de ação de diferentes celulases sobre a molécula de celulose (Adaptado de WATANABE e TOKUDA, 2010).

Embora alguns sistemas celulolíticos possam apresentar celobiose-oxidase e/ou celobiose desidrogenase, as quais também auxiliam na remoção da inibição causada por celobiose sobre a ação de exoglucanases e endoglucanases (IGARASHI et al., 2003), somente as  $\beta$ -glucosidases são capazes de hidrolisar o dissacarídeo, liberando glicose para posterior conversão biológica.

O mecanismo de classificação das  $\beta$ -glucosidases, bem como de outras glicosil hidrolases, baseia-se na especificidade por substratos, ou então na similaridade apresentada por suas sequências de aminoácidos, agrupando-as, neste último caso, em famílias. Na

classificação baseada na especificidade por substrato, estas enzimas são divididas em três grupos: aril  $\beta$ -glicosidases, que atuam sobre aril-glicosídeos; celobiasas verdadeiras, que são capazes de hidrolisar celobiose e  $\beta$ -glicosidases com ampla especificidade por substratos. De acordo com a literatura, a grande maioria das  $\beta$ -glicosidases já caracterizadas pertence a esta última categoria (BHATIA et al., 2002).

O segundo método é o atualmente mais aceito (HENRISSAT e DAVIES, 1997). Como a estrutura molecular e o mecanismo de ação de uma enzima estão relacionados à sua estrutura primária, esse sistema é capaz de refletir suas características estruturais e mecânicas (BHATIA et al., 2002; CANTAREL et al., 2009). No entanto, diferenças nas propriedades físico-químicas, no modo de ação e na especificidade por substratos são verificadas entre as enzimas agrupadas em uma mesma família (KNOB et al., 2010).

Em alguns micro-organismos, diferentes  $\beta$ -glicosidases são codificadas por genes distintos. Porém, formas múltiplas de uma mesma enzima podem ser originadas após degradação proteolítica, ou mesmo por meio de eventos de modificação pós-traducionais, como a glicosilação (YAZDI, 1990; WALLECHA e MISHRA, 2003). Neste sentido, a diversidade de  $\beta$ -glicosidases pode ser útil na tentativa de traçar um determinado evento evolucionário (LI e LEE, 1999).

De acordo com Badhan et al. (2007), a expressão diferencial observada pode ser atribuída à heterogeneidade estrutural dos substratos celulósicos, bem como às condições de cultivo empregadas. No entanto, estudos sobre a regulação da expressão diferencial destas  $\beta$ -glicosidases múltiplas são raros na literatura, dificultando sua melhor compreensão (NAZIR et al., 2009).

$\beta$ -Glicosidases fúngicas múltiplas têm sido relatadas em *Aspergillus terreus* (NAZIR et al., 2009), *Aspergillus tubingensis* (DECKER et al., 2001), *Aspergillus kawashii* (IWASHITA et al., 1998), *Myceliophthora* sp. (BADHAN et al., 2007) e *Stachbotrys* sp. (SAIBI et al., 2007). Segundo de Vries e Visser (2001), a produção de múltiplos componentes celulolíticos por fungos filamentosos filogeneticamente distantes pode inferir grande importância fisiológica à multiplicidade enzimática.

O entendimento acerca dos mecanismos de regulação da expressão de celulases em *Penicillium* é consideravelmente menor, quando comparado aos relacionados a outras espécies fúngicas. Estudos demonstraram que, em fungos filamentosos, a expressão de celulases é regulada principalmente a nível transcricional, podendo ocorrer em três estados, a saber: expressão basal, expressão massiva pela presença de indutores e repressão catabólica

(ARO et al., 2005). Antes da expressão de níveis elevados de celulases ser iniciada, o reconhecimento da presença de celulose no meio deve ser realizado de alguma forma. Para tal, acredita-se que celulases constitutivas sejam expressas em pequenas quantidades, a fim de iniciar a degradação deste polímero, culminando na geração de indutores solúveis que tenham acesso à célula. Estes, por sua vez, ativam a transcrição expressiva de diversos genes celulolíticos.

A repressão catabólica é observada em presença de fontes de carbono mais facilmente metabolizáveis, como a glicose (MURRAY et al., 2003; COLLINS et al., 2007; FURUKAMA et al., 2009). Este mecanismo de repressão é regulado pelo fator transcricional creA. O mesmo possui sítios de ligação em várias regiões promotoras do DNA, as quais regulam a expressão de vários genes que codificam hidrolases em diversos fungos filamentosos, sendo responsável pelo impedimento da ligação de complexos transcricionais aos genes que codificam estas enzimas (ARO et al., 2005, CHULKIN et al., 2010). No entanto, durante a hidrólise da celulose na natureza, os níveis de glicose acumulados podem não ser elevados o suficiente para provocar uma repressão enzimática significativa (ARO et al., 2005).

Variações nos níveis de transcrição, bem como nos genes transcritos são observadas, de acordo com a fonte de carbono utilizada (DUFF e MURRAY, 1996). Sun et al. (2008) investigaram os mecanismos de regulação da expressão basal e induzida de celulases em *Penicillium decumbens*. Os padrões de expressão de  $\beta$ -glicosidases e celobiohidrolases foram mantidos, tanto sob condições de indução (presença de farelo de trigo), quanto sob condições de repressão (presença de glicose). Em contrapartida, o padrão de expressão de endoglucanases foi diferenciado, sendo que estas enzimas foram produzidas somente em presença do substrato indutor.

Wei et al. (2011) avaliaram o padrão de expressão de genes celulolíticos por uma outra linhagem de *P. decumbens*. Os autores verificaram que glicose e celbiose foram capazes de reprimir a expressão destes genes, enquanto que celulose e farelo de trigo se comportaram como agentes indutores de sua expressão. Adicionalmente, a expressão de genes celulolíticos foi verificada na presença de baixos níveis de lactose. De modo similar, Senhem et al. (2006) demonstraram que celulose e lactose foram indutores da expressão de genes codificadores de  $\beta$ -glicosidases em *Penicillium echinulatum*.

A proteína swolenina, recentemente descrita em espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*, auxilia no processo de degradação enzimática do polímero de celulose (YAO et al., 2008; CHEN et al., 2010). Estudos revelaram similaridade na sequência de aminoácidos

entre swoleninas e expansinas. Estas últimas são proteínas vegetais que apresentam a capacidade de afrouxar a estrutura da parede celular vegetal, sendo importantes para o crescimento das plantas e em diversos processos fisiológicos (SAMPEDRO e COSGROVE, 2005). Tem-se inferido que expansinas e swoleninas não possuem atividade sobre as ligações glicosídicas presentes na celulose, uma vez que açúcares redutores não são formados em sua presença. No entanto, foi sugerido que a swolenina esteja relacionada ao intumescimento da parede celular vegetal, por meio do rompimento das ligações de hidrogênio intra e intercadeias da celulose, permitindo melhor acesso às enzimas celulolíticas (ARANTES e SADDLER, 2010).

### 3.4 Principais características das $\beta$ -glicosidases fúngicas

As características bioquímicas de algumas  $\beta$ -glicosidases fúngicas estão apresentadas na Tabela 1. A maioria das  $\beta$ -glicosidases produzidas por fungos apresenta eficiente atividade catalítica em pH ácido, porém são ativas sobre uma ampla faixa de pH. O pH ótimo para a  $\beta$ -glicosidase purificada a partir de *Rhizopus oryzae* foi de 5,0 (TAKII et al., 2005), similarmente às  $\beta$ -glicosidases produzidas por *Aspergillus awamori* (NAGAYOSHI et al., 2011) e *Thermoascus aurantiacus* (LEITE et al., 2008). De modo incomum, a  $\beta$ -glicosidase produzida por *Mucor miehei* apresentou pH ótimo 8,0 (YOSHIOKA e HAYASHIDA, 1980).

A temperatura ótima para atuação destas enzimas varia de 50 °C a 80 °C, conforme relato por alguns autores ao avaliar as  $\beta$ -glicosidases produzidas por diferentes fungos como *Penicillium funiculosum* (RAMANI et al., 2012), *P. decumbens* (CHEN et al., 2010) e *Penicillium sclerotiorum* (WEI et al., 2011).

Grande parte dos estudos reportam  $\beta$ -glicosidases estáveis na faixa de temperatura entre 45 °C a 70 °C. NAZIR et al. (2009) verificaram que uma das  $\beta$ -glicosidases produzidas por *A. terreus* manteve-se estável de 60 °C a 90 °C, enquanto que DAROIT (2007) e CHODI et al. (2012) relataram a produção de  $\beta$ -glicosidases fúngicas estáveis a 60 °C e 65 °C, respectivamente.

A estabilidade das  $\beta$ -glicosidases frente ao pH também apresenta-se de forma variável, considerando sua origem. Diversos fungos filamentosos produziram  $\beta$ -glicosidases estáveis em amplas faixas de pH, como as produzidas por *M. miehei* (pH 2,5 – 10,0) (YOSHIOKA e HAYASHIDA, 1980), *R. oryzae* (pH 3,0 - 7,1) (TAKII et al., 2005) e *A. terreus* (pH 5,0- 10,0) (NAZIR et al, 2009).

Como citado anteriormente, a glicose, o principal produto da hidrólise desta enzima, tem um forte efeito inibidor sobre as  $\beta$ -glicosidasases na maior parte dos casos (KRISCH et al., 2010). Porém, a comparação de resultados de diferentes pesquisas é bastante complexa, devido às diferentes condições de incubação empregadas nesses estudos (DECKER, 2001).

**Tabela 1** – Características bioquímicas de algumas  $\beta$ -glicosidases fúngicas.

ESPÉCIE	FONTE DE CARBONO	MASSA MOLECULAR (KDA)	ATIVIDADE ÓTIMA		ESTABILIDADE		REFERÊNCIA
			pH	Temperatura	pH	Temperatura	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Celulose	91,4	6,0	60	5,4	50-70	Liu et al., 2012
<i>Aspergillus glaucus</i>	Celulose	92,4	3,6	60	3,6	60	Ma et al., 2011
<i>Aspergillus oryzae</i>	Celulose	-	5,5-5,0	45-50	5,0-7,0	45	Bedani et al., 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	Celulose	43	5,0	50	3,0-7,0	45	Riou et al., 1998
<i>Aspergillus terreus</i>	Palha de arroz	29	5,0-10,0	60	5,0-10,0	60-90	Nazir et al., 2009
		43	5,0	60	2,0-6,0	50	
		98	5,0	70	Ampla faixa	50	
<i>Daldinia eschscholzii</i>	Celulose	64,2	5,0	50	5,0	50	Karnchanatat et al., 2007
<i>Fomitopsis palustris</i>	Celulose	138	4,5	70	-	55	Yoon et al., 2008
<i>Humicola grisea</i>	Bagaço de cana	55	6,0	50-60	-	60	Peralta et al., 1997
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Celulose	132	5,0	60	-	-	Li et al., 2007
<i>Melanocarpus</i> sp.	Palha de arroz	180	2,5-3,5	60	-	-	Kaur et al., 2007
<i>Monoascus purpureus</i>	Resíduo de uva	-	5,5	50	-	60	Daroit, 2007

ESPÉCIE	FONTE DE CARBONO	MASSA MOLECULAR (KDA)	ESTABILIDADE				REFERÊNCIA
			ATIVIDADE ÓTIMA		pH	Temperatura	
			pH	Temperatura			
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Avicel	120	6,0	50	6,0-7,8	40	Hebraud e Freve, 1990
<i>Orpinomyces</i> sp.	Avicel	84,5	6,2	50	5,0-8,0	40	Cheng et al., 1994
<i>Penicillium decumbens</i>	Sabugo de milho	120	4,5-5,0	65-70	5,5	50	Chen et al., 2010
<i>Penicillium funiculosum</i>	Resíduo de papel	120	4,0-5,0	60	-	60	Ramani et al., 2012
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Celulose	180	4,5	65	4,0-5,0	60-70	Wei et al., 2011
<i>Ryzophus oryzae</i>	Farelo de trigo	105	5,0	50	-	-	Takii et al., 2005
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Farelo de trigo e casca de maracujá	39	5,5	70	6,0	60	Zanoelo, 2005
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Celulose	240	5,4	65	4,0-6,5	50	Bhat et al., 1993
<i>Stachybotrys</i> sp.	Celulose	-	6,0	50	4,0-10,0	40	Saibi et al., 2007
<i>Termitomyces clypeatus</i>	2-deoxy-D-glucose	66,8	5,0	45	5-0,8-0	60	Pal et al., 2010
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Celulose	-	4,5	75-80	4,0-9,0	60	Palma-Fernandez et al., 2002
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Resíduos deslignificados	90	4,0	75-80	5,5-8,5	60	Chandra et al., 2012

### *3.5 Principais aplicações biotecnológicas das $\beta$ -Glicosidasases*

Enzimas microbianas são comumente empregadas em diversas aplicações industriais. A demanda por enzimas mais estáveis, mais específicas e que apresentem níveis de atividade mais elevados vem crescendo rapidamente (BHAT, 2000). Em relação às  $\beta$ -glicosidasases, a produção em larga escala destas enzimas é requerida, assim como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de ação (BHATIA et al., 2002).

O interesse inicial no estudo das  $\beta$ -glicosidasases surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZANOELO et al., 2004). Nos dias de hoje, um dos principais interesses na produção de  $\beta$ -glicosidasases está relacionado a produtos enzimáticos comerciais e à conversão de monoterpênicos glicosídeos em terpenos livres, aumentando, dessa forma, a intensidade do aroma dos vinhos (TATE e REYNOLDS, 2006). Por esta razão,  $\beta$ -glicosidasases microbianas vêm sendo amplamente estudadas, tanto em microorganismos relacionados, quanto não relacionados aos processos de vinificação (MATTHEWS et al., 2004).

Embora a liberação de terpenos a partir de seus precursores possa ser realizada tanto por enzimas quanto por ácidos, o processo de hidrólise enzimática é considerado um método mais atrativo, visto que o padrão de distribuição natural do aroma não é modificado (BELANCIC et al., 2003; MAICAS e MATEO, 2005). No entanto,  $\beta$ -glicosidasases empregadas neste processo devem atuar sobre as condições restritivas que o vinho oferece, e, desta forma, satisfazer alguns pré-requisitos como especificidade, pH ótimo, tolerância à glicose e ao etanol (RIOU et al., 1998; MATTHEWS et al., 2004).

Em indústrias de sucos de frutas,  $\beta$ -glicosidasases são utilizadas no processo de maceração, na hidrólise da celulose e na liberação de aromas por meio da hidrólise de precursores glicosilados. Entretanto, a presença desta enzima em preparações enzimáticas fúngicas pode induzir a perda da cor de sucos de frutas vermelhas pela hidrólise de antocianinas (LE TRAON-MASSON e PELLERIN, 1998). Por outro lado, a hidrólise destas últimas pelas  $\beta$ -glicosidasases mostra-se interessante para aplicação na produção de vinhos rosados, a partir de variedades de uvas tintas, onde o excesso de cor pode ser removido pelo tratamento enzimático (SÁNCHEZ-TORRES et al., 1998).

Na indústria de sucos cítricos, as  $\beta$ -glicosidasases atuam diminuindo o amargor, por meio da hidrólise da prurina (RIOU et al., 1998). Porém, o efeito inverso pode ser observado, caso sementes estejam presentes no suco, sendo neste caso as  $\beta$ -glicosidasases responsáveis pela

liberação das limoninas (RONNENBERG et al., 1995).

As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas com liberação de agluconas, que possuem ação benéfica na saúde humana, como amenização dos sintomas da menopausa, melhora da densidade óssea e redução do nível do colesterol LDL (RIBEIRO, 2006). Nos vegetais, esta enzima participa de inúmeras reações, como hidrólise de giberelinas conjugadas, conversão de citocininas de armazenamento em formas ativas, no metabolismo de estresse e resistência a alguns fitopatógenos (ESEN, 1992).

Esta enzima também tem o potencial de hidrolisar compostos tóxicos (cianogênicos) presentes em alguns vegetais utilizados na alimentação humana e de extrair vanilina a partir da glicovanilina em vagens de baunilha (RANADIVE, 1992; OKAFOR, 2005).

A propriedade de sintetizar ligações  $\beta$ -glicosídicas permite que  $\beta$ -glicosidases sejam empregadas na síntese de vários compostos, como oligossacarídeos e glicoconjugados (GARGOURI et al., 2004). Nos últimos anos, os oligossacarídeos estabeleceram sua condição de componentes funcionais, agregando valor aos alimentos (AKIYAMA et al., 1998). Quanto à síntese de glicoconjugados, os alquil- $\beta$ -D-glicosídeos, grupo de surfactantes não iônicos, podem ser utilizados na produção de cosméticos, produtos farmacêuticos e detergentes de cozinha (WALLECHA e MISHRA, 2003). A síntese enzimática destas moléculas apresenta-se bastante interessante, uma vez que a produção utilizando rotas químicas normalmente é lenta e inespecífica, resultando na formação de subprodutos indesejáveis (BHATIA et al., 2002; PERUGINO et al., 2004). Porém, dentre todas as possibilidades de aplicação das  $\beta$ -glicosidases, a principal talvez seja sua utilização em processos de hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos para a produção de energia. O processo enzimático de hidrólise da biomassa, apesar de ser considerado de grande potencialidade, enfrenta vários gargalos tecnológicos, sendo o principal destes o elevado custo das enzimas. A celulose possui uma função estrutural que faz com que sua principal característica biológica seja a resistência à degradação. É por isso que a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos requer doses enzimáticas elevadas. Devido a esses altos níveis de consumo, as enzimas requeridas para hidrolisar a celulose possuem um grande impacto econômico na produção do etanol. Várias estratégias estão sendo estudadas para diminuir este custo (ZHANG et al., 2006; KUMAR et al., 2008; DASHTBAN et al., 2009).

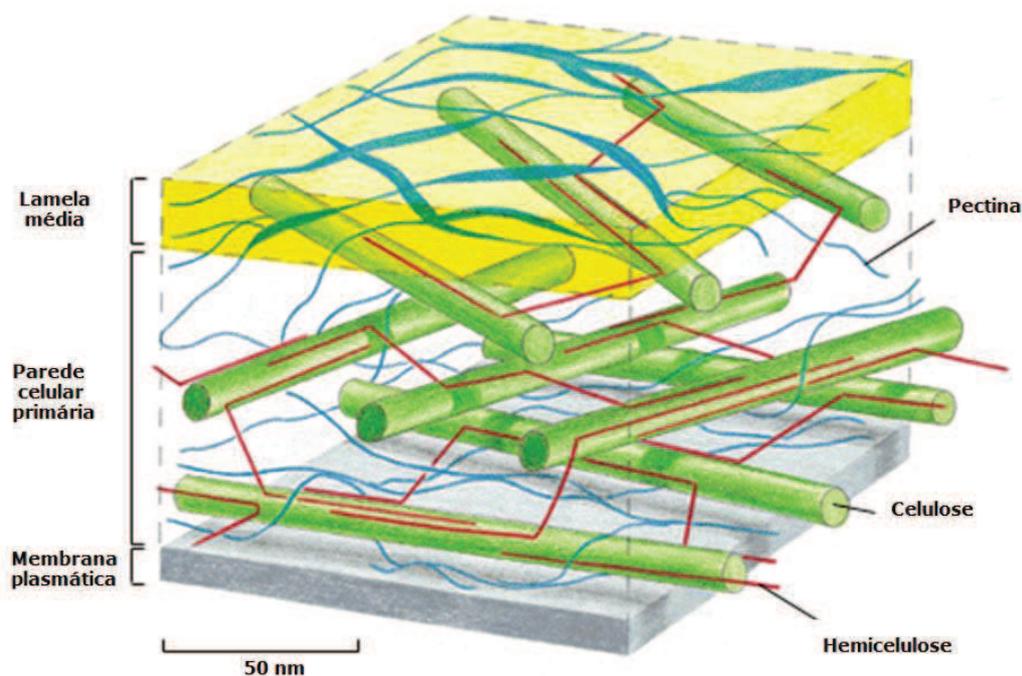
Nesse sentido, a caracterização de  $\beta$ -glicosidases e de outras celulasas que apresentem propriedades aprimoradas para a degradação da biomassa lignocelulósica é o fator

chave no desenvolvimento efetivo do processo de conversão de biomassa em combustível (JOVANOVIC, 2009).

### 3.6 Biomassa lignocelulósica: estrutura e composição

Os materiais lignocelulósicos representam a maior parte da matéria vegetal oriunda do processo fotossintético (SÁNCHEZ, 2009). De acordo com Biely (2003b), estes resíduos podem ser considerados como o principal recurso renovável formado a partir do processo de fixação do gás carbônico. Em geral, denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final (ZHANG e SMITH, 2007).

A lignocelulose é composta por três constituintes principais: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2). O percentual composicional dos constituintes da biomassa lignocelulósica pode variar conforme a espécie vegetal, idade, fase de crescimento das plantas, entre outras condições (SUN e CHENG, 2002).



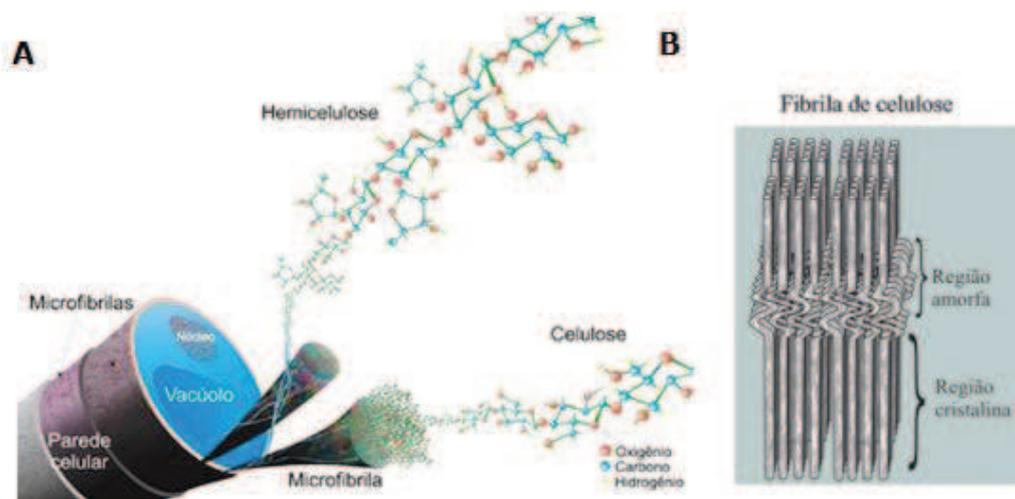
**Figura 2.** Disposição dos polissacarídeos constituintes principais da parede celular presente nos resíduos lignocelulósicos (Adaptado de DARLING, 2012).

A fração hemicelulósica consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades

incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém, ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos  $\beta$ -D-glucurônico, D-*p*-O-metilglucurônico e  $\beta$ -D-galacturânico e deoxiexoses. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (TAIZ e ZEIGER, 2004; KOOTSTRA et al., 2009).

As ligninas são moléculas amorfas, altamente complexas, cujo polímero é formado principalmente por unidades aromáticas de fenilpropano, repetidas de forma irregular (ROWELL et al, 2005). Sua estrutura tridimensional explica a rigidez e a resistência às forças de compressão, gerando uma estrutura resistente ao impacto e a quebra, conferido rigidez à parede celular. Pelo decréscimo que causa na permeação de água através das paredes das células dos tecidos condutores do xilema, a lignina tem uma atuação importante no intrincado transporte interno de água, nutrientes e metabólitos. Tecidos lignificados resistem ao ataque por micro-organismos, impedindo a penetração de enzimas degradantes da parede celular. As ligninas presentes nas paredes celulares das plantas estão associadas às hemiceluloses, não só por meio de interações físicas, como também por meio de ligações covalentes (PHILIPP e D'ALMEIDA, 1988).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização (DP), que varia de 2000 a 15000 resíduos (Figura 3). O final da cadeia de glicana com um carbono anomérico não ligado a outro resíduo de glicose é caracterizado como extremidade redutora do polímero. A extremidade oposta é denominada de extremidade não-redutora (PARK et al., 2010). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez, enquanto que as ligações intramoleculares estão implicadas na formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras apresentam maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente), quando comparadas as presentes na região amorfa, onde as fibras apresentam maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007).



**Figura 3.** A. Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal para a formação de microfibrilas de celulose (BUCKERIDGE, 2012) B. Organização das fibrilas em regiões amorfas e cristalinas (Adaptado de KVIEN et al., 2005).

A celulose é a fonte de carbono mais abundante presente na madeira e nos resíduos agrícolas. Na natureza, a hidrólise desta macromolécula é realizada pela ação sinérgica de diferentes enzimas, denominadas celulases. A acessibilidade ao polissacarídeo, determinada pelo tamanho da partícula de celulose (área de contato externo) e porosidade (área de contato interna), influencia diretamente suas taxas de hidrólise. Esse fator reflete a superfície de contato total entre as enzimas e o substrato, influencia a adsorção de celulases, bem como a extensão das reações enzimáticas (ARANTES e SADDLER, 2011). Adicionalmente, o grau de cristalinidade das fibrilas também contribui para a recalcitrância deste polissacarídeo. Celuloses com maior densidade de regiões amorfas apresentam maior reatividade química, estando mais suscetíveis a serem hidrolisadas pelas celulases (KLEMM et al., 2005).

A produção de energia baseada na matriz lignocelulósica é uma importante rota alternativa, que vem sendo mundialmente estudada e debatida (ZANOELO, 2005; FARINAS et al., 2008). No entanto, a etapa de hidrólise da celulose é considerada o fator mais limitante no desenvolvimento de processos biotecnológicos a partir de materiais lignocelulósicos, em virtude da baixa eficiência das celulases e seu alto custo (CHAUVE et al., 2010).

Embora a celulose possa ser também hidrolisada por ácidos, o processo enzimático vem gradualmente substituindo o processo químico, uma vez que o primeiro apresenta diversas vantagens como condições moderadas de reação, menor impacto ambiental, além de não danificar os equipamentos, como verificado nos processos químicos. Além disso, as tecnologias químicas comumente aplicadas são caras e geram resíduos adicionais (DUFF e MURRAY, 1996; WEN et al., 2004).

A habilidade em decompor a biomassa celulósica em glicose tem tornado as celulases um dos sistemas enzimáticos mais investigados. Entretanto, a biomassa lignocelulósica, além de conter celulose e hemicelulose, apresenta lignina em sua constituição. A recalcitrância desta última molécula dificulta a conversão da celulose em açúcares simples. A fim de tornar a celulose disponível ao ataque das celulases, pré-tratamentos são geralmente utilizados (ADSUL et al., 2005).

O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, consequentemente tornando a celulose mais acessível para as enzimas hidrolíticas. Além disso, o pré-tratamento empregado deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os micro-organismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos químicos, físicos e biológicos, com efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes (MOSIER et al., 2005; SUN e CHENG, 2005).

### *3.7 Resíduos agroindustriais*

Questões ambientais têm despertado o interesse por recursos renováveis e por resíduos agroindustriais como fonte para a produção de novos materiais e de energia. Segundo Rosa et al. (2011), o desenvolvimento e a implementação de processos sustentáveis, capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado, são necessários para o aproveitamento e consumo de resíduos agroindustriais e para uma menor geração de impactos ambientais.

Estima-se que a produção anual de resíduos agroindustriais esteja na ordem de bilhões de toneladas. A América Latina produz mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo que o Brasil é responsável por mais de 50 % desta produção (SANTOS et al., 2005). No contexto brasileiro, estima-se que somente o setor sucro-alcooleiro gere, aproximadamente, 16 milhões de toneladas de bagaço de cana excedente e 76 milhões de toneladas de palha (MAPA, 2006). Considerando-se, ainda, os resíduos oriundos de biomassas alimentícias, a quantidade total gerada no nosso país atinge o valor de, aproximadamente, 350 milhões de toneladas/ano (PEREIRA, 2006). É um enorme potencial que não pode ser subestimado e exige que estes materiais tenham um aproveitamento mais racional, visto que sua acumulação gera prejuízo às atividades econômicas do setor agroindustrial e também ao meio ambiente (CANO e PALET, 2007).

O incremento de novas tecnologias empregadas no setor agrícola desencadeou um aumento na obtenção de produtos e subprodutos. Atualmente, pesquisas em laboratório estão voltadas para utilização destes subprodutos, como alternativa econômica para produção de biocombustível, entre outras diversas aplicações industriais (SILVA, 2010). Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. Dentre estes exemplos figuram os resíduos derivados de atividades tais como as indústrias de papel e celulose (sepilho, maravalhas e cavacos desclassificados de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana), indústrias de polpa de fruta (cascas e bagaço de frutas) e, de modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas como palha de cereais e de milho, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros (RAMOS e FONTANA, 2004).

Esta vasta disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo no Brasil tem estimulado a busca por micro-organismos que sejam capazes de utilizar eficientemente estes materiais.

### *3.8 O resíduo agroindustrial casca de abacaxi*

De acordo com FAOSTAT (2012), em 2010, o Brasil se destacou como o maior produtor de abacaxi em escala mundial, sendo sua produção estimada em 2.205.590 milhões de toneladas.

O suco de abacaxi é o terceiro preferido no mundo, logo após o suco de laranja e de maçã (CABRERA et al., 2000). Os subprodutos do abacaxi consistem basicamente da polpa residual, cascas e folhas. O aumento da produção de itens processados do abacaxi tem resultado em uma vasta geração de resíduos. Além disso, o manuseio de frutas e exposição às condições ambientais adversas durante o transporte e armazenamento também têm contribuído para a geração de resíduos deste produto (NUNES et al., 2009).

Recentemente, foi relatado o uso de vermicompostagem sobre os resíduos de abacaxi. Este processo rapidamente decompõe cerca de 99 % da massa úmida da polpa desta fruta, resultando em redução de peso equivalente a 87 %. O pH do resíduo inicialmente ácido é modificado para neutro, até alcalino durante o processo. No entanto, a viabilidade de custos dessa prática está sendo atualmente verificada (MAINOO et al., 2009).

Segundo Dacera et al. (2009), o material residual obtido a partir do processamento de frutas pode ser utilizado para aplicações industriais, como a fermentação e extração de

componentes bioativos. Por esta razão, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de explorar a possibilidade de utilizar os resíduos provenientes do processamento do abacaxi, onde, além de não serem depositados como poluentes ambientais, poderão ser convertidos em produtos de considerável valor econômico.

Os resíduos de fábricas de conservas de abacaxi foram testados como substrato para a produção de bromelina, ácidos orgânicos e etanol, uma vez que estes resíduos são fontes potenciais de açúcares, vitaminas e nutrientes para crescimento microbiano (LARRAURI et al., 1997; NIGAM, 1999; DACERA et al., 2009).

Na China, estudos revelaram que os resíduos de abacaxi podem ser incorporados à ração de vacas leiteiras. Os resíduos de abacaxi secos podem ser utilizados na suplementação da ração animal, correspondendo em até 50 % do volume total da ração destinada ao gado (SRUAMISRI, 2007). Em seus estudos conduzidos na Nigéria, Onwuka et al. (1997) reportaram o uso de resíduos do processo de conserva de abacaxi para a alimentação de pequenos ruminantes. Além destas, pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de avaliar o desempenho dos produtos de abacaxi em promover a digestibilidade dos animais, quando utilizado como alimento. COSTA et al. (2007) reportou um aumento de peso em cabras, quando estas foram alimentadas pelos subprodutos desta fruta durante 80 dias.

### 3.9 O gênero *Penicillium* e a espécie *P. miczynskii*

*P. miczynskii* Zalesky 1927 pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, sendo a fase teleomórfica pertencente ao gênero *Eupenicillium* ou *Talaromyces* (NCBI, 2012).

Espécies do gênero *Penicillium* são ubíquas na natureza, ou seja, apresentam vasta distribuição. Algumas linhagens são encontradas no solo, enquanto que outras estão presentes na matéria orgânica em decomposição. Muitas são capazes de se desenvolverem em ambientes secos, madeiras, sementes, entre outros (PITT, 2000).

A taxonomia moderna ou polifásica abrange tantos aspectos morfológicos, fisiológicos, como também a produção de metabólitos e estudos moleculares. Até pouco tempo atrás, técnicas clássicas como a morfologia das culturas em placas de Petri e microscopia eram empregadas para a taxonomia determinativa destas espécies (Pitt, 2000). No entanto, atualmente, abordagens como a análise do perfil de secreção de micotoxinas e a comparação de sequências gênicas têm sido utilizadas para a identificação de espécies desse

gênero (PATERSON et al., 2006).

*Penicillium* sp. é o agente causal dos bolores de coloração azul ou verde em frutos cítricos. Estes fungos podem causar podridões de frutos, muito comuns nas condições de pós-colheita (KIMATI et al., 1978). *Penicillium digitatum* é o responsável por grandes perdas de frutos cítricos em fase de comercialização, sendo muitas vezes um fator limitante da produção (KUPPER et al., 2009). *Penicillium* spp. são conhecidas como contaminantes do café, tendo influência na qualidade dos grãos para o comércio (LUNALVA, 2007).

Um dos maiores efeitos deletérios causados por espécies de *Penicillium* para o homem e para os outros animais é a produção de micotoxinas, com diferentes efeitos tóxicos sobre os alimentos (WEBLEY et al., 1997). Apenas uma única espécie de *Penicillium* é considerada patogênica para o homem e para os outros animais, denominada *Penicillium marneffe*. Inicialmente, este micro-organismo estava associado apenas a uma micose endêmica na Ásia tropical, especialmente no norte da Tailândia, China, Hong Kong e Taiwan (SUPPARATPINYO et al., 1994). Entretanto, nos últimos anos, diversos casos clínicos demonstram a associação de infecções sistêmicas e *P. marneffe*, particularmente em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência humana (YOUNGCHIM et al., 2005). Ainda, por estarem presentes no ar, diversas espécies deste gênero estão implicadas no desencadeamento de processos alérgicos e apresentam-se como fator de risco para o desenvolvimento de asma (REN et al., 2001).

Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* apresentam grande importância, sendo utilizados como organismos modelos em estudos de pesquisa básica e aplicada. Diversos estudos têm revelado seu potencial de aplicação no controle biológico, na produção de metabólitos secundários, de novos fármacos, de enzimas de interesse biotecnológico, entre outros (PALLU, 2010).

A primeira e principal aplicação industrial envolvendo espécies do gênero *Penicillium* é a produção de penicilinas. O descobrimento deste metabólito produzido por *Penicillium notatum* (atualmente *P. chrysogenum*) foi realizado por Alexander Fleming, em 1928 (PITT, 2000). Deste então, diversas espécies são aplicadas industrialmente para a produção de medicamentos. *Penicillium citrinum* é utilizado para a produção da estatina compactina, precursora do fármaco pravastatina e a espécie *Penicillium griseofulvum* é empregada para a produção do antifúngico griseofulvina, sendo esta indicada também como potente agente quimioterápico (SINGH, 2008). Várias espécies de *Penicillium* são também utilizadas na produção de alimentos. As espécies *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti* há muito tempo são empregadas na produção de queijos, enquanto que

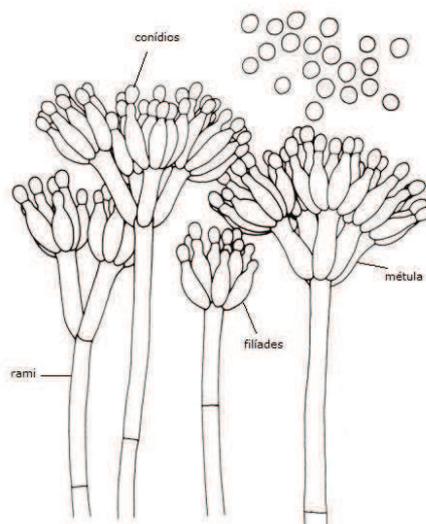
*Penicillium nalgiovense* é útil na fabricação de salames (FRISVAD e SAMSON, 2004; BARKAI-GOLAN, 2008).

Estes fungos também apresentam potencial promissor para uso em processos biorremediativos. Tem sido documentado que várias espécies possuem a capacidade de internalizar e metabolizar diversos xenobióticos, tais como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fenol e seus derivados (LEITÃO, 2009).

Espécies do gênero *Penicillium*, além da produção de metabólitos, possuem um longo histórico de uso biotecnológico na produção de enzimas. Knob e Carmona (2009) descreveram uma  $\beta$ -xilosidase com grande atividade a partir de *P. sclerotiorum*. A produção de amilases, poligalacturonases e lipases foram descritas em *Penicillium fellutanum*, *Penicillium solitum* e *Penicillium aurantiogriseum*, respectivamente (LIMA et al., 2004; KATHIRESAN e MANIVANNAN, 2006; JURICK et al., 2012).

Muitas espécies de *Penicillium*, isoladas dos mais diferentes habitats, tem sido estudadas e relatadas como boas produtoras de enzimas celulolíticas, evidenciando o potencial deste gênero na produção de enzimas desse complexo. A produção de  $\beta$ -glicosidases foi relatada, por exemplo, por *P. funiculosum* (RAMANI et al., 2012), *Penicillium purpurogenum* (DHAKE E PATIL, 2005; JEYA et al., 2010) e *P. citrinum* (I-SON et al., 2010). Adicionalmente, existem relatos de espécies de *Penicillium* produtoras de endoglucanases como *Penicillium occitanis* (CHAABOUNI et al., 2005) e *Penicillium pinophilum* (POL, 2012). No entanto, não existe na literatura nenhum relato sobre a produção de celulases pelo fungo *P. miczynskii*, bem como de nenhuma outra enzima.

A estrutura que caracteriza as espécies do gênero *Penicillium* é o conidióforo, que se apresenta sob a forma de um pincel (Figura 4). Da morfologia desta estrutura, deriva o nome do gênero (do latim *Penicillus*, “pincel pequeno”). Os conídios se apresentam em cadeias e são originados a partir de uma célula especializada: a fiálide. O conidióforo está unido ao micélio por meio da estipe. As células que dão suporte as fiálides denominam-se métulas e as que conferem suporte as métulas, quando presentes, denominam-se rama. Estas ramas surgem a partir da estipe, porém podem surgir a partir de outras ramas.

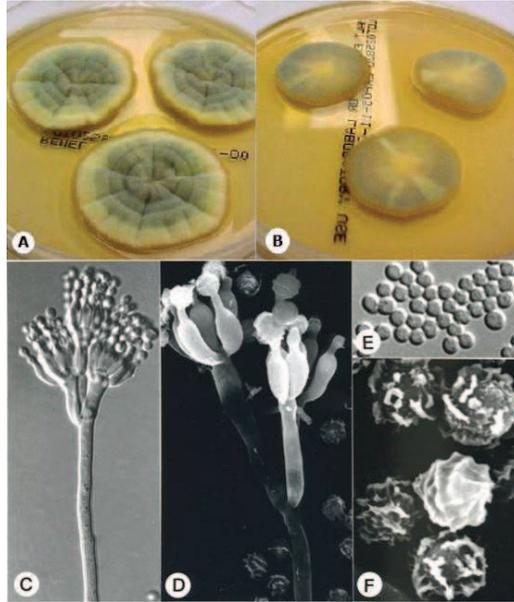


**Figura 4.** Representação de um conidióforo hipotético encontrado em espécies de *Penicillium* (TZEAN et al., 1994).

As informações acerca de *P. miczynskii* são escassas em relação a outras espécies do gênero *Penicillium*. Este fungo é ubíquo na natureza, porém seu isolamento é raro, estando especialmente associado a uma grande variedade de alimentos, assim como ao solo (PITT, 2000).

Quando cultivado em meio Czapeck (CYA), *P. miczynskii* apresenta colônias tipicamente medindo de 25-35 mm de diâmetro, sulcadas ou rugosas. O micélio aéreo geralmente apresenta a coloração amarelo tom pastel ou brilhante, enquanto que micélio reverso apresenta-se amarelo vivo ou alaranjado, raramente amarelo esverdeado ou pálido (figura 5 A).

Quando cultivado em ágar extrato de malte (MEA), mede tipicamente de 25-35 mm de diâmetro, sendo as colônias sulcadas ou planas. Apresenta micélio aéreo branco ou amarelo pálido, enquanto o micélio reverso se apresenta na coloração verde, bege ou acastanhada (Figura 5 B). A germinação ocorre a partir de 5 °C e o crescimento não é verificado a 37 °C. Essa espécie produz importantes micotoxinas como a citrinina e citreoviridia, sendo relevante quando ocorre a contaminação em alimentos (PITT, 2000).



**Figura 5.** *P. miczynskii*. Colônias crescidas em CYA (A) e MEA (B) a 25 °C, por sete dias. Conidióforos (C e D) e conídios (E e F). (Adaptado de TZEAN et al., 1994; PITT, 2000).

#### ***4. Material e Métodos***

Os materiais e métodos específicos utilizados estão descritos no capítulo correspondente ao artigo científico.

## ***5. Resultados***

Os resultados estão descritos no capítulo correspondente ao artigo científico descrito na seção a seguir.

Capítulo I

**$\beta$ -Glucosidase Production by *Penicillium miczynskii* growing in pineapple peel  
and its Biochemical Characterization**

Manuscrito submetido para publicação na revista Biomass & Bioenergy, a qual apresenta Qualis CAPES A1.

**$\beta$ -Glucosidase production by *Penicillium miczynskii* growing in pineapple peel and its biochemical characterization**

Beitel, S.M.<sup>1</sup> and Knob, A.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology Sciences, Midwest State University. Camargo Varela de Sá Street, 03, zip code 85040-080, Guarapuava, PR, Brazil.

\*Corresponding author: Adriana Knob

Department of Biology, Midwest State University. Camargo Varela de Sá Street, 03, Zip code 85.040 080. Guarapuava, PR, Brazil.

Phone: 55-42-36298133. Fax: 55-42-36211090

E-mail: [knob@unicentro.br](mailto:knob@unicentro.br)

**Abstract****Abstract**

$\beta$ -Glucosidases have a great potential to be used in various biotechnological processes, such as in food and feed industries, biomass hydrolysis for bioethanol production and its use to enhance the flavor of wine, tea and fruit juice. This work describes the  $\beta$ -glucosidase production by *Penicillium miczynskii*. The effect of pH, time and condition of cultivation, temperature, different carbon sources and concentration of the selected agro industrial waste on extracellular  $\beta$ -glucosidase production was studied in submerged fermentation. Additionally, the enzyme produced was biochemically characterized. The best conditions for *P. miczynskii*  $\beta$ -glucosidase production were 3% pineapple peel as carbon source, under stationary condition, for 9 days, pH 5.5 and temperature of 20 °C, achieving to 2.82 U/mL. The enzyme showed best activity on pH 4.5-5.0, at 65 °C. It was stable at 55 °C and 60 °C, with a half-life of 50 and 40 min, respectively. The  $\beta$ -glucosidase was slight activated in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  and strongly inhibited by SDS,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ . Also, sodium citrate,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  were able to inhibit this enzyme, especially at 10 mM concentration. The article provides a novel  $\beta$ -glucosidase which presents favorable industrial properties, such as its production in pineapple waste, an inexpensive and abundant agro-industrial residue, and high hydrolysis activity at elevated temperatures.

Keywords: filamentous fungi, submerged culture, agricultural wastes, cellulolytic enzymes

## 1. Introduction

Biofuel technology is now globally considered as the promising technology to replace fossil fuels. Lignocellulosic biomass from forestry, agriculture and municipal sources are abundant, inexpensive and potential feedstock for bioenergy production. To initiate the lignocellulosic energy production, saccharification of cellulosic biomass is essential [1,2]. Bioconversion of lignocellulosic residues is initiated primarily by microorganisms such as fungi and bacteria, which are able of degrading these wastes. In filamentous fungi, cellulases include endoglucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (3.2.1.91) and  $\beta$ -glucosidases (3.2.1.21), which efficiently act on cellulolytic wastes in a synergistic manner [3].

$\beta$ -Glucosidases hydrolyze soluble cellobiose into two molecules of glucose. This enzyme has been isolated from many fungal species including ascomycetes and basidiomycetes [3,4]. Industrial applications of  $\beta$ -glucosidases including paper, food and feed industries, oligosaccharides synthesis and its use to enhance the flavor of wine, tea and fruit juice [5,6].

The major limitation for a broader applicability of industrial cellulases is its high cost. The successful strategy to produce these enzymes can be achieved through microorganism selection, since there are a variety of enzymes produced by fungi. Other strategies include screenings using different lignocellulosic materials like agro-industrial wastes and the improvement of fermentation process conditions [6-8].

Pineapple waste is a by-product of the processing industry and consists of residual pulp and peels. This lignocellulosic material still retains a considerable amount of soluble sugars, as well as high fiber and low protein content [9,10]. A high volume of agro-industrial waste is produced in Brazil due to its high agricultural activity. This country is the largest pineapple producer in the world, reaching a volume of 2.205.590 tons in 2010. As a consequence, a large quantity of pineapple waste is generated. Like many other agro-industrial by-products, pineapple waste has low commercial value and its deposition on a large scale can results in a serious environmental problem. In many research centers, there have been growing efforts to find alternative uses for the organic material generated by the agriculture and the industry [9,11,12].

*Penicillium miczynskii* is of widespread distribution. It has been isolated from a variety of foodstuffs as well as from soil [13]. Although  $\beta$ -glucosidase from different fungal species has already been characterized, there are no reports about the  $\beta$ -glucosidase produced by this species. The aims of this study were to investigate the influence of the chemical-physical parameters on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* and biochemically characterize the produced enzymes.

## 2. Material and methods

### 2.1 Fungal strains and culture conditions

*P. miczynskii* used in this investigation was isolated from the natural Amazon forest on Ecologic Station Juréia-Itatins, located in São Paulo State, Brazil. The strain belongs to the Culture Collection of the Environmental Studies Center - CES/UNESP, Brazil. The fungus was grown on Vogel's solid medium [14] containing 1.5% (m/v) glucose and 1.5% (m/v) agar, at 28 °C, during 7 days for conidia production. Submerged fermentation was prepared in 125 ml flasks containing 25 ml of the Vogel liquid medium, pH 6.5 and inoculated with 1.0 ml spore suspension ( $1.0 \times 10^7$  spores/mL) to each flask. The cultures were incubated at different conditions as indicated subsequently. After incubation, cultures were filtered by vacuum. The filtrate was assayed for extracellular activity and protein. The mycelium was frozen and macerated with sand in McIlvane buffer pH 5.0. The slurry was centrifuged at  $3.900 \times g$ , for 15 minutes and the supernatant was used as an intracellular protein source. All experiments were carried out in duplicate to verify the reproducibility and the results are presented through mean values.

### 2.2 Enzyme and protein assay

$\beta$ -glucosidase activity was determined by measuring the amount of *p*-nitrophenol released from *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) at 405 nm. A 0.2 mL solution of 5 mM pNPG was preincubated for 5 min in McIlvane buffer pH 5.0, at 50 °C. For this solution, 0.3 mL of the properly diluted enzyme sample was added. After an appropriate period, the enzymatic activity was stopped by adding 2 mL of 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution. One unit of enzyme activity was defined as the enzyme amount that releases 1 micromole of *p*-nitrophenol per mL, per minute of reaction. Specific activity was expressed as unit per milligram of protein. All enzyme assays were performed at least three times and results are present through the mean values.

Protein concentrations were determined by modified Bradford method [15] with reference to a standard calibration curve for bovine serum albumin.

### 2.3 Culture conditions for $\beta$ -glucosidase production

### 2.3.1 Enzyme production on different agro-industrial wastes

Enzyme induction was studied with different substrates as sole carbon source 1% (w/v) in Vogel's medium, incubated for 10 days, at 28 °C, under stationary condition. The humid wastes were washed and dried in the oven at 60 °C for 3 days. After the agro-industrial waste that induced the highest enzyme level has been selected, some concentrations of this carbon source were evaluated from 0.5% to 3.5% (w/v).

### 2.3.2 Effect of culture conditions, initial pH and temperature on $\beta$ -glucosidase production

The incubation period influence on  $\beta$ -glucosidase production was evaluated in standing culture for 12 days and under shaking culture (120 rpm) for 8 days. The effect of initial pH on the enzyme production was evaluated from 3.0 to 9.0 and the temperature influence was verified from 20 °C to 35 °C.

## 2.4 Enzyme characterization

### 2.4.1 Optimum pH and temperature $\beta$ -glucosidase activity

The optimum temperature for enzyme activity was determined by monitoring enzyme activity at several temperatures from 35 °C to 75 °C, in McIlvaine buffer pH 5.0. To determine the optimum pH, the  $\beta$ -glucosidase activity was assayed in different pH values using McIlvane buffer from pH 3.0 to 7.0, in the optimum temperature.

### 2.4.2 $\beta$ -glucosidase stability at different temperature and pH

Temperature stability was measured by incubating the enzyme at the predetermined optimal pH value for different periods, at temperatures from 55 °C to 70 °C. Following incubation, the enzyme solution was frozen and the remaining activity was determined. For pH stability assays, the crude filtered was diluted (1:2 v/v) in McIlvane buffer for pH range from 3.0 to 7.0. The samples were incubated at 4 °C for 24 h. After this period, the  $\beta$ -glucosidase activity was assayed under optimal conditions and the residual activity was determined.

### 2.4.3 Effect of metals and substances

The  $\beta$ -glucosidase activity was investigated against some metallic ions and other substances, at final concentrations of 2 mM and 10 mM. The enzyme assay was performed in optimal conditions and the relative activities were expressed as a percentage against the control. The data obtained were submitted to statistical analysis by Student's t-test at a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Influence of the carbon source on $\beta$ -glucosidase production and its concentration

The use of lignocellulosic wastes as **carbon source** in the growth medium would reduce the costs of enzyme production.  $\beta$ -Glucosidase production by *P. miczynskii* using different agro-industrial wastes is shown in Table 1. The carbon source that induced the highest enzymatic activity and fungal growth was pineapple peel, corresponding to 1.01 U/mL and 0.24 mg protein, respectively. *P. miczynskii* was also able to produce  $\beta$ -glucosidase in the presence of apple peel and orange peel, showing a production of 0.27 U/mL and 0.25 U/mL, respectively. According to Matos and Reinhardt [16], the increase in fruit pulp consumption generates a high production of fruit processing wastes that can be processed into higher added value products. The use of pineapple peel to produce  $\beta$ -glucosidase has been shown to be promising in Brazil, since nowadays this country is the major pineapple producer [10,16].

In the presence of wheat bran, passion bagasse and soybean peel, low levels of enzyme activity were verified, when compared to the cultures with pineapple peel. Enzyme activity was not detected when malt bagasse, sugar cane bagasse, corn cob, rice peel, sugar-cane straw or corn straw were used as carbon sources. Wastes such as wheat bran, sugar cane bagasse rice husk and maize straw have been shown as appropriate inducers for  $\beta$ -glucosidase production in other filamentous fungi [17-21]. Gao et al. [22] reported the use of corn stover in addition of wheat bran to  $\beta$ -glucosidases production by *Fusarium proliferatum*. Differences in composition, as well differences in accessibility of the substrates by *P. miczynskii*, can have resulted in distinct production levels among the agro-industrial residues evaluated in this study.

The most efficient concentration of pineapple peel to induce *P. miczynskii*  $\beta$ -glucosidase production and fungal growth was 3% (1.99 U/mL) and 2.5% (1.04 mg protein), respectively (Table 2). Folakemi et al. [23]

verified that 5% of the same substrate induced high level of cellulases by *Trichoderma longibrachiatum* and *Saccharomyces cerevisiae*. On the other hand, Azzaz et al. [24] reported the use of wheat straw at a concentration of 20% (w/v) to induce cellulose production by an *Aspergillus niger* strain (0.076 U/mL).

### 3.2 Effects of culture conditions on $\beta$ -glucosidase production

The capacity of microorganisms to produce enzymes is influenced by environmental conditions such as temperature, pH, agitation and period of growth. For this reason, optimization of these parameters is important to develop the process. In standing culture, with pineapple peel as carbon source, the highest extracellular  $\beta$ -glucosidase production in unit per volume was obtained in 9-day-old cultures (1.07 U/mL) (Fig. 1a). The maximal fungal growth was observed in 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days, corresponding to 1.01 and 1.09 mg of protein (not shown). In shaking condition (Fig. 1b), the maximal activity in units per volume was achieved in 6-day-old cultures (0.68 U/mL). *P. miczynskii* showed maximum growth, measuring by intracellular protein, on the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day in stationary condition and the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> day in shaking culture (not shown). According to Papagianni and Mattey [25], the mycelial morphology control in fermentation is often a prerequisite for industrial application.

Macroscopic morphology examination of the *P. miczynskii* in stationary and shaking conditions revealed that, in the first case, the hyphae formed a freely dispersed mycelium, whereas in the second case, pellets were produced. According to Braun and Vecht-Lifshitz [26], for producing fungal metabolites the morphology varies from one product to another. In some processes, free mycelia are required for increased productivities, as in the current work [26,27]. For this reason, the subsequent experiments were carried out under stationary condition.

Temperature and pH are directly related to growth behavior and development of the fungal mycelium, as well as in the  $\beta$ -glucosidase production. The influence of pH on  $\beta$ -glucosidase production is showed in Fig. 2a.  $\beta$ -Glucosidase production was verified in all initial pH evaluated. The highest activity in units per volume was observed in two major peaks at initial pH from 4.5 to 5.5 and from 6.5 to 7.0. Dhake and Patil [28] verified an optimum initial pH value at pH 5.5 for *Penicillium purpurogenum*  $\beta$ -glucosidase production, while Ang et al. [29] reported high level of *Paecilomyces variotii*  $\beta$ -glucosidase within the pH range of 5.0 to 9.0. *P. miczynskii* could grow in media with initial pH between 3.0 and 9.0, with maximal growth at 7.5 (0.73 mg of protein) and 8.5 (0.64 mg of protein) (not shown). This result indicates the alkaline nature of this fungus.

The effect of temperature on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* is presented in Fig. 2b. The

maximum value of  $\beta$ -glucosidase production was verified at 20 °C, corresponding to 2.82 U/mL while the highest specific activity was obtained at 25 °C, corresponding to 39.02 U/mg of protein. However, other authors determined the best temperature range for filamentous fungi  $\beta$ -glucosidase production between 30 °C and 45 °C [23,30]. The highest growth was verified at 20 °C (0.42 mg of protein), while at 35 °C *P. miczynskii* growth was not detected (not shown). The optimum temperature for  $\beta$ -glucosidase production was similar to the optimum temperature for the growth of the fungus, corresponding to the environmental temperature which it was initially isolated. This observation was in accordance with those reported by Knob and Carmona [31] studying  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*.

### 3.3 Biochemical properties of *P. miczynskii* $\beta$ -glucosidase

$\beta$ -Glucosidase from *P. miczynskii* showed maximal activity at 65 °C (Fig. 3a). Similar  $\beta$ -glucosidases optimum temperatures from 50 °C to 65 °C have been reported from several fungi, such as *Penicillium funiculosum* [32], *Penicillium purpurogenum* [28] and *Aspergillus* sp. [33]. Besides, other fungal  $\beta$ -glucosidases presented maximal temperature activity at 70 °C [34,35]. This study showed that the best pH for  $\beta$ -glucosidase activity was around at pH 4.5-5.0 (Fig. 3b), which is similar to that reported for the  $\beta$ -glucosidase from *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* [36], *Aspergillus awamori* [37] and *T. aurantiacus* [21].

The stability of enzymes remains a critical aspect for its biotechnological applications. For this reason, thermal and pH stability of  $\beta$ -glucosidase produced by *P. miczynskii* were investigated. The enzymatic preparation was incubated without substrate at 55 °C, 60 °C, 65 °C and 70 °C (Fig. 4a). *P. miczynskii*  $\beta$ -glucosidase was stable at 55 °C and 60 °C, showing the half-life ( $T_{1/2}$ ) values of 50 min and 40 min, respectively. *P. miczynskii*  $\beta$ -glucosidase was more stable than those produced by *Aspergillus awamori*, which retained 60 % of its activity after 10 min of incubation at 55 °C [37]. Conversely, Chodi et al. [38] verified a  $\beta$ -glucosidase from *Humicola brevis* stable at 65 °C, with  $T_{1/2}$  of 5.1 hours.

The  $\beta$ -glucosidase produced by *P. miczynskii* maintained its stability in acid and neutral conditions (Fig. 4b). High stability (around 80%) was observed at pH 7.0 and 4.5, while at pH 3.5, 4.0, 6.0 and 6.5 more than 60% of its residual activity was verified. Low residual activity (less than 40%) was observed at pH 3.0 and 5.0. *Aspergillus fumigatus*  $\beta$ -glucosidase remained stable in pH ranging from 4.0 to 7.0 [39], while  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. exhibited pH stability between 5.0 and 6.0 [40].

In order to verify the effect of substances on  $\beta$ -glucosidase activities, the crude filtrate was incubated in the presence of several metallic ions, sodium dodecylsulfate (SDS), tetrasodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)

and  $\beta$ -mercaptoethanol, at 2 mM and 10 mM concentrations (Table 3). The chelating agent EDTA inhibited  $\beta$ -glucosidase activity, indicating that this enzyme is a metalloprotein and requires metal ions for your action.  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  were strong inhibitors of  $\beta$ -glucosidase activity, while sodium citrate,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  had a moderate inhibitory effect on the enzyme. Likewise, *Humicola grisea*, *Aspergillus oryzae* and *Monascus purpureus*  $\beta$ -glucosidase were inhibited by some of these elements [41-43]. The inhibition by  $\text{Hg}^{2+}$  indicates the presence of thiol groups of cysteine residues in  $\beta$ -glucosidase active sites or around them.  $\beta$ -Glucosidase activity retained less than 50% of its initial activity in the presence of SDS, indicating the relevance of hydrophobic interactions to maintenance of native structure.

$\beta$ -Glucosidase showed enhanced activity in the presence of reducing agent  $\beta$ -mercaptoethanol which can be explained by preventing the oxidation of sulfidryl groups. Slight activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  observed may be explained due to the enzyme structure stabilization by this ion. Similarly, *Daldinia eschscholzii*  $\beta$ -glucosidase was activated in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  [44].

#### 4. Concluding remarks

In this study, a *P. miczynskii* strain was able to produce high levels of  $\beta$ -glucosidase using pineapple peel as substrate. Large amounts of this agro-industrial waste, that is a by-product of pulp industries, is generated and accumulated over the years. The use of pineapple peel for  $\beta$ -glucosidase production can decrease the deposition of this waste on the environment and add value to this residue. Additionally,  $\beta$ -glucosidase production cost can be substantially reduced. A new  $\beta$ -glucosidase produced by *P. miczynskii* was able to act in high temperatures and acid pH, and it was stable in a wide pH range. These characteristics allow its application in a wide field of biotechnological processes such as additives in cellulose-based feeds, release of aromatic compounds from glycosidic precursors present in fruit juices, musts and wines and bioethanol production [5].

**Acknowledgements:** We acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES - Brazil) for the scholarship awarded to the first author.

## References

- [1] Saratale GD, Oh SE. Lignocellulosics to ethanol: The future of the chemical and energy industry. Review paper. *Afr J Biotechnol* 2012;11(5):1002-1013.
- [2] Sánchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 2008; 99(13):5270-5295.
- [3] Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci* 2009;5(6):578-595.
- [4] Chauve M, Mathis H, Huc D, Casanave D, Monot F, Ferreira NL. Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. *Biotechnol Biofuels* 2010;3(3):1-8.
- [5] Krisch J, Takó M, Papp T, Vágvölgyi C. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from Zygomycetes. *Curr Res Technol Edu Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* 2010;2(2):891-896.
- [6] Van den Brink J, de Vries RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91(6):1477-1492.
- [7] Delabona PS, Pirola RDPB, Codima CA, Tremacoldi CR, Rodrigues A, Farinas CS. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenergy* 2012;37:243-250.
- [8] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Advances* 2003;22(3):189–259.
- [9] Correia RTP, Mccue P, Vattem DA, Magalhães MMA, Macêdo GR, Shetty K. Amylase and *Helicobacter pylori* inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bioprocessed by *Rhizopus oligosporus*. *J Food Biochem* 2004;28:419–434.
- [10] FAOSTAT - Food and Agriculture Organization. Agriculture statistics. Pineapple production (2010) by country. Available on: <<http://faostat.fao.org>>. Access in: 20 set. 2012.
- [11] Caetano ACS, Araújo CR, Lima VLAG, Maciel MIS, Melo EA. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. *Ciênc Tecnol Aliment* 2011;31(3):769-775.
- [12] Mandeel QA, Al-Laith AA, Mohamed SA. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21(3):601-607.
- [13] Pitt JI, Hocking AD. A laboratory guide to common Penicillium species. 3. ed. North Ryde: Food science

Australia, 2000. 62 p.

- [14] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microb Genetics Bull* 1956; 13:42-43.
- [15] Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 1977;79(1-2):544-552.
- [16] Matos AP; Reinhardt DH. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. *Acta Hort* 2009;822:25-36.
- [17] Matias MFO, Oliveira EL, Gertrudes E, Magalhães MMA. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. *Braz Arch Biol Technol* 2005;48:143-150.
- [18] Chandra MS, Viswanath B, Reddy BR. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian J Microbiol* 2007;47(4):323-328.
- [19] Castro AM, Carvalho MLA, Leite SG, Pereira NJ. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37(2):151-158.
- [20] Milala MA, Shugaba A, Gidado A, Ene AC, Wafar JA. Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspergillus niger*. *Res J Agr Biol Sci* 2005;1(4):325-328.
- [21] Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, Gomes E, Da-Silva R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzym Microb Technol* 2008;43(6):391-395.
- [22] Gao Z, Hop DV, Yen LTH, Ando K, Hiyamuta S, Kondo R. The production of  $\beta$ -glucosidases by *Fusarium proliferatum* isolated from Vietnamese forest. *AMB Express* 2012;14(2):49.
- [23] Folakemi OP, Pricilla JO, Ibiyemi SA. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nature Science* 2008;6(2):1545-0740.
- [24] Azzaz HH, Murad HA, Kholif AM, Hanfy MA, Gawad AM.H. Optimization of culture conditions affecting fungal cellulase production. *Research J Microbiol* 2012;7(1):23-31.
- [25] Papagianni M, Mattey M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microb Cell Fact* 2006;5(3):1-12.
- [26] Braun S, Vecht-Lifshitz SE. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol* 1991;9(1):63-68.
- [27] Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC. Agitation effects on submerged

- growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2004;26(5):315–323.
- [28] Dhake AB, Patil MB. Production of  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Braz J Microbiol* 2005;36(2):170-176.
- [29] Ang SS, Salleh AB, Bakar FA, Yusof NA, Heng LY. Characteristics of  $\beta$ -glucosidase production by *Paecilomyces variotii* and its potential application in bioassay system for boric acid determination. *Afr J Biotechnol* 2012;11(14):3394-3401.
- [30] Jeya M, Joo AR, Lee KM, Tiwari MK, Kim, SH, Lee JK. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86(5):1473-84.
- [31] Knob A, Carmona EC. Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. *New Biotechnol* 2009;26(1-2):60-67.
- [32] Ramani G, Meera B, Vanitha C, Rao M, Gunasekaran P. Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 167(5):959-72.
- [33] Elyas KK, Mathew A, Sukumaran RK, Ali PP, Sapna K, Kumar SR, Mol KR. Production optimization and properties of beta-glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnol* 2010;27(4):347-51.
- [34] I-Son N, Chen-Wei L, Shuang-Pi C, Jiun-Ly C, Po TC, Chii-Gong T, Su-May Y, Tuan-Hua DH. High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice. *Biores Technol* 2010;101(4):1310-1317.
- [35] Harnpicharnchai P, Champreda V, Sornlake W, Eurwilaichitr L. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi *Periconia* sp. with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expr Purif* 2009;67(2):61-9.
- [36] Pericin D, Jarak M. Production and some characteristics of beta-glucosidase in *Diaporthe (Phomopsis) helianthi*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1995;42(1):29-37.
- [37] Nagayoshi E, Furuta H, Fujii K, Takii Y. Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced from *Aspergillus awamori* MIBA335. *J Biol Macromol* 2011;11(3):69-82.
- [38] Chodi MD, Zimbardi ALRL, Souza FHM, Guimarães LHS, Furriel RPM, Atilio JJ. Production of a xylose-stimulated beta-glucosidase and a cellulose free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var, thermoidea under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28(8):2689-2701.
- [39] Liu D, Zhang R, Yang X, Zhang Z, Song S, Miao Y, Shen Q. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5 and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microb Cell Fact* 2012;11(25)1-15.

- [40] Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Kaur GS, Saini HS. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus sp.* Electron J Biotechnol 2007;10(2):260-270.
- [41] Ferreira Filho EX. Purification and characterization of a beta-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea var. thermoidea*. Can J Microbiol 1996;42(1):1-5.
- [42] Riou C, Salmon JM, Vallier MJ, Günata Z, Barre P. Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol 1998;64(10):3607-3614.
- [43] Daroit DJ, Simonetti A, Hertz PF, Brandelli A. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. J Microbiol Biotechnol 2008;18(5):933-941.
- [44] Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, Piaphukiew J, Whalley AJS, Reynolds CD, Sihanonth P. Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.)Rehm. FEMS Microbiol Lett 2007;270(1):162-170.

### Figure captions

Fig. 1- Time-course of  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* in stationary (a) and shaking condition (b). Culture conditions: Vogel medium with pineapple peel 1% (w/v), at 28 °C and pH 6.5. (■)  $\beta$ -glucosidase activity (U/mL), (●) specific  $\beta$ -glucosidase activity (U/mg of protein).

Fig. 2- Effect of initial pH on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii* (a) (■)  $\beta$ -glucosidase activity (U/mL), (●) specific  $\beta$ -glucosidase activity (U/mg of protein). Effect of temperature on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii*. (■)  $\beta$ -glucosidase activity (U/mL), (●) specific  $\beta$ -glucosidase activity (U/mg of protein). Culture conditions: Vogel medium with 3% pineapple peel (w/v) under stationary condition for 9 days at 28 °C (a) and pH 5.5 (b).

Fig. 3 - Influence of temperature (a) and pH (b) on  $\beta$ -glucosidase activity from *P. miczynskii*. Culture condition: Vogel medium with 3% pineapple peel (w/v) under stationary condition for 9 days, pH 5.5 at 20 °C.  $\beta$ -glucosidase activity was assayed with McIlvaine buffer pH 5.0 (a) and with McIlvaine buffer from pH 3.0 to 7.0, at 65 °C (b).

Fig. 4 - Thermal (a) and pH (b) stability of  $\beta$ -glucosidase activity from *P. miczynskii*. (a) The enzymatic preparation was incubated at (■) 55, (●) 60, (▲) 65 and (◆) 70 °C without substrate. (b) The enzymatic preparation was incubated without substrate with McIlvaine buffer from pH 3.0 to 7.0 at 4 °C for 24 h. In both assays, the residual  $\beta$ -glucosidase activity was assayed with McIlvaine buffer, pH 5.0 at 65 °C.

Table 1: Influence of agro-industrial wastes on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii*

Carbon source (1% w/v)	Intracellular protein (mg)	Enzymatic activity (U/mL)	Especific activity (U/mg protein)
Wheat bran	0.28 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.17 $\pm$ 0.02
Apple peel	0.51 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.00	6.75 $\pm$ 0.51
Malt bagasse	0.11 $\pm$ 0.04	ND	ND
Passion bagasse	0.41 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.00	1.28 $\pm$ 0.06
Orange peel	0.40 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.00	5.82 $\pm$ 0.21
Pineapple peel	0.24 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.01	35.04 $\pm$ 0.86
Sugar-cane bagasse	0.31 $\pm$ 0.01	ND	ND
Corn cob	0.06 $\pm$ 0.01	ND	ND
Rice peel	0.03 $\pm$ 0.01	ND	ND
Soybean peel	0.19 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.00
Sugar-cane strow	0.11 $\pm$ 0.00	ND	ND
Corn straw	0.06 $\pm$ 0.00	ND	ND

Average and standard deviation of two cultures. ND: not detectable.

Table 2: Effect of pineapple peel concentration on  $\beta$ -glucosidase production by *P. miczynskii*

Carbon source (% w/v)	Intracellular protein (mg)	Enzymatic activity (U/mL)	Specific activity (U/mg protein)
0.5	0.15 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	1.08 $\pm$ 0.06
1.0	0.73 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.06	7.99 $\pm$ 0.36
1.5	0.45 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.06	8.15 $\pm$ 1.01
2.0	0.58 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.09	10.96 $\pm$ 1.28
2.5	1.04 $\pm$ 0.10	1.16 $\pm$ 0.06	8.39 $\pm$ 0.27
3.0	0.41 $\pm$ 0.03	1.99 $\pm$ 0.15	12.41 $\pm$ 0.83
3.5	0.90 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.10	8.30 $\pm$ 0.78

Average and standard deviation of two cultures.

Table 3: Effect of different substances on  $\beta$ -glucosidase from *P. miczynskii*

Substance	$\beta$ -Glucosidase activity (%)	
	Concentration	
	2 mM	10 mM
Control	100	100
Cu SO <sub>4</sub>	67.7 $\pm$ 4.3	62.1 $\pm$ 3.5
ZnSO <sub>4</sub>	38.5 $\pm$ 2.5	38.9 $\pm$ 3.1
MnSO <sub>4</sub>	82.1 $\pm$ 3.4	78.8 $\pm$ 4.5
BaCl <sub>2</sub>	78.7 $\pm$ 4.8	53.2 $\pm$ 4.3
CaCl <sub>2</sub>	109.5 $\pm$ 2.9	105.7 $\pm$ 2.3
NH <sub>4</sub> Cl	82.3 $\pm$ 5.6	50.8 $\pm$ 4.3
NaCl	98.0 $\pm$ 2.3	83.4 $\pm$ 3.4
SDS	52.7 $\pm$ 2.3	45.8 $\pm$ 3.3
MgSO <sub>4</sub>	47.2 $\pm$ 2.6	44.1 $\pm$ 3.4
Sodium citrate	70.2 $\pm$ 2.0	54.3 $\pm$ 2.5
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	106.8 $\pm$ 3.3	91.5 $\pm$ 2.0
HgCl <sub>2</sub>	35.3 $\pm$ 1.2	22.1 $\pm$ 0.5
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	97.6 $\pm$ 1.8	64.4 $\pm$ 4.1
EDTA	69.2 $\pm$ 4.3	66.7 $\pm$ 1.1
$\beta$ -mercaptoethanol	122.6 $\pm$ 4.6	108.4 $\pm$ 0.3

Figure 1

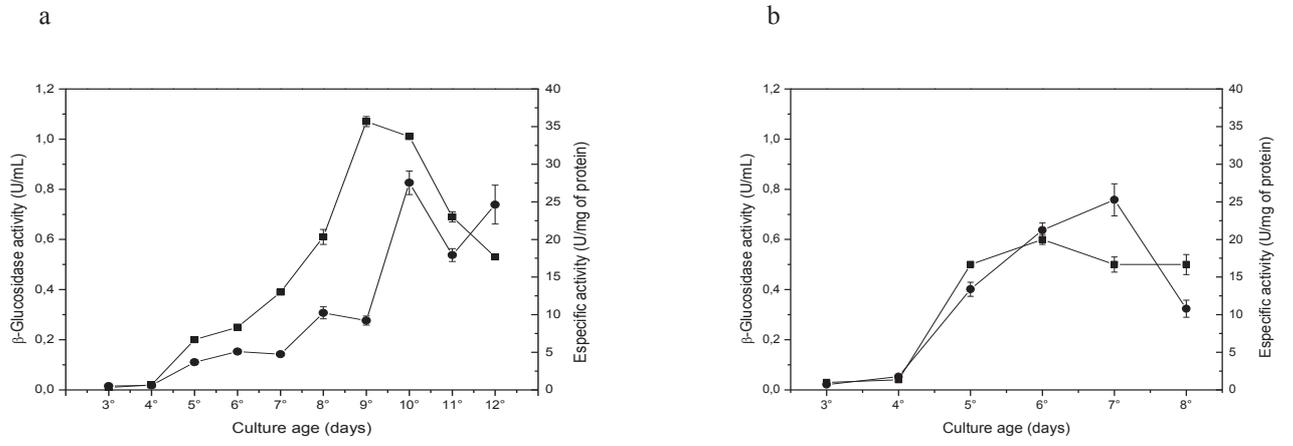


Figure 2

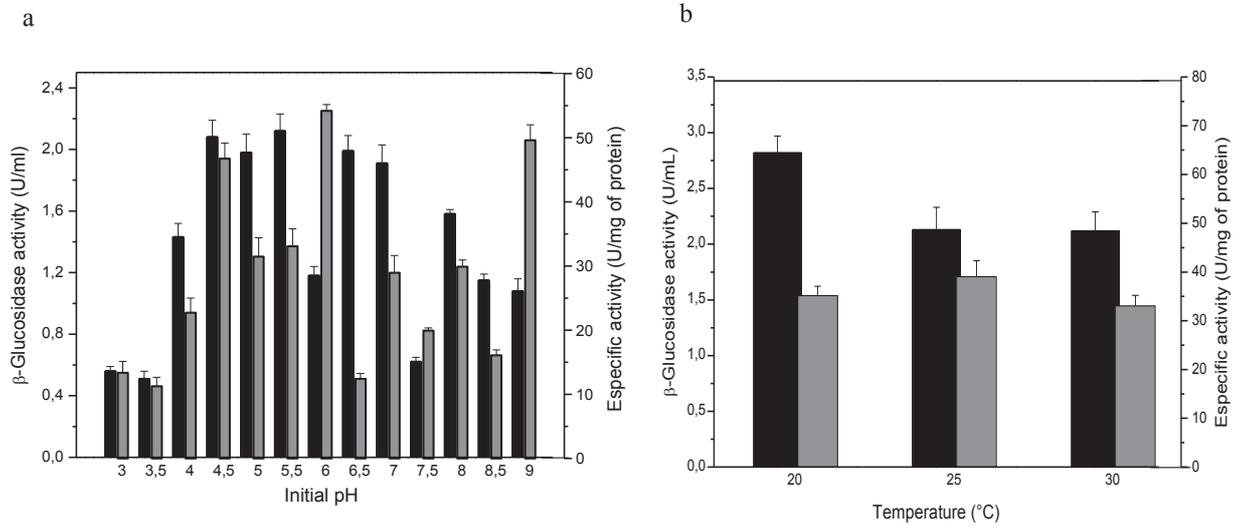


Figure 3

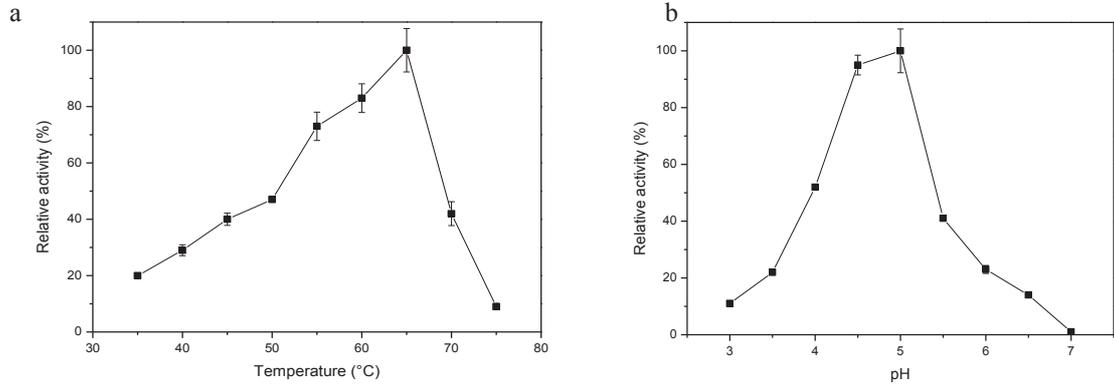
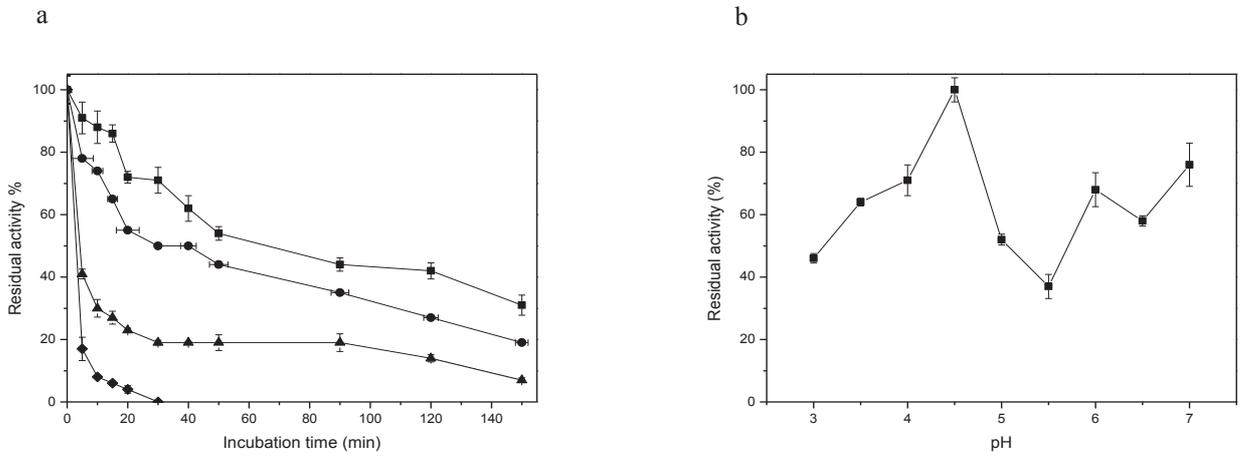


Figure 4



## 6. Considerações finais

O estudo da produção de  $\beta$ -glicosidases pelo fungo *P. miczynskii* mostra-se importante, pelo estabelecimento das condições ótimas de produção e determinação das características bioquímicas das enzimas produzidas por um micro-organismo até então não explorado. Além disso, estes estudos fornecem subsídios para trabalhos posteriores de purificação e caracterização dessas enzimas.

*P. miczynskii* foi capaz de produzir níveis elevados de  $\beta$ -glicosidases. O resíduo lignocelulósico que induziu maiores níveis de atividade foi a casca de abacaxi. As melhores condições estabelecidas para a produção de  $\beta$ -glicosidases por *P. miczynskii* foram cultivo estacionário, durante nove dias em pH 5,5 e 20 °C. A atividade  $\beta$ -glicosidásica presente no filtrado de cultura apresentou temperatura ótima de 65 °C, pH ótimo 4,5-5,0 e  $T_{1/2}$  de 50 e 40 min, a 55 °C e 60 °C, respectivamente. Esta se mostrou estável em valores de pH ácidos e neutros. Dentre as substâncias avaliadas,  $\beta$ -mercaptoetanol foi capaz de ativar esta enzima, assim como  $\text{Co}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . EDTA,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , citrato de sódio,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Ba}^{+2}$  atuaram como inibidores.

A produção de  $\beta$ -glicosidases por *P. miczynskii* utilizando a casca de abacaxi como substrato mostra-se bastante promissora, visto que seus custos de produção podem ser reduzidos, viabilizando, desta forma, maior aplicabilidade destas enzimas. Além disso, o desenvolvimento desta tecnologia de produção poderá não só agregar valor a este resíduo, bem como diminuir, substancialmente, sua deposição no meio ambiente.

## 7. Referências

ADSUL, M.G. et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 62, n. 1, p. 6-10, 2005.

ANDREAUS, J. Uso de celulases na indústria têxtil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA – ENZITEC, 5.; 2002, Brasília. **Anais...** Brasília: UnB, 2002. p. 50.

AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. A cell wall-bound beta-glucosidase from germinated rice: purification and properties. **Phytochemistry**, New York, v. 48, n. 1, p. 49-54, 1998.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, n. 4, 1-12, 2010.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 3, p. 2-16, 2011.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

BADHAN, A.K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 3, p. 504–510, 2007.

BARKAI-GOLAN, R. *Penicillium* mycotoxins. In: RIVKA, G.B.; NACHMAN, P. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. San Diego: Academic Press, 2008.

BEDANI, C.C. **Produção, caracterização e purificação de beta-glicosidasas fúngicas e sua ação sobre a hidrólise de amigdalina, celobiose e *p*-nitrofenil-beta-glucopiranosídeo.** 2010. 88 f Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)–Universidade de Campinas, Campinas-SP, 2010.

BELANCIC, A. et al.  $\beta$ -Glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1453-1459, 2003.

BHAT, M.K.; GAIKWAD, J.S.; MAHESHWARI, R. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, n. 11, p. 2825-2832, 1993.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial  $\beta$ -glucosidasas: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.

BIELY, P. Diversity of microbial endo- $\beta$ -1.4-xylanases. In: MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N. (Eds.). **Applications of enzymes to lignocellulosics**. Washington: **American Chemical Society**, 2003. p. 361-380 a.

BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (Eds.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 879-916 b.

BRAUN, S.; LIFSHITZ, S.E.V. Mycelial morphology and metabolite production. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 63-68, 1991.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. Departamento de Botânica – IBUSP. Disponível em: <<http://mundodacana.blogspot.com.br/2010/08/as-rotas-para-o-etanol-celulosico-no.html>> Acesso em: 02 out. 2012.

CABRERA H.A.P. et al. Evaluation of residual levels of benomyl, methyl parathion, diuron, and vamidothion in pineapple pulp and bagasse (*Smooth cayenne*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 11, p. 5750-5753, 2000.

CARRERA, J.E. Producción y aplicación de enzimas industriales. **Biotecnología em el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Popayán, v. 1, n. 1, p. 9-15, 2003.

CANO, A.; PALET, C. Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 29, n. 1-2, p. 96-105, 2007.

CANTAREL, B.L. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 233-338, 2009.

CHAABOUNI, E.S. et al. Purification and characterization of two low molecular weight endoglucanases produced by *Penicillium occitanis* mutant pol 6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 125, n. 2, p. 99-112, 2005.

CHANDRA, M. et al. Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. **Molecular Biotechnology**. Lucknow, mar. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12033-012-9526-7>>. Acesso em: 3 out. 2012.

CHANG, H.T.; OLLIS, D.F. Extracellular microbial polysaccharides: generalized power law for biopolysaccharides solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, n. 11, p. 2309-2318, 1982.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2010.

CHEN, M. et al. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of a corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 6, p. 444-449, 2010.

CHENG, H.; LI, X.; LIUNGDAH, L.G. Isolation and Properties of an Extracellular 1-Glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 64-70, 1994.

CHODI, M.D. et al. Production of a xylose- stimulated beta-glucosidase and a cellulose free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var, thermoidea under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 2689-2701, 2012.

CHULKIN, A.M.; VAVILOVA, E.A.; BENEVOLENSKII, S.V. Transcriptional regulator of carbon catabolite repression CreA in filamentous fungus. **Molecular Biology**, New York, v. 44, n. 4, p. 677-687, 2010.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte, 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COLLINS, C.M.; MURRAY, P.G.; DENMAN, S. Molecular cloning and expression analysis of two distinct  $\beta$ -glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n.7, p. 840–849, 2007.

COSTA, R. G. et al. Effect of different levels of dehydrated pineapple by-products on intake, digestibility and performance of growing goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 138-143, 2007.

DACERA, D.D.M.; BABEL, S.; PARKPIAN, P. Potential for land application of contaminated sewage sludge treated with fermented liquid from pineapple wastes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 167, n. 1-3, p. 866-872, 2009.

DARLING, D. Plant cell wall structure. **Internet Encyclopedia of Science**. Disponível em: <<http://daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>>. Acesso em: 5 out. 2012.

DAROIT, D.J. **Caracterização de uma beta-glicosidade de *Monoascus purpureus***. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; WENSHENG, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, New South Wales, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DECKER, C.H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. Beta-Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four beta-glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, n. 2, p. 157-163, 2001.

DEVI, M.K. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian Journal of Science and Technology**. Chennai, v.1, n.7, p. 1-6, 2008.

de VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DHAKE, A.B.; PATIL, M.B. Production of  $\beta$ -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 170-176, 2005.

DILLON, A.J.P. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.

DOELLE, H.W; MITCHELL, D.A; ROLZ, C.E. **Solid substrate cultivation**. London: Universidade de Michigan, 1992. 466 p.

DONKOR O.N.; SHAH N.P. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 15-20, 2008.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry wastes celluloses to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996.

ELLAIHAH, P. et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 4, p. 615-620, 2002.

ENZYME TECHNICAL ASSOCIATION. **Enzymes: A primer on use and benefits today and tomorrow**. Washington, DC, jun. 2001. 32 p. Disponível em: <[http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits\\_paper.pdf](http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits_paper.pdf)>. Acesso em: 03 out. 2012.

ESEN A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.)  $\beta$ -glucosidase. **Plant physiology**, Lancaster, v. 98, n. 1, p. 174-182, 1992.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization. Agriculture statistics. **Pineapple production (2010) by country**. Disponível em : <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 set. 2012.

FARINAS, C.S et al. Avaliação de Diferentes Resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22**. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, 2008.

FELLOWS, P. **Tecnología del processado de los alimentos**: Principios y prácticas. Zaragoza: Acribia, S.A., 1994.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Dissertação (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *penicillium* - a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 49, p. 1-173, 2004.

GARGOURI, M. et al. Fungus  $\beta$ -glycosidases: immobilization and use of alkyl- $\beta$  glycoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 29, n. 1-6, p. 89-94, 2004.

GHILDYAL, N.P. et al. Interaction of transport resistences with biochemical reaction in packedBed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 3, p. 253-257, 1994.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982. 56 p.

HEBRAUD, M.; FEVRE, M. Purification and characterization of an aspecific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 10, p. 3164-3169, 1990.

HEIDEMANN, C. et al. Beneficiamento de tecidos de algodão com celulases de *Penicillium echinulatum* e *Acrophialophora nainiana*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Resumo...** São Paulo: USP, 2008.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 7, n. 5, p. 637-644, 1997.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: what have we learned? **Biotechnology Progress**, New York, v. 14, n. 1, p. 3-7, 1998.

IGARASHI, K.; TANI, T.; KAWAI, R.; SAMEJIMA, M.; Family 3  $\beta$ -glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- $\beta$ -D-glucosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 95, n. 6 p. 572-576, 2003.

I-SON, N. et al. High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 4, p. 1310-1317, 2010.

IWASHITA, K. et al. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n. 10, p. 1938-1946, 1998.

JEYA, M. et al. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 5, p. 1473-84, 2010.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

JOVANOVIC, I. et al. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, Hants, v. 16, n. 4, p. 687-697, 2009.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

JURICK, W.M. et al. *Penicillium solitum* produces a polygalacturonase isozyme in decayed Anjou per fruit capable of macerating host tissue in vitro. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 3, p. 604-612, 2012.

KANG, S.W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* Kk2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.

KARNCHANATAT, A. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.)Rehm. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 162-70, 2007.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN, S.  $\alpha$ -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 10, p. 829-832, 2006.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 2, p. 260-270, 2007.

KIMATI, H. Fungos. In: GALLI, F. et al. **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978.

KLEMM, D. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, Weinhei, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KNOB, A.; CARMONA, E.C. Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 1-2, p. 60-67, 2009.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Beta-xylosidase from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 389-407, 2010.

KOOTSTRA, A.M.J. et al. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, n.1, p. 31-45 2009.

KRISCH, J. et al. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from Zygomycetes. Current Research. **Technololy and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, v. 2, n. 2, p. 891-896, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.

KVIEN, I.; TANEM, B. S.; OKSMAN, K. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, n. 6, p. 3160-3165, 2005.

LARRAURI, J.A.; RUPEREZ, P.; CALIXTO, F.S. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 10, p. 4028-4031, 1997.

LEATHERS, T.D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 133-140, 2003.

LEITÃO, A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Health Research**, Abingdon, v. 6, n. 4, p. 1393-1417, 2009.

LEITE, R.S.R. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 43, n. 6 p. 391–395, 2008.

LE TRAON-MASSON, M.P.; PELLERIN, P. Purification and characterization of two  $\beta$ -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 5, p. 374-382, 1998.

LI, Y.K.; LEE, J.A. Cloning and expression of  $\beta$ -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B  $\beta$ -glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 3-4, p. 144-150, 1999.

LIMA, V.M.G et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.

LIU, D. et al. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial Cell Factories**, London, v. 11, n. 25, p. 1-15, 2012.

LUNALVA A.P.S. Efeito do extrato de sementes de *Eugenia malaccensis* (L.) sobre o crescimento micelial dos fungos associados à *Coffea canephora*, *Fusarium* sp e *Penicillium* sp. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 5., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Brasília, D.F., 2007.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulase utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MA, S.J et al. Purification and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Aspergillus glaucus*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 84, p. 19607-19614, 2011.

MAICAS, S.; MATEO, J.J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruits juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 3, p. 322-335, 2005.

MAINOO N.O.K et al. Pilot-scale vermicomposting of pineapple wastes with earthworms native to Accra, Ghana. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 23 p. 5872-5875, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Agroenergia**. Brasília: MAPA, 2006, 118p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 3 out. 2012.

MATTHEWS, A. et al. Lactic acid bacteria as potential source of enzymes for use in vinification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5715-5731, 2004.

MEYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MITCHELL, D.A. **Produção de enzimas em fermentação em estado sólido e a sua recuperação**. In: III Curso Fermentação semi-sólida na obtenção de bioprodutos (cd), Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2002.

MURRAY, P.G. et al. Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (*cbh2*), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* and structure prediction of the gene product. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 301, n. 2, p. 280-286, 2003.

NAGAYOSHI E. et al. Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced from *Aspergillus awamori* MIBA335. **Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 11, n. 3, p. 69-82, 2011.

NCBI- National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy**. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy)>. Acesso em: 5 out. 2012.

NAZIR, A. et al. Regulation of expression of multiple  $\beta$ -glucosidase of *Aspergillus terreus* and their purification and characterization. **Bioresources**, Raleigh, v. 4, n. 1, p. 155-171, 2009.

NIGAM, J.N. Continuous cultivation of the yeast *Candida utilis* at different dilution rates on pineapple cannery waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 115-117, 1999.

NUNES, M.C.N. et al. Environmental conditions encountered during typical consumer retail display affect fruit and vegetable quality and waste. **Journal Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 232-241, 2009.

OKAFOR, P.N. Determination of the hydrolytic activity of *Achatina achatina*  $\beta$ -glucosidase toward some cyanogenic glycosides of some tropical plants. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 5, p. 1579-1582, 2005.

OLIVEIRA, M. M. D. et al. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 565-569, 2005.

ONWUKA, C.F.I.; ADETILOYE, P.O.; AFOLAMI, C. A. Use of household wastes and crop residues in small ruminants feeding in Nigeria. **Small Ruminant Research**, Amsterdam v. 24, n. 3 p. 233-237, 1997.

PAL, S. et al. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungi *Termitomyces clypeatus*. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 2412-2420, 2010.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus miehe*. **Folia Microbiológica**, Praha, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002.

PALLU, A.P.S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com a cana de açúcar**. 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências – Genética e melhoramento de plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2010.

PANDEY, A. et al. **Solid state fermentation in biotechnology**. New Delhi: Asiatech, 2001. 221 p.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphology development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid production as a function of the spore inoculums level. **Microbial Cell Factories**, London, v. 5, n. 3, p. 1-12, 2006.

PARK, S. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, n. 10, p. 2-10, 2010.

PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. A practical approach for identifications based on mycotoxin characters of *Penicillium*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 23, n. 3, p. 155-159, 2006.

PENGTHAMKEERATI, P. et al. Production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* from cassava bagasse and wastewater sludge under solid-state fermentation. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, Hoboken, v. 31, n. 1, p. 122-129, 2012.

PERALTA, R.M. et al. A highly thermostable  $\beta$ -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 291-295, 1997.

PERAZZO, A.N. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus - indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130 f. Tese (Doutorado). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 1999.

PEREIRA, R.E. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol**. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos

Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HANGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 26, n. 2, p. 65-74, 1991.

PERUGINO, G. et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 31-37, 2004.

PETRUCCIOLI, M. et al. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variabile* (P16) in benchtop bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 4, p. 336-339, 1995.

PETRUCCIOLI, M. et al. The linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 302-310, 1996.

PHILIPP, P.; D'ALMEIDA, M.L.O. **Celulose e papel**: tecnologia de fabricação de pasta celulósica. 2 ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 1988. 964 p.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 462 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PITT J. I.; HOCKING A.D. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3 ed. North Ryde: Food science Australia, 2000. 62 p.

POL, D.; LAXMAN, R.S.; RAO M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 49, n. 3, p. 189-94, 2012.

RAMANI, G. et al. Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 167, n. 5, p. 959-72, 2012.

RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Methods in Biotechnology**, Totowa, v. 16, p. 219-233, 2004.

RANADIVE, A.S. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 10, p. 1922-1924, 1992.

REN, P. et al. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 5, p. 419-454, 2001.

RIBEIRO, M.L.L. **Teor de isoflavonas e atividades de  $\beta$ -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da  $\beta$ -glucosidase.** 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 64, p. 3607- 3614, 1998.

RONNENBERG, T.A. et al. Limonoid glucoside  $\beta$ -glucosidase activity in lemon seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 39, n. 6, p. 1305-1307, 1995.

ROSA, M. F. et al. Valorização de Resíduos da Agroindústria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 2., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: SBERA, 2011.

ROWELL, R.M. et al. A. Cell Wall Chemistry. In: ROGER, M.R. (Ed.). **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York: Editora Taylor & Francis Group, 2005. cap. 3, p. 35-74.

SAIBI, W.; AMOURI, B.; GARGOURI, A. Purification and biochemical characterization of a transglucosylating beta-glucosidase of *Stachybotrys* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 77, n. 2, p. 293-300, 2007.

SAMPEDRO, J.; GOSGROVE, D.J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 12, p. 242.1-242.11, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p.185-194, 2009.

SÁNCHEZ-TORRES P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; RAMÓN, D. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin-beta-glucosidase in a wine yeast strain. **Agricultural Biology and Chemistry**, Tokyo, v. 19, n. 46, p. 354-360, 1998.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SANTANA, R.S.M. **Produção de enzimas amilolíticas em fermentação no estado sólido**. 2012. 73p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos - Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SANTOS, S.F.M. et al. Caracterização do resíduo seco do pendúculo de caju para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida. IN: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2005

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. v. 2, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SENHEN, N.T. et al. Cellulase production by *Penicillium achinulatum* on lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, n. 1, p.163-167, 2006.

SHINGANIA, R.R et al. Recent advances in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SILVA, A.D.S. e. **Produção e Caracterização de Enzimas Celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SINGH, P. Microtubule assembly dynamics: an attractive targeted for anticancer drugs. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, London, v. 60, n. 6, p. 368-375, 2008.

SINGHANIA, R.R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SORENSEN, A. **A new highly efficient beta-glucosidase from the novel species, *Aspergillus saccharolyticus***, 2010. 96 f. Dissertação (Ph.D.) - Section for Sustainable Biotechnology, Aalborg University, Copenhagen, 2010.

SRUAMISRI, S. Agricultural wastes as dairy feed in Chiang Mai. **Animal Science Journal**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 335-341, 2007.

SUN, X. et al. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 42, n. 7, p. 560-567, 2008.

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

SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, n. 14, p. 1599-1606, 2005.

SUPPARATPINYO, K. et al. Disseminated *Penicillium marneffe* infection in Southeast Asia. **Lancet**, London, v. 334, n. 8915, p. 110-113, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2004. 722 p. 3. Ed.

TAKII, Y. et al. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348. **Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 5, n. 1, p. 11-16, 2005.

TATE, D.; REYNOLDS, A.G. Validation of a rapid method for measuring  $\beta$  glucosidase activity in fermenting muscat grape musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, California, v. 57, n. 1, p. 60-68, 2006.

TZEAN, S.S. et al., 1994. Disponível em: <[http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal\\_detail.jsp?id=FU200802270002](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802270002)> Acesso em 3 out. 2012.

VÁSQUEZ, M.P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136, n. 12, p. 141-154, 2007.

ZANOELO, F.F.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 240, p. 137-143, 2004.

ZANOELO, F.F. **Caracterização bioquímica das  $\beta$ -glicosidases de *Scytalidium thermophilum***. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2005.

ZHANG, J.; SMITH, K.R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: Measurements, health impacts, and interventions. **Environmental Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 115, n. 6, p. 848–855, 2007.

ZHANG, P.Y.H.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006

YAO, Q et al. Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 11, p. 2799-2805, 2008.

YAZDI, M.T.; WOODWARD, J.R.; RADFORD, A. Cellulase production by *Neurospora crassa*: the enzymes of the complex and their regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 116-119, 1990.

YOON, J.J.; KIM, K-Y.; CHA, C-J. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 46, n. 1, p. 51-55, 2008.

YOSHIOKA, H.; HAYASHIDA, S. Production and purification of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. **Agricultural Biology and Chemistry**, Tokyo, v. 44, n. 12, p. 2817-2824, 1980.

YOUNGCHIM, S.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. Melanization of *Penicillium marneffeii* *in vitro* and *in vivo*. **Microbiology**, New York, v. 151, n. 1, p. 291-299, 2005.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1649, n. 1, p. 74-84, 2003.

WATANABE H.; TOKUDA G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 55, p. 609-632, 2010.

WEBLEY, D.J.; JACKSON, K.L.; MULLINS, J.D. Mycotoxins in food: a review of recent analysis. **Food Australia**, North Sydney, v. 49, n. 8, p. 375-379, 1997.

WEI, Y. et al. Purification and characterization of a novel and unique ginsenoside Rg1-hydrolyzing  $\beta$ -D-Glucosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 43, n. 3 p. 226-231, 2011.

WEN, Z. LIAO, H. CHEN, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, New York, v. 91, n. 1, p. 31-39, 2004.