

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE PELA LINHAGEM DE *ASPERGILLUS NIGER* LBA 02 EM MEIO SEMISSÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, EXTRATO DE LEVEDURA E SAIS, POR MEIO DA FERRAMENTA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

J. A. FIGUEIRA¹, F.F.G. DIAS¹ e H.H. SATO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos
E-mail para contato: joangelotti@gmailcom

RESUMO As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas em aril, amino ou alquil - β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, oligo e dissacarídeos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção da enzima β -glicosidase pela linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 utilizando como substratos os resíduos agroindustriais, casca de maracujá, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, com intuito de minimizar os custos de produção da enzima e estudar o efeito da adição de sais e extrato de levedura no meio semissólido através da ferramenta de planejamento experimental. A adição de bagaço de cana-de-açúcar e de casca de maracujá, no meio contendo farelo de trigo, não resultou em aumento da produção de β -glicosidase indicando que não atuaram como indutores da enzima, nas faixas estudadas. A adição de 0,1% de extrato de levedura e 0,2% de KH_2PO_4 , 0,2% de NH_4NO_3 e 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio semissólido de farelo de trigo, não tiveram efeitos significativos no aumento da produção de β -glicosidase, nos níveis estudados. Na fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 em frascos Erlenmeyer de 500mL foi obtida maior produção de β -glicosidase (44,81 U/g) em meio de cultura composto de 25 g de farelo de trigo e 5,7 mL de água destilada, após 240 h de fermentação a 30°C. A enzima foi aplicada na conversão de isoflavonas glicosiladas de soja (daidzina e genistina) em suas formas agliconas (daidzeína e genisteína), sendo obtida uma taxa de conversão de quase 100% após 30 min. de reação a 50°C.

1. INTRODUÇÃO

As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas em aril, amino ou alquil - β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, e oligo e dissacarídeos, liberando o terminal não redutor (Cairns e Esen, 2010). Nos últimos anos, o interesse na β -glicosidase tem aumentado devido a sua participação nos mais variados processos biotecnológicos, incluindo a aplicação da enzima para formação de compostos de aroma e estabilização de sucos e bebidas, sendo de potencial interesse para a indústria de alimentos e bebidas, para melhoramento das propriedades sensoriais dos produtos (Karnchanatat et al., 2007; Villena, 2007; Palmeri e Spagna, 2007).

A β -glicosidase é utilizada comercialmente para a transformação de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (Matsuura et al., 1989; Park et al., 2001). Estudos revelam que estas isoflavonas agliconas possuem efeitos benéficos à saúde humana (Matsuura et al., 1989; Peterson e Barnes, 1993; Park et al., 2001).

A β -glicosidase pode ser obtida a partir de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia etchellsii*), bactérias (*Brettanomyces bruxellensis*, *Oenococcus oeni* e *Clostridium thermocellum*), fungos mesofílicos (*Trichoderma harzianum* e *Aspergillus* sp.), fungos termofílicos (*Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Sporotrichum thermophile*) e fungos que utilizam hidrocarbonetos (*Cladosporium resinae*) (Grabnitz e Staudenbauer, 1988; Pandey e Mishra, 1997; Iwashita et al., 1998; Van Rensburg et al., 1998; Oh et al., 1999; Maheshwari et al., 2000; Manasfield et al., 2001; Parry et al., 2001; Yun et al., 2001).

O uso da fermentação semissólida tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela fermentação semissólida são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (Holker et al., 2004).

Outra vantagem da fermentação semissólida é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia. Geralmente são utilizados farelos, bagaços, cascas e palhas como materiais viáveis para biotransformação (Rutz et al., 2008). Estes materiais possuem uma estrutura rica em diversos compostos como celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, sendo bem heterogêneo, e podendo ser utilizado como fonte de carbono e energia como também de suporte para crescimento microbiano (Pandey, 2003).

A casca de maracujá é um produto vegetal rico em fibra do tipo solúvel (pectina e mucilagem). Segundo Córdova et al. (2005) a casca de maracujá é constituída de 4,6% de proteínas, 0,3% de extrato etéreo, 26,7% de fibra bruta e 20% de pectina. O maracujá contém β -glicosídeos amigdalina e prunina que podem atuar como indutores da produção de β -glicosidase.

As matérias-primas lignocelulósicas são fontes renováveis provenientes de materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre elas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado. No Brasil um grande volume de biomassa é gerado, sendo a maior parte da biomassa gerada constituída por bagaço de cana-de-açúcar (Castro e Pereira Jr, 2010).

Este trabalho visou o estudo da produção da enzima β -glicosidase por uma linhagem de *Aspergillus* sp. utilizando como fonte de nutrientes resíduos agroindustriais, com intuito de

minimizar os custos de produção da enzima e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Manutenção da cultura

A linhagem do fungo *Aspergillus niger* LBA 02 da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas foi utilizada para a produção de β -glicosidase. O fungo foi cultivado em tubos de meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (PDA) inclinado, durante 3 dias, a 30°C. Após incubação adicionou-se vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas foram mantidas a 5°C.

2.2 Pré-inóculo e fermentação da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 em meio semissólido de farelo de trigo para a produção de β -glicosidase

A cultura da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 cultivada em meio inclinado conforme descrito no item acima, foi espalhada em placas de petri contendo Ágar Batata Dextrose com auxílio de um cotonete de algodão esterilizado, e incubado durante 3 dias a 30°C. Para a fermentação, 15 discos de 10 mm de diâmetro recobertos com a cultura foram transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de meio de cultivo, previamente esterilizado durante 20 minutos a 121°C. Os frascos foram incubados a 30°C durante 5 dias. O meio fermentado foi utilizado para a produção da β -glicosidase extracelular.

2.3 Extração da β -glicosidase

A extração da enzima foi feita adicionando-se 50 mL de água destilada aos frascos Erlenmeyers. Os frascos foram agitados a 150 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro. O filtrado foi utilizado como extrato enzimático bruto de β -glicosidase.

2.4 Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura et al. (1995) com modificações. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio por grama de meio de cultivo semissólido.

2.5 Estudo da produção de β -glicosidase pela linhagem de *A. niger* LBA 02 por planejamento experimental

2.5.1 Estudo dos efeitos da temperatura e da quantidade de inóculo, água destilada, casca de maracujá, extrato de levedura e sais no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por planejamento fatorial fracionado 2⁽⁸⁻⁴⁾

Os parâmetros temperatura, quantidade de pré-inóculo, água adicionada ao meio de fermentação semissólida, casca de maracujá, extrato de levedura e adição dos sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , MgSO_4 para a produção da enzima foram estudados através de planejamento fatorial fracionado 2⁽⁸⁻⁴⁾.

O preparo do meio de cultivo foi realizado pesando-se 25 g de farelo de trigo em um béquer e adicionando-se os componentes estudados nos níveis do planejamento experimental conforme listados na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2⁽⁸⁻⁴⁾

Variável	Unidade	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura	°C	25	30	35
Casca de maracujá	g	12,5	25	37,5
Quantidade de água adicionada	mL	10	20	30
Quantidade de inóculo	Nº discos*	10	15	20
KH_2PO_4	%	0	0,1	0,2
NH_4NO_3	%	0	0,1	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	%	0	0,05	0,1
Extrato de levedura	%	0	0,05	0,1

* Número de discos de 10 mm de diâmetro de Ágar Batata Dextrose recobertos com a cultura de *A. niger* LBA 02.

O meio de cultura foi homogeneizado com bastão de vidro e amostras de 10 g foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL sendo os frascos esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. Os discos de PDA recobertos com o fungo foram adicionados assepticamente aos frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura e em seguida foram incubados na temperatura estabelecida pelo planejamento por 9 dias. A atividade de β -glicosidase foi determinada usando-se o substrato p-NPG como descrito anteriormente.

2.5.2 Estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e da água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2²

Após a seleção das variáveis significativas de acordo com o item acima, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², com combinação entre as variáveis independentes (quantidade de casca de maracujá e água destilada) e seus níveis de concentração conforme Tabela 2.

Os experimentos foram realizados através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta e os dados foram tratados com o auxílio do programa computacional STATISTICA, StatSoft – versão 7.0[®] (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, EUA).

Tabela 2: Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional 2² para o estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Variáveis	Unidades	-1,41	-1	Nível 0	1	1,41
Casca de maracujá ou bagaço de cana de açúcar	G	0	1,8	6,25	10,7	12,5
Quant. água	mL	5	5,7	7,5	9,3	10

2.5.3 Estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2²

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², para avaliação dos efeitos das variáveis independentes: quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada (Tabela 2).

Os experimentos foram realizados através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta e os dados foram tratados com o auxílio do programa computacional STATISTICA, StatSoft – versão 7.0[®] (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, EUA).

2.6 Extração das isoflavonas glicosiladas de soja

As isoflavonas glicosiladas de soja foram obtidas como descrito por Aguiar (2004) com modificações. O sobrenadante foi utilizado como extrato para determinação do teor de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de acordo

com o método proposto por Park et al. (2002). O extrato também foi utilizado na conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre.

2.7 Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre.

Tubos eppendorf contendo amostras de 1 mL de extrato de isoflavonas e 0,1 mL de solução 0,1mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5 foram incubados em banho maria a 50°C, sob agitação. Após intervalos de tempo de 0,5; 3 e 24 h foram retiradas alíquotas para análise da conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas por cromatografia líquida como proposto por Park et al. (2002). O extrato de isoflavonas sem adição da enzima foi utilizado como controle.

2.8 Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência

O teor de isoflavonas foi determinado conforme descrito por Aguiar (2004) com modificações. As concentrações foram expressas em μ g de isoflavonas por g de farelo de soja, em base seca.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo dos efeitos da temperatura e da quantidade de inóculo, água, casca de maracujá, extrato de levedura e sais no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por planejamento fatorial fracionado $2^{(8-4)}$

A Tabela 3 ilustra os efeitos das variáveis independentes na atividade de β -glicosidase. De acordo com a análise dos efeitos, pode-se observar que as variáveis quantidade de casca de maracujá e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram efeitos negativos e significativos na faixa estudada a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Entretanto, a variável independente quantidade de água adicionada foi incluída para um novo planejamento, pois o p -valor estava muito próximo ao limite (considerando confiança de 90%, $p < 0,1$) e a variável $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ não foi incluída, pois já havia sido estudada na concentração zero. A variável independente temperatura apresentou efeito negativo sobre a atividade da β -glicosidase, mas não significativo, sendo fixada no nível (0), na temperatura de 30°C. A variável independente quantidade de inóculo apresentou efeito positivo, mas não significativo, sendo fixada no nível (-1), com inóculo de 10 discos de meio recobertos com o fungo. E os sais (KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e extrato de levedura foram fixados no nível (-1), pois não foram significativos.

Segundo Farinas et al. (2008) a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas é muito promissora, porém devem ser estudados mais pré-tratamentos para reduzir a recalcitrância dos resíduos e suplementação do meio de cultura com fontes de carbono mais facilmente assimiláveis com intuito de serem obtidas melhores atividades.

Tabela 3: Efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para fermentação da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, do planejamento fatorial fracionário 2⁽⁸⁻⁴⁾.

O	Efeito	Erro padrão	t(10)	P
Média	23,00	2,08	11,08	0,000001
Temperatura	-1,31	4,53	-0,29	0,778
Casca de maracujá*	-10,90	4,53	-2,41	0,0368
Quant. de água adicionada	-8,08	4,53	-1,78	0,104
Quant. de inóculo	1,46	4,53	0,32	0,753
KH_2PO_4	1,95	4,53	0,430	0,676
NH_4NO_3	2,06	4,53	0,45	0,658
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *	-12,40	4,53	-2,74	0,021
Extrato de levedura	1,52	4,53	0,34	0,743

*Parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança

3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² - resíduo casca de maracujá

Nenhuma das variáveis estudadas teve efeito significativo na produção de β -glicosidase pela linhagem *A. niger* LBA 02 nos níveis estudados. Nos dois planejamentos, o resíduo casca de maracujá, nas faixas estudadas não induziu a produção da enzima β -glicosidase, já que nos ensaios que continham somente farelo de trigo e água destilada foram obtidos valores de atividades superiores.

3.3 Estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e de água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2²

A Tabela 4 apresenta os valores de t, p e coeficientes de regressão utilizados para a construção do modelo representativo da atividade de β -glicosidase a partir das variáveis estudadas.

Tabela 4: Coeficiente de regressão e desvio padrão no estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p
Média*	27,18	1,64	16,66	<0,001
Bagaço de cana-de-açúcar (x_1) (L)*	-5,99	0,99	-5,99	0,002

Bagaço de cana-de-açúcar (x_1) (Q)	1,76	1,19	1,48	0,198
Água destilada (x_2) (L)*	-2,18	0,99	-2,18	0,080
Água destilada (x_2) (Q)	-2,06	1,19	-1,73	0,143
$x_1 \times x_2$	1,71	1,41	1,22	0,279

*parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$)

L: parâmetro linear; Q: parâmetro quadrático.

Somente os termos lineares para as variáveis bagaço de cana-de-açúcar e quantidade de água foram significativos, sugerindo que outros níveis devem ser estudados.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que 75% da variação observada nos ensaios foi explicada pelo modelo. O F-valor calculado (11,76) para a regressão foi maior que o F – tabelado (3,11) ($p = 0,004$) refletindo a significância estatística do modelo. A falta de ajuste não foi significativa.

A equação abaixo representa o modelo linear para o planejamento experimental:

$$Y_1 = 26,96 - 5,99 x_1 - 2,18 x_2$$

Onde:

Y_1 = Atividade de β -glicosidase (U/g)

x_1 = bagaço de cana-de-açúcar (g)

x_2 = água destilada (mL)

A superfície de resposta e a curva de contorno foram geradas a partir do modelo. A produção de β -glicosidase por *A. niger* LBA 02 foi maior no meio de cultivo contendo 25 g de farelo de trigo, 0 a 1,8 g de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada na faixa de 5 a 7,5 mL. As duas variáveis apresentaram efeito negativo na atividade de β -glicosidase.

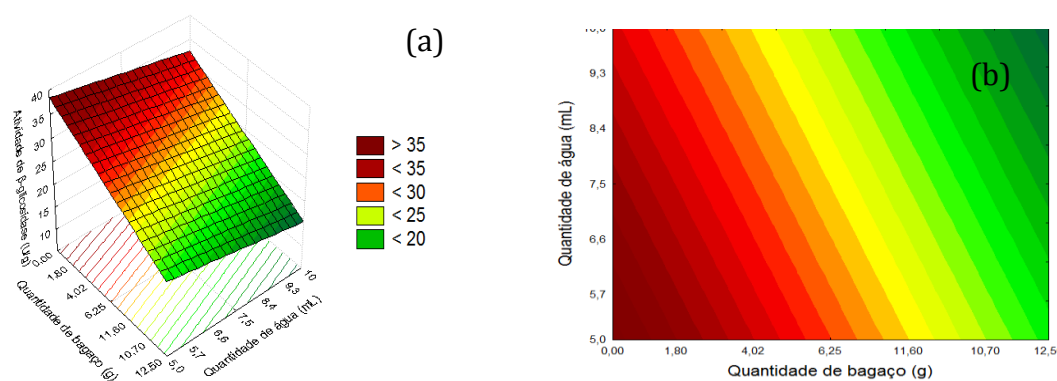


Figura 1: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β -glicosidase (U/g) em função da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (g) e quantidade de água destilada (mL) no meio semissólido de farelo de trigo

3.4 Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja

A Figura 2, ilustra que a β -glicosidase livre de *A. niger* LBA 02 foi capaz de converter quase totalmente as glicosil – isoflavonas daidzina e genistina em suas formas agliconas daidzeína e genisteína, após 0,5 h de reação a 50°C.

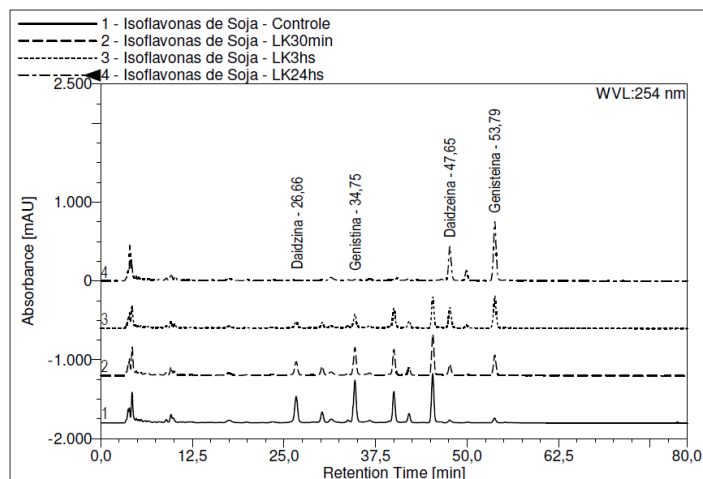


Figura 2: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® nos tempos 0,5, 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente.

No presente trabalho, o teor de daidzeína e genisteína aumentou aproximadamente 2,6 e 11,7 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre, respectivamente, ao final de 24 h.

4 CONCLUSÃO

A linhagem *Aspergillus sp.* LBA 02 foi identificada como *Aspergillus niger*. A identificação foi realizada de acordo com a chave de classificação de Klich e Pitt.

Foi obtida maior atividade de β -glicosidase (44,81 U/g) na fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02 em meio semissólido composto por 25g de farelo de trigo e 5,7 mL de água destilada, após 240 h de fermentação a 30°C.

Os substratos casca de maracujá e bagaço de cana-de-açúcar moído acrescentados no meio de cultura de farelo de trigo não atuaram como indutores para a produção de β -glicosidase. E as variáveis temperatura, quantidade de inóculo, extrato de levedura e adição dos sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio semissólido de farelo de trigo, para fermentação de *A. niger* LBA 02, nos níveis estudados no planejamento experimental fracionário $2^{(8-4)}$ não resultaram em aumento da atividade de β -glicosidase.

β -glicosidase livre obtida de *Aspergillus niger* LBA 02 foi capaz de hidrolisar as isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas após 0,5 h de reação a 50°C.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.L. - Transformações físicas e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine Max L.*) e o efeito na atividade biológica *in vitro*, Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A. – β – glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.67, p. 3389 – 3405, 2010.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* [online], v.33, n.1, p. 181-188, 2010.
- CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; NETO, G.K.; FREITAS, R.J.S. - Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtida por secagem. *Boletim CEPPA*, v.23, n.2, p.221-230, 2005.
- GRABNITZ, F.; STAUDENBAUER, W.L. - Characterization of two β -glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology Letters*, v.10, p. 73-78, 1988.
- HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. - Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 64, p. 175-186, 2004.
- IWASHITA, K.; TODOROKI, K.; KIMURA, H.; SHIMOI, H.; ITO, K. - Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, n. 10, p. 1938-1946, 1998.
- KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPHUKIEW, J.; WHALLEY, A.J.; REYNOLDS, C.D.; SIHANONTH, P. - Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiology Letters*, v. 270, p. 162-170, 2007.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. – Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 461-488, 2000.
- MANASFIELD, A.K.; ZAECKLEIN, B.W.; WHITON, R.S. - Quantification of glucosidase activities in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.53, p.303 -307, 2001.
- MATSUURA M, SASAKI J, MURAO S. - Studies on β -glucosidase that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, p.1623–1627, 1995.
- OH, K.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H.; MATSUOKA, H.- Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1999, v. 63, n. 2, p. 281-287.
- PALMERI, R.; SPAGNA, G. - β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 40, n. 3, p. 382-389, 2007.
- PANDEY, A. – Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.81-84, 2003.
- PANDEY, M.; MISHRA, S. - Expression and characterization of *Pichia etchellsii* β -glucosidase in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 190, n. 1, p. 45-51, 1997.

- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; PACHECO, T.A.R.C.- Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. *Food and Science Industry*, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. - Conversão de malonil-beta-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2002.
- PARRY, N.J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J.V.; BHAT, M.K. - Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journal*, v. 353, p. 117-127, 2001.
- RUTZ, F.; TORERO, A.; FILER, K. - Fermentação em estado sólido: a evolução na produção das enzimas, *Revista Aveworld*, v.29, 2008.
- YUN, S.; JEONG, C.; CHUNG, D. CHOI, H. - Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.