
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TERMODINÂMICA DE
 β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS *Aureobasidium*
pullulans e *Thermoascus aurantiacus*: APLICAÇÃO EM ISOFLAVONAS E
TERPENOS GLICOSILADOS

RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro de 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TERMODINÂMICA DE
 β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS *Aureobasidium*
pullulans e *Thermoascus aurantiacus*: APLICAÇÃO EM ISOFLAVONAS E
TERPENOS GLICOSILADOS

RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro de 2007

547.758 Leite, Rodrigo Simões Ribeiro
L533pu Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de β -glicosidades produzidas pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans*: aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados / Rodrigo Simões Ribeiro Leite. – Rio Claro : [s.n.], 2007
80 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Roberto da Silva

1. Enzimas. 2. Enzimas microbianas. 3. Celulases. 4. Enzimas termoestáveis. 5. Glicoproteínas. 6. Celbiase. I. Título

Dedico:

Aos meus pais Airton e Lucinda, pelo amor, dedicação e incentivo de uma vida inteira.

À minha companheira Rosana, pela paciência, compreensão e apoio nas horas mais difíceis.

À minha irmã Adriana, pelo exemplo de força demonstrado durante toda sua vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela valiosa orientação, incentivo e confiança depositada.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, pelo esclarecimento de dúvidas e inúmeras sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, pelo precioso auxílio na parte analítica deste trabalho.

Aos amigos Heloiza e Hamilton, pelo companheirismo e grande contribuição no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À Rosana, pelo carinho e companheirismo.

À minha irmã Adriana, pela confiança e otimismo.

Aos amigos do laboratório, pelos agradáveis momentos e incentivo: Alexandre, Aline, Ana Flávia, Ana Lúcia, Andréia, Carolina, Caroline, Chang, Dênis, Denise, Érika, Eduardo, Ellen L., Ellen G., Fabiana, Gisele, Lílian, Lívia, Luis Gustavo, Marcelo, Márcia, Maira, Nati, Natália, Paula, Roberto, Rodolfo, Ricardo, Rosangela, Tássia e Tony.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, do Instituto de Biociências de Rio Claro, pela atenção e eficiência.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMO	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUÇÃO	3
IV. REVISÃO DA LITERATURA	5
IV.1. Celulose – Estrutura e Aplicação Biotecnológica.....	5
IV.2. Enzimas celulolíticas.....	6
IV.3. Aplicações industriais da β -glicosidase.....	7
IV.4. Enzimas termofílicas	10
IV.5. Termodinâmica: Conceituação básica	12
IV.6. Purificação de β -glicosidase microbiana	13
IV.7. Características das β -glicosidasas microbianas	17
V. MATERIAL E MÉTODOS	22
V.1. Microrganismos utilizados.....	22
V.2. Produção da enzima por fermentação em estado sólido.....	22
V.3. Inóculo	22
V.4. Extração da enzima	23
V.5. Determinação da atividade de β -glicosidase.....	23
V.6. Determinação quantitativa de proteína.....	24
V.7. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo	
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	24
V.7.1. Concentração do extrato bruto	24
V.7.2. Cromatografia de troca iônica.....	24
V.7.3. Cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50	25
V.8. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25
V.8.1. Concentração do extrato bruto	25
V.8.2. Cromatografia de filtração em gel Sephadex-G100	25
V.8.3. Cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200	26
V.8.4. Cromatografia de troca iônica.....	26
V.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	26
V.9.1. Eletroforese em gel desnaturante.....	26
V.9.2. Eletroforese em gel não desnaturante	27

V.9.3. Determinação da atividade de β -glicosidase em gel de poliacrilamida	27
V.9.4. Desglicosilação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo <i>A. pullulans</i>	28
V. 10. Caracterização das enzimas purificadas.....	28
V.10.1. Determinação do pH ótimo.....	28
V.10.2. Determinação da temperatura ótima.....	28
V.10.3. Determinação do pH de estabilidade	29
V.10.4. Determinação da temperatura de estabilidade	29
V.10.5. Cinética de termoinativação irreversível.....	29
V.10.6. Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	30
V.10.7. Determinação dos parâmetros cinéticos	31
V.10.8. Determinação da especificidade ao substrato	31
V.10.9. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade das enzimas.....	32
V.10.10. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas.....	32
V.11. Aplicação das β -glicosidases em terpenos glicosídeos	32
V.11.1. Extração dos terpenos glicosídeos da uva.....	32
V.11.2. Hidrólise dos terpenos glicosídeos	33
V.11.3. Análise dos produtos de hidrólise por cromatografia gasosa (CG).....	33
V.12. Aplicação das β -glicosidases em isoflavonas glicosiladas	34
V.12.1. Extração das isoflavonas da soja	34
V.12.2. Hidrólise das isoflavonas glicosiladas	34
V.12.3. Análise dos produtos de hidrólise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	35
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
VI.1. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo <i>Thermoascus aurantiacus</i>	36
VI.2. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i>	39
VI.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	42
VI.3. Caracterização das β -glicosidases purificadas	46
VI.3.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade das β -glicosidases purificadas.....	46
VI.3.2. Termoinativação irreversível das enzimas	48

VI.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	52
VI.3.4. Determinação da especificidade ao substrato	54
VI.3.5. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade das enzimas.....	56
VI.3.6. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas.....	58
VI.4. Aplicação das β -glicosidases em terpenos glicosídeos	61
VI.5. Aplicação das β -glicosidases em isoflavonas glicosiladas	65
VII. CONCLUSÕES.....	69
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose do polímero de celulose (STRYER, 1995)	5
Figura 2: Resumo de hidrólise enzimática da molécula de celulose (PALMA-FERNANDES, 2002)	7
Figura 3: (A) Hidrólise Neril β -D- glicosideo a nerol e β -D-glicose (HEMINGWAY, et. al., 1999). (B) Terpenos livres que contribuem na aromatização do vinho (MAICAS e MATEO, 2005)	9
Figura 4: Estruturas das principais isoflavonas encontradas na soja (SONG et al., 1998)	10
Figura 5: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de troca iônica em resina DEAE- Sephadex A-50. (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 5,0; fluxo de 1 ml/min., gradiente salino 0-0,5 M de NaCl)	36
Figura 6: Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida da etapa final de purificação da β -glicosidase do fungo <i>T. aurantiacus</i> . 1. Marcador molecular em kDa, 2. fração coletada da cromatografia de gel filtração com alta atividade de β -glicosidase	38
Figura 7: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 4,0, 0,2 M de NaCl; fluxo de 0,4l/min)	40
Figura 8: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de troca iônica em resina Mono-Q HR 5/50 (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 4,0; fluxo de 1 ml/min., gradiente salino 0-1,0 M de NaCl)	40

- Figura 9:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante, revelação com prata. Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.....42
- Figura 10:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante, revelação com diferentes métodos. **1.** Comassie Blue, **2.** Reativo de Schiff, **3.** Prata. Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.....43
- Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema desnaturante, revelação com prata. **1 e 2.** Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*. **3.** Marcador de peso molecular43
- Figura 12:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante. **1.** Revelação com Prata, **2.** Esculina (atividade β -glicosidase). Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.....44
- Figura 13:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema desnaturante, revelação com comassie blue. **1.** Marcador de peso molecular, **2.** β -glicosidase do *A. pullulans* purificada e desglicosilada. **3.** β -glicosidase do *A. pullulans* purificada não desglicosilada45
- Figura 14:** Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH.....46
- Figura 15:** Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura46
- Figura 16:** Estabilidade enzimática em função da variação do pH.....47
- Figura 17:** Estabilidade enzimática em função da variação da temperatura47

Figura 18: Atividade residual das β -glicosidases brutas em função do tempo de incubação a 80°C	49
Figura 19: Regressão linear do plote de Ln ar (atividade residual) pelo tempo de incubação a 80; 82,5; 85 e 87,5°C, para a determinação do K_d	49
Figura 20: Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das β -glicosidases	50
Figura 21: Gráfico duplo recíproco da velocidade de reação em função da concentração de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. (A) <i>A. pullulans</i> ; (B) <i>T. aurantiacus</i>	53
Figura 22: Efeito da concentração de etanol sobre a atividade das β -glicosidases purificadas	58
Figura 23: Efeito da concentração de glicose sobre a atividade das β -glicosidases purificadas	59
Figura 24: Análise por cromatografia gasosa do produto de hidrólise, dos terpenos glicosídeos, com extrato enzimático bruto. 1. a-Terpineol; 2. Nerol; 3. Geraniol. (A) <i>T. aurantiacus</i> ; (B) <i>A. pullulans</i>	61
Figura 25: Análise por cromatografia gasosa do produto de hidrólise, dos terpenos glicosídeos, com as β -glicosidases purificadas. 1. a-Terpineol; 2. Nerol; 3. Geraniol. (A) <i>T. aurantiacus</i> ; (B) <i>A. pullulans</i>	63
Figura 26: Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de isoflavonas, sem tratamento enzimático. 1. Daidzina; 2. Glicitina; 3. Genistina; 4. Daidzeína; 5. Gliciteína; 6. Genisteína	65

Figura 27: Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de soja hidrolisado. **4.** Daidzeína; **5.** Gliciteína; **6.** Genisteína. **A)** Hidrólise com extrato enzimático bruto do *A. pullulans*; **B)** Hidrólise com β -glicosidase purificada do *A. pullulans*; **C)** Hidrólise com o extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*; **D)** Hidrólise com a β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Resumo dos processos de purificação da β -glicosidase produzida pelo microorganismo <i>Thermoascus aurantiacus</i>	37
Tabela 2: Resumo dos processos de purificação da β -glicosidase produzida pelo microorganismo <i>Aureobasidium pullulans</i>	41
Tabela 3: Resumo dos parâmetros termodinâmicos das β -glicosidases purificadas	51
Tabela 4: Atividade relativa em diferentes substratos das β -glicosidases purificadas	55
Tabela 5: Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade enzimática	57
Tabela 6: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato e inibidor.....	59
Tabela 7: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com o extrato enzimático bruto do <i>T. aurantiacus</i>	62
Tabela 8: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com a β -glicosidase purificada do <i>T. aurantiacus</i>	62
Tabela 9: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com o extrato enzimático bruto do <i>A. pullulans</i>	62
Tabela 10: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com a β -glicosidase purificada do <i>A. pullulans</i>	62

Tabela 11: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pelo extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*67

Tabela 12: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pela β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*67

Tabela 13: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pelo extrato enzimático bruto do *A. pullulans*.....67

Tabela 14: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pela β -glicosidase purificada do *A. pullulans*.....67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Da: Dalton

DTT: ditioneitol

E_a : energia de ativação para desnaturação (kJ mol^{-1})

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

FID: detector de ionização de chama

h : constante de Plank ($11.04 \times 10^{-36} \text{ Jmol}^{-1} \text{ J}$)

k_B : constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

k_d : coeficiente de velocidade de terminativação (min^{-1})

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

pNP α G: p-NP α -D-glicopiranosídeo

pNP β X: p-NP- β -D-xilopiranosídeo

R: constante dos gases ($8.314 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio

T: temperatura absoluta em Kelvin

$t_{(1/2)}$: tempo de meia vida

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano

I. RESUMO

Neste trabalho as β -glicosidases produzidas pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* foram purificadas, caracterizadas termodinamicamente, físico-quimicamente e aplicadas em terpenos e isoflavonas. O processo de purificação da enzima do *T. aurantiacus* apresentou rendimento final de 63,6% e fator de purificação de 46,3 vezes. Após a purificação da enzima do *A. pullulans*, esta apresentou fator de purificação de 35,5 vezes e rendimento de 19%. A β -glicosidase do *T. aurantiacus* apresentou atividade ótima em pH 4,5 a temperatura de 75°C. Esta manteve-se estável na faixa de pH 4,5 a 6,5 e reteve sua atividade original após 1 hora a 70°C. A enzima purificada do *A. pullulans* apresentou maior atividade catalítica nos valores de pH 4,0-4,5 a temperatura de 80°C. A mesma foi estável em ampla faixa de pH 4,0 a 9,5, e reteve sua atividade original após 1 hora a 75°C. A maior termoestabilidade, da enzima produzida pelo microrganismo mesofílico, *A. pullulans*, foi comprovada pela análise dos parâmetros termodinâmicos. A β -glicosidase do *T. aurantiacus* apresentou valores menores de $t_{(1/2)}$, ΔG , ΔH e E_a em todas as temperaturas analisadas. As duas enzimas foram fortemente inibidas por Hg^{+2} e Ag^+ , sugerindo que o grupo tiol (SH) é essencial para atividade das mesmas. O pNP β G foi utilizado para a determinação dos parâmetros cinéticos, os valores de K_m e V_{max} obtidos foram 0,53 mM e 590,8 $\mu\text{mol/ min/mg}$ de proteína para a enzima do *T. aurantiacus*, e, 0,93 mM e 29,9 $\mu\text{mol/ min/mg}$ de proteína para a enzima do *A. pullulans*. A presença de etanol no meio de reação ativou a β -glicosidase do *T. aurantiacus*, indicando atividade glicosil transferase, o mesmo não foi observado para enzima do *A. pullulans*. As duas β -glicosidases atuaram em diferentes substratos glicosídicos, inclusive sobre terpenos e isoflavonas, o que confirma a ampla especificidade das enzimas.

II. ABSTRACT

In this work, β -glucosidases produced by the microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* were purified, thermodynamically and physical-chemically characterized and applied on terpenes and isoflavones. Purification process of the enzyme from *T. aurantiacus* exhibited final yield of 63.6% and purification factor of 46.3-fold. Purification process of the enzyme from *A. pullulans* resulted in 19% yield and purification factor of 35.5-fold. β -glucosidase from *T. aurantiacus* exhibited optimum activity at pH 4.5 and at temperature of 75°C. It remained stable at pH range of 4.5 to 6.5 and maintained its original activity after 1 hour at 70°C. Purified enzyme from *A. pullulans* exhibited a higher catalytic activity in pH values of 4.0-4.5 at an optimum temperature of 80°C. It was stable over a wide pH range, from 4.0 to 9.5, and, maintained its original activity after 1 hour at 75°C. The higher thermal stability of the enzyme produced by the mesophilic microorganism, *A. pullulans*, was confirmed by analysis of the thermodynamic parameters. β -glucosidase from *T. aurantiacus* exhibited lower values for $t_{(1/2)}$, ΔG , ΔH and E_a in all temperatures tested. Both enzymes were strongly inhibited by Hg^{+2} and Ag^+ , suggesting that a thiol group (SH) is essential for their activities. pNP β G was used for the kinetic parameters determination and the values for K_m and V_{max} were 0.53 mM and 590.8 μ mol/ min/mg of protein for the enzyme from *T. aurantiacus*, and, 0.93 mM and 29.9 μ mol/ min/mg of protein for the enzyme from *A. pullulans*. The presence of ethanol in the reaction mixture activated the β -glucosidase from *T. aurantiacus*, indicating glucosyl transferase activity, which was not observed for the enzyme from *A. pullulans*. Both β -glucosidases exhibited activity on different glucosidic substrates, including terpenes and isoflavones, confirming the broad specificity of the enzymes.

III. INTRODUÇÃO

O aumento populacional resulta em uma inevitável necessidade de criarmos novas fontes de alimentos, o que só será possível, com melhor aproveitamento dos recursos naturais (VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000). A celulose é a fonte de carbono renovável mais abundante da Terra, estima-se que todos os dias os vegetais sintetizam 50 kg de celulose para cada ser humano existente no planeta (LEHNINGER, 1990). Nesse sentido, o desenvolvimento de tecnologias para a utilização deste polissacarídeo como fonte de energia é de fundamental importância para a manutenção humana. Os produtos da hidrólise de materiais celulósicos, podem ser utilizados em processos fermentativos para obtenção de produtos alimentícios, combustíveis líquidos ou outras substâncias químicas de interesse econômico (LEITE, 2004).

A conversão da celulose em açúcar pode ser realizada por via ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta uma série de desvantagens como o requerimento adicional de calor, necessidade de equipamentos resistentes à corrosão e a formação de subprodutos indesejáveis. O emprego do método enzimático seria uma alternativa, contudo, ele apresenta problemas de baixa eficiência na degradação da estrutura recalcitrante da celulose na sua forma nativa. Para superar o problema, linhagens microbianas hiperprodutoras de celulases, com maior especificidade pelo substrato têm sido exaustivamente pesquisadas (PALMA-FERNANDEZ, 2002). Desta forma, os estudos das propriedades catalíticas das enzimas produzidas por estes microrganismos, são de fundamental importância para a otimização dos processos celulolíticos, viabilizando a hidrólise enzimática da celulose.

A β -glicosidase é uma importante enzima do complexo celulolítico, sendo responsável pela hidrólise da celobiose a glicose. Com isso, reduz o efeito inibidor da celobiose sobre as outras enzimas celulolíticas, desempenhando o controle da velocidade global da reação de hidrólise celulósica (PARRY et al., 2001). Esta enzima também pode ser aplicada na indústria de alimentos, aumentando a biodisponibilidade dos isoflavonóides no intestino humano, e de bebidas, sendo utilizada para o enriquecimento aromático de sucos e vinhos (LIMA, 2003; VILLENA et al., 2007).

Trabalhos anteriores relatam a produção de β -glicosidases, com características muito interessantes, pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* (HAYASHI et al., 1999; KALOGERIS et al., 2003; LEITE, 2004; SAHA et al., 1994). Visando contribuir na aplicação industrial destas enzimas, este trabalho teve como objetivos principais:

- 1) Purificar as β -glicosidases produzidas pelos microrganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans*.
- 2) Realizar a caracterização físico-química e termodinâmica das β -glicosidases purificadas.
- 3) Avaliar a aplicabilidade das β -glicosidases para a hidrólise de isoflavonas e terpenos glicosilados.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. Celulose – Estrutura e Aplicação Biotecnológica

A parede celular dos vegetais é constituída principalmente por celulose. Este polímero é responsável pela resistência à pressão osmótica observada tanto nas células de frutas e hortaliças, quanto nas de plantas de porte superior, portanto, está intimamente relacionado com suas sustentações (VOET et al., 2000). A celulose é o composto orgânico mais abundante na biosfera, abrangendo mais da metade de todo o carbono orgânico do planeta. Estima-se que 10^{15} Kg de celulose são sintetizados e degradados por ano na Terra (STRYER, 1995). Entretanto, os vertebrados não possuem enzimas capazes de degradar a celulose, por isso, este polissacarídeo apresenta baixo valor nutricional para os seres humanos (CAMPBELL, 2000).

A celulose é um homopolímero constituído por monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Cada molécula de glicose relaciona-se com a seguinte por uma rotação de 180 graus, e o átomo de oxigênio do anel estabelece uma ligação de hidrogênio com o grupamento 3-OH da molécula seguinte (figura 1). A conformação β permite que a celulose forme cadeias retas bem longas. Várias cadeias retas dispostas paralelamente e interligadas por pontes de hidrogênio formam as microfibrilas que são muito resistentes. As fibras de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, sendo que a região amorfa é mais facilmente hidrolisável enzimaticamente (DA-SILVA et al., 1997; STRYER, 1995).

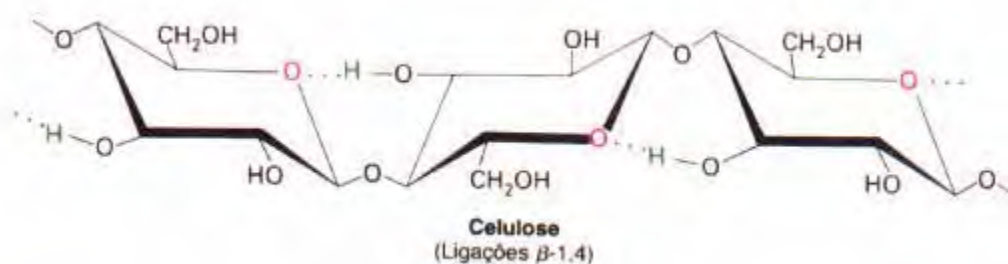


Figura 1: Ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose do polímero de celulose (STRYER, 1995).

O Brasil é um país agro-industrial e destaca-se na produção de soja, milho, cana-de-açúcar, mandioca, café, etc, que geram uma grande quantidade de resíduos ricos em celulose e hemicelulose (SOCCOL e VANDENBERGUE, 2003; VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000). Geralmente estes resíduos são destinados à ração animal, produção de energia térmica ou retornam ao solo. A incorporação no solo para decomposição natural é bastante demorada, o que provoca um acúmulo excessivo e exige grandes áreas nos arredores das indústrias nem sempre disponíveis. A degradação biológica destes compostos por ação catalítica de celulasas e hemicelulasas, resultam na liberação de glicose e outros açúcares fermentáveis, que apresentam aplicabilidade nas indústrias de alimentos e alcooleiras, além de ser uma alternativa para a solução do problema ambiental (AGUIAR e MENEZES, 2002; KALOGERIS et al., 2003).

Atualmente muitos esforços estão sendo realizados no sentido de viabilizar a aplicação industrial das celulasas para estes propósitos. Diversos trabalhos relatam a produção destas enzimas por cultivo microbiano utilizando resíduos agro-industriais (ADSUL et al., 2004; JECU, 2000; KALOGERIS et al., 2003; KANG et al., 2004; LEITE et al., 2007a; PANAGIOTOU et al., 2003; WEN et al., 2005).

IV.2. Enzimas celulolíticas

A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de no mínimo três diferentes enzimas: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (DA-SILVA et al., 1997; PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Endoglucanase ou endo- β -1,4-glucanase (EC. 3.2.1.4) hidrolisa as cadeias ao acaso, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou grau de polimerização.

Exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolase (EC. 3.2.1.91) atua sobre a celulose, removendo unidades de celobiose a partir de extremidades não redutoras da molécula.

β -1,4-glicosidase ou celobiase (EC. 3.2.1.21) hidrolisa celobiose e outras celodextrinas a glicose.

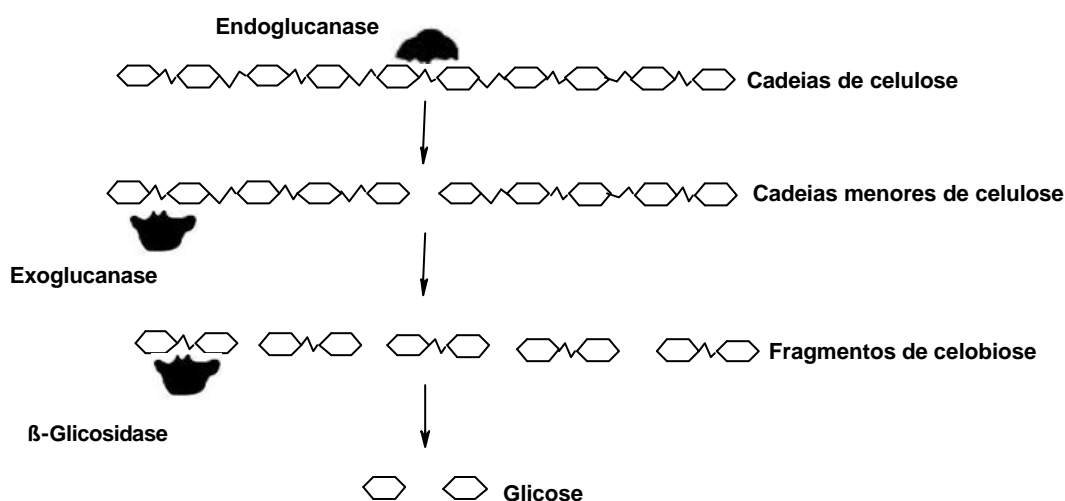


Figura 2: Resumo de hidrólise enzimática da molécula de celulose (PALMA-FERNANDES, 2002).

Todas as três enzimas do complexo sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose (LEITE et al., 2007a; PARRY et al., 2001).

IV.3. Aplicações industriais da β -glicosidase

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

As β -glicosidasas também apresentam aplicabilidade na indústria de sucos e bebidas. As enzimas celulolíticas desestruturam a matriz da parede celular dos vegetais, o que facilita a ruptura de célula vegetal aumentando a extração do suco. Durante o processo de vinificação a adição de celulases auxilia a extração de antocianinas e terpenos, que estão presentes na casca da uva e são os compostos responsáveis pela coloração e aroma do vinho

(TRAON-MASSON e PELLERIN, 1998). As antocianinas são pigmentos de ocorrência natural, que proporcionam a coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies vegetais (COUTINHO, 2002). β -glicosidases com ampla especificidade podem hidrolisar as antocianinas, produzindo antocianidinas (aglicona) e açúcar livre (LEITE et al., 2007b). As antocianidinas apresentam menor pigmentação e solubilidade, característica que permite a remoção das mesmas, por precipitação e filtração. Este efeito pode ser utilizado, na despigmentação de sucos com elevada concentração de antocianinas, ou ainda, na suavização da cor do vinho tinto, para obtenção de vinho rosé (PALMA-FERNANDES, 2002).

A presença de β -glicosidases no processo de vinificação, favorecem a liberação de compostos aromatizantes a partir de seus precursores glicosídicos (figura 3). Tais compostos são coletivamente chamados de terpenos, dentre eles estão nerol, α -terpineol, geraniol, linabol, citronellol e outros, quando glicosilados, apresentam baixa volatilidade e pouco contribuem para o aroma do vinho (BHATIA et al., 2002). As β -glicosidases endógenas da uva não são capazes de atuar durante o processo de vinificação, devido a baixa estabilidade das mesmas (BARBAGALLO et al., 2004). Uma alternativa para o aumento aromático de vinhos, está na utilização de enzimas microbianas que atuem nas condições de tal processo. Desta forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados no sentido de encontrar enzimas que possam ser utilizadas na viticultura (BARBAGALLO et al., 2004; GUEGUEN et al., 1997; HERNÁNDEZ et al., 2003; SPAGNA et al., 2002).

Os precursores aromáticos não voláteis podem apresentar outros açúcares ligados à molécula de glicose, tais como, rhamnose e arabinose, o que dificulta a ação das β -glicosidases isoladamente (VILLENNA et al., 2007). Diferentes trabalhos relatam que uma maior eficiência na liberação dos terpenos voláteis, é obtida pela ação sinérgica de rhamnosidases, arabinosidases e β -glicosidases (BARBAGALLO et al., 2004; BELANCIC et al., 2003; HEMINGWAY et al., 1999).

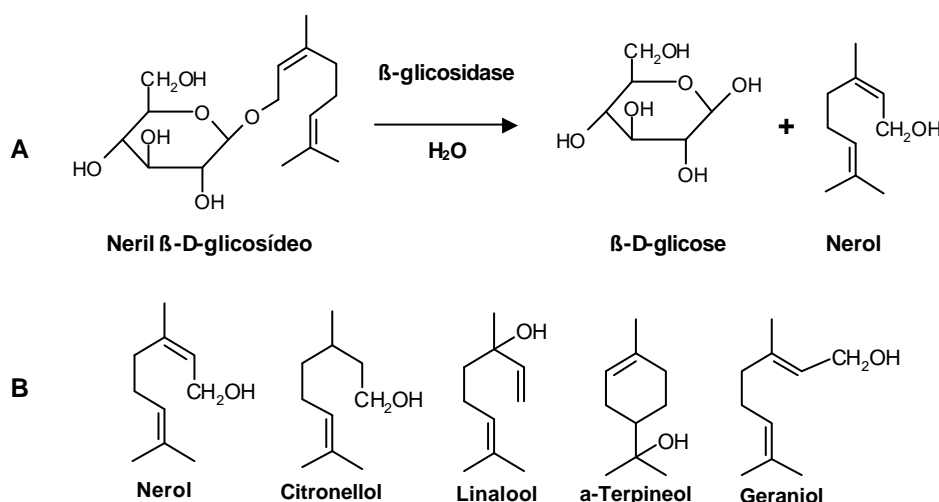


Figura 3: (A) Hidrólise Neril β-D- glicosídeo a nerol e β-D-glicose (HEMINGWAY et. al., 1999). **(B)** Terpenos livres que contribuem na aromatização do vinho (MAICAS e MATEO, 2005).

Os vegetais produzem uma ampla variedade de compostos de baixa massa molecular denominados metabólitos secundários, dentre os quais estão as isoflavonas, que são predominantemente encontradas em leguminosas e especialmente na soja. Nas plantas estes compostos estão principalmente relacionados com as funções de defesa contra o ataque de predadores e patógenos (GENOVESE e LAJOLO, 2001).

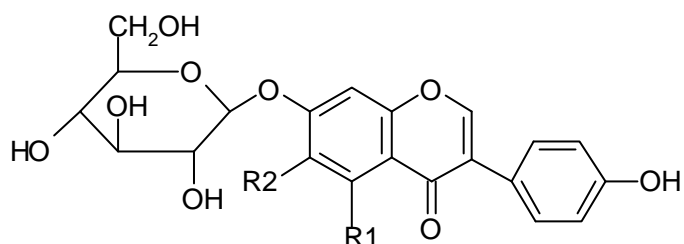
A maior parte das isoflavonas da soja se encontram na forma glicosilada (daidzina, genistina e glicitina), estas moléculas apresentam menor atividade biológica que as suas correspondentes formas desglicosiladas (agliconas), ou seja, daidzeína, genisteína e gliciteína (figura 4). A β-glicosidase hidrolisa as isoflavonas glicosiladas liberando agliconas e glicose, desta forma, potencializa a atividade biológica destes compostos (PARK et al., 2001).

Estudos anteriores revelaram que estas agliconas representam uma alternativa promissora na prevenção e/ou tratamento de muitas doenças hormônios-dependentes, incluindo câncer (mama e próstata), sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e osteoporose (CARRÃO-PANIZZI e BORDINGNON, 2000; LIMA, 2003).

Levando em conta que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de soja no comércio mundial, torna-se de grande interesse nacional o desenvolvimento de tecnologia para agregar valor neste produto.

Isoflavonas Glicosiladas

R1	R2	Composto
H	H	Daidzina
OH	H	Genistina
H	OCH ₃	Glicitina



Isoflavonas Desglicosiladas (agliconas)

R1	R2	Composto
H	H	Daidzeína
OH	H	Genisteína
H	OCH ₃	Gliciteína

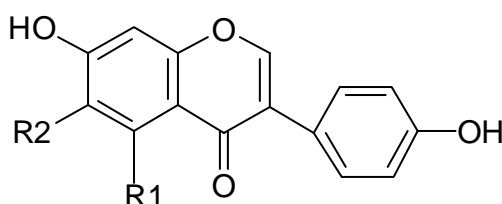


Figura 4: Estruturas das principais isoflavonas encontradas na soja (SONG et al., 1998).

IV.4. Enzimas termofílicas

A temperatura tem uma grande influência no crescimento dos microrganismos. Existem espécies que podem crescer a temperaturas próximas de 5°C e outras que toleram temperatura acima de 100°C. De acordo com a temperatura ótima de crescimento, os microrganismos são divididos em psicrófilos, microrganismos que apresentam melhor crescimento entre 15 e 20°C; mesófilos, microrganismos que crescem melhor em temperaturas que variam de 25 a 40°C; termófilos, microrganismos que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 45 a 60°C; hipertermófilos, microrganismos capazes de crescer em temperaturas acima de 80°C (PELCZAR et al., 1996).

Grande parte das enzimas produzidas pelos microrganismos termofílicos apresentam atividade ótima entre 60 e 80°C, sendo denominadas enzimas termofílicas ou termoenzimas. Geralmente, as enzimas termofílicas apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH, a agentes químicos e toleram exposição a elevadas temperaturas. Estas características são responsáveis pelo grande interesse no estudo dos microrganismos termofílicos e de suas enzimas termoestáveis (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

A estabilidade de uma proteína é resultante de um delicado equilíbrio entre as forças estabilizantes e desestabilizantes, com isso, diversos fatores são capazes de influenciar este equilíbrio, como o número de pontes de hidrogênio e dissulfeto, o grau de enovelamento e hidrofobicidade da molécula, a quantidade de interligações iônicas e outros (BRUINS et al., 2001).

Alguns estudos com enzimas estáveis têm mostrado que geralmente estas diferem muito pouco na seqüência de aminoácidos, quando comparadas com enzimas não estáveis, que catalisam as mesmas reações. Aparentemente, alguns aminoácidos, como alanina, arginina, prolina e leucina, contribuem melhorando a eficiência do empacotamento enzimático, através de maiores interações hidrofóbicas, e aumentam sua rigidez, através da estabilização da hélices e otimização das interações (MARTINS, 2003).

Na verdade não existe um sistema estrutural definitivo que diferencie uma proteína estável de uma não estável, desta forma, pequenas alterações moleculares, como números extras de pontes salinas, ou uma melhor interação hidrofóbica, podem gerar grandes mudanças na estabilidade de uma enzima (GROMIHA, 2001; VIEILLE e ZEIKUS, 1996).

A habilidade das enzimas termofílicas em atuar a elevadas temperaturas permite que os bioprocessos, onde são empregadas, ocorram em temperaturas mais altas, com isso, várias vantagens podem ser inferidas (BRUINS et al., 2001):

- Apresentam alta estabilidade à temperatura e são geralmente, mais resistentes a agentes detergentes e às enzimas proteolíticas.
- Como o processo ocorre em altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos é reduzido.
- Em processos com substratos fluidos, a viscosidade do meio é reduzida em altas temperaturas, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação, permitindo uma maior economia de água e energia.
- Mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando um maior rendimento e menor tempo necessário para os processos.
- A estabilidade em ampla faixa de pH, possibilita a utilização destas enzimas no processamento de diversos tipos de sucos e vegetais.

Devido ao grande potencial da aplicação industrial de enzimas termoestáveis, atualmente tem crescido significativamente o interesse na produção destas. Elas são utilizadas em biologia molecular (Taq polimerase), são adicionadas em detergentes (proteases), são empregadas nas indústrias de processamento de amido (α -amilases, glicose-isomerases), na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (celulases), dentre outros (MARTINS, 2003).

IV. 5. Termodinâmica: Conceituação básica

As vantagens da utilização industrial de enzimas termoestáveis, faz crescer o interesse de obtenção das mesmas. Para isso, diferentes estratégias têm sido utilizadas, tais como: isolamento de microrganismos termofílicos, uso de aditivos solúveis, modificações químicas, imobilização protéica e desenvolvimento de proteínas engenheradas. Neste contexto, além do estudo físico-químico tradicional, a determinação dos parâmetros termodinâmicos é de grande valia; estes fornecem informações de cada etapa do processo de desnaturação protéica, informações estas, que não são obtidas em estudos de efeito de temperatura e tempo de meia vida (LONGO e COMBES, 1999).

Neste tópico do trabalho será realizado uma conceituação básica dos parâmetros termodinâmicos, focado no processo de desnaturação térmica de proteínas.

A energia livre, ΔG , permite medir variações de energia nos sistemas, uma vez que mede a energia disponível para realizar trabalho. Em processos espontâneos, a energia livre do sistema diminui, isto é, ocorre liberação de energia. Neste caso, o ΔG apresenta valores negativos e o processo é chamado de exergônico. Em processos não-espontâneos, é necessário fornecer energia para que a reação ocorra. Neste caso, o ΔG apresenta valores positivos e o processo é chamado de endergônico. Quando o valor de ΔG for igual a zero, significa que o sistema está em equilíbrio (CAMPBELL, 2000). Em processos de desnaturação protéica por temperatura, o valor de ΔG está intimamente relacionado com a estabilidade da proteína. Quanto maior for o ΔG , maior será a estabilidade da enzima (LONGO e COMBES, 1999). Esta afirmação fica bastante clara, se considerarmos que a

desnaturação protéica por temperatura é um processo não-espontâneo, onde é necessário fornecer energia para elevar a proteína do estado nativo para o estado desnaturado. Valores elevados de ΔG , indicam que uma elevada quantidade de energia é necessária para que ocorra o desenovelamento da proteína, o que significa que esta apresenta uma elevada estabilidade estrutural.

A entalpia, ΔH , quantifica o calor trocado durante uma dada reação. Valores positivos de ΔH indicam que a reação absorve calor do sistema e valores negativos indicam que a reação libera calor para o meio (CAMPBELL, 2000). Durante o processo de desnaturação protéica por temperatura, a proteína absorve calor do meio, que ocasionará a ruptura das ligações não-covalentes, resultando em deconformação da molécula e perda da atividade biológica (LUCARINI et al., 2005). Portanto, valores elevados de ΔH refletem elevada estabilidade térmica da proteína, e esta, provavelmente apresenta número elevado de ligações não-covalentes, que estabilizam sua estrutura terciária (ORTEGA et al., 2004).

A entropia, ΔS , está relacionada com a organização do sistema, o aumento no valor de ΔS , representa um aumento na desorganização do sistema (CAMPBELL, 2000). O aumento do valor de ΔS por desnaturação protéica, ocorre devido à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento da proteína (COBOS e ESTRADA, 2003). Portanto, se compararmos os valores de ΔS obtidos para diferentes proteínas, em elevado nível de desorganização (temperaturas desnaturantes), podemos inferir qual apresenta um número maior de cadeias hidrofóbicas e conseqüentemente maior estabilidade estrutural.

Os parâmetros termodinâmicos das β -glicosidases purificadas no presente trabalho foram determinados. Com o objetivo de obter o maior número de informações possíveis a respeito do processo de desnaturação térmica das enzimas.

IV.6. Purificação de β -glicosidase microbiana

Em geral, as proteínas de interesse biotecnológico estão presentes em fluídos naturais tais como: plasma sanguíneo, extratos de tecidos animal ou

vegetal, cultura ou células rompidas de microrganismos. Muitas vezes para possibilitar a utilização destas proteínas na área clínica, ou ainda, no desenvolvimento de pesquisas básicas como caracterização físico-química e estudos cristalográficos, há necessidade de isolamento desta proteína das demais moléculas do meio de origem (HO et al., 2000). As proteínas podem ser purificadas através de métodos que se baseiam em certas propriedades características como solubilidade, tamanho, carga elétrica, polaridade e afinidade por determinados compostos (VOET e VOET, 1995).

A maior dificuldade nos processos de purificação de proteínas, está em encontrar as melhores estratégias que garantam a preservação de todas as características do produto final necessárias para a sua utilização (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002). Para se desenhar um protocolo de purificação, outros fatores também devem ser considerados: facilidade na produção da proteína; escala de manufatura necessária à demanda do produto purificado; eficiência do processo em termos de rendimento e fator de purificação e viabilidade econômica (HO et al., 2000).

Um método de purificação deve conter número de etapas reduzidas. Quanto mais extenso for o processo, maior será o seu custo e menor será a recuperação final da proteína de interesse, inviabilizando-o economicamente. A estratégia ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das propriedades dos contaminantes presentes no extrato bruto (PESSOA e KILIKIAN, 2005). Diversas metodologias de purificação de β -glicosidases microbianas são descritas na literatura.

Uma β -glicosidase da levedura mesofílica *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-12974 foi purificada por Saha et al. (1994) resultando em um fator de purificação de 129 vezes e um rendimento de 3%. Primeiramente a enzima foi precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação, dialisada e posteriormente realizou-se uma cromatografia de troca iônica em CMBio-Gel A agarose. Em seguida, foram realizadas duas cromatografias de filtração em gel, sendo a primeira em Bio-Gel A – 0,5m e a segunda em Sephacryl S-200.

Peralta et al. (1997) obtiveram um rendimento de 15% e um fator de purificação de 38 vezes na purificação da β -glicosidase (forma I) do fungo termofílico *Humicola grisea*. O processo de purificação foi realizado em três etapas: A enzima foi precipitada com 75% de saturação de acetona (– 20°C) e

aplicada em DEAE – celulose (troca iônica). Os autores relatam a presença de atividade de β -glicosidase em dois picos (formas I e II), a forma I não aderiu à resina, esta foi concentrada e aplicada em Bio-Gel P-100.

A β -glicosidase produzida pelo fungo *Xylaria regalis* foi purificada com um rendimento de 4% e um fator de purificação de 38,4 vezes. Wei et al. (1996) precipitaram a enzima com 70% de saturação de sulfato de amônio e aplicaram em Sephadex–G25 para a desalinização da amostra. Posteriormente, realizaram uma cromatografia de troca iônica em SP-Toyopearl 650M e, em seguida, uma filtração em gel Superose–12, obtendo a homogeneidade da enzima.

Hayashi et al. (1999) purificaram uma β -glicosidase produzida pela levedura mesofílica *Aureobasidium sp* ATCC 20524, apresentando um rendimento de 28,9% e um fator de purificação de 53,8 vezes. O extrato bruto foi submetido a duas cromatografias de troca iônica, DEAE – Toyopearl –650S e S-Sepharose Fast Flow. As amostras coletadas foram concentradas por ultrafiltração e, posteriormente, realizaram uma filtração em gel TSK - Toyopearl HW 55F.

Uma β -glicosidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* foi purificada até a homogeneidade por Parry et al. (2001). Eles precipitaram a enzima com 80% de saturação de sulfato de amônio, desalinizaram a amostra por filtração em Bio-Gel P6DG e, posteriormente, realizaram uma cromatografia de troca iônica em DEAE – Sepharose. O maior pico resultante desta etapa foi fracionado por uma cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 44.

Morais et al. (2002) purificaram uma β -glicosidase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, através de duas etapas: precipitaram a enzima com polietilenoglicol (PEG) e, posteriormente, realizaram uma cromatografia de troca iônica em Fractogel EMD-TMAE 650S. Nesta última etapa, o extrato enzimático foi separado em quatro picos, o quarto pico cromatográfico apresentou a β -glicosidase homogênea em SDS-PAGE com um rendimento final de 2%.

Palma-Fernandez et al. (2002) purificaram duas β -glicosidasas produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, após cinco fases de purificação. Primeiramente a enzima foi concentrada por ultrafiltração e então precipitada com 70% de etanol. Posteriormente, foi realizada uma

cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100, seguida de duas cromatografias de troca iônica em Q-Sepharose, obtendo um rendimento de 3,2 e 2,5% e um fator de purificação de 71 e 43 vezes, respectivamente para as enzimas GL-2 e GL-3.

Belancic et al. (2003) purificaram uma β -glicosidase produzida pela levedura *Debaryomyces vanriijae* apresentando um fator de purificação de 79 vezes e um rendimento de 49,9% após três etapas de purificação. A enzima foi concentrada por ultrafiltração, sendo posteriormente, realizada uma cromatografia por filtração em Ultrogel AcA 44 e em seguida, uma cromatografia de troca iônica em DEAE – Sepharose CL-6B.

Duas β -glicosidases produzidas pela levedura *Pichia etchellsii* foram purificadas por Wallecha e Mishra (2003). Estes autores precipitaram a enzima com 40 e 80% de saturação com sulfato de amônio, seguida de uma cromatografia de troca iônica em DEAE – Sepharose, e uma cromatografia em hidroxiapatita, obtendo a homogeneidade das duas enzimas com um rendimento de 17% para a BGL-I e de 7,5% para BGL-II.

Mamma et al. (2004) purificaram duas β -glicosidases intracelulares produzidas pelo microrganismo *Penicillium decumbens*. O extrato enzimático bruto foi concentrado com sulfato de amônio a 80% de saturação e submetido a uma cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose. Nesta etapa, o extrato enzimático foi fracionado em dois picos contendo atividade de β -glicosidase, GI e GII. As amostras foram purificadas separadamente seguindo o mesmo protocolo. Com as enzimas parcialmente purificadas, foi realizada uma cromatografia de troca iônica em DEAE – Toyopearl – 650M e por último uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna t-butyl. Após as quatro etapas de purificação, foram obtidos rendimento final de 11 e 9,36% e fatores de purificação de 5,11 e 8,23 vezes, respectivamente para GI e GII.

Uma β -glicosidase extracelular produzida pela levedura *Debaryomyces pseudopolymorphus* foi purificada por Villena et al. (2006). O extrato enzimático bruto foi concentrado com acetona a 80% de saturação. O precipitado foi resuspenso em tampão citrato 50 mM pH 6,0 e submetido a uma ultrafiltração em membranas de diferentes cortes (50 e 100 kDa). Finalizando o processo foi realizado uma cromatografia de troca iônica em

DEAE-Sepharose no mesmo tampão. O rendimento e o fator de purificação não foram descritos pelos autores.

Turan e Zheng (2005) purificaram uma β -glicosidase intracelular produzida pela levedura *Pichia pastoris*. O extrato enzimático foi previamente fracionado com sulfato de amônio em uma saturação de 55 - 90%. Posteriormente a enzima concentrada foi submetida a uma filtração em gel Sephacryl S-300 e subsequentemente a duas cromatografias de troca iônica, Q-Sepharose (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,3) e CM-Sepharose (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0). O processo descrito apresentou um rendimento de 25,3% e um fator de purificação 99,5 vezes.

IV.7. Características das β -glicosidases microbianas

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

Hayashi et al. (1993) caracterizaram, em sua forma bruta, a enzima β -glicosidase produzida por uma linhagem do microrganismo *Aureobasidium sp.* Esta apresentou maior atividade catalítica em pH 4,0 a uma temperatura de 80°C, após 3 horas de incubação em diversos valores de pH, foi recuperada 90% da atividade original da enzima em uma faixa de pH 3,7-7,8. Após 15 minutos de tratamento, a enzima manteve-se estável a 80°C e reteve 81% de sua atividade a 85°C. Os mesmos autores (1999), relataram a purificação de uma β -glicosidase intracelular produzida pelo mesmo microrganismo com massa molar de 331 kDa; o pH e a temperatura ótima descritos, foram os mesmos da enzima bruta. Entretanto a enzima purificada apresentou-se mais estável em relação ao pH, manteve-se estável numa faixa de pH de 2,2-9,8 e reteve 88% da sua atividade original após ser incubada por 15 minutos a 80°C. A celobiose foi utilizada como substrato para a determinação dos parâmetros cinéticos, onde a V_{max} e o K_m obtidos foram 37,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e

8,85 mM, respectivamente. A enzima também hidrolisou gentiobiase, salicina e p-nitrofenil- β -glicopiranosídeo (pNP β G).

Uma β -glicosidase extracelular produzida em fermentação submersa pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* foi purificada e caracterizada por Saha et al. (1994). A enzima apresentou massa molar de 340 kDa, valor este muito próximo do encontrado por Hayashi et al. (1999). O pH e a temperatura ótima foram 4,5 e 75°C. Os autores relataram que a enzima manteve-se estável em uma faixa de pH 4,0-6,5, retendo 100% de sua atividade original após 1 hora a 60°C e quando a temperatura foi elevada para 80°C, houve uma queda da atividade catalítica para 55% da original. A β -glicosidase purificada hidrolisou pNP β G, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose, celohexaose e celoheptaose. Os valores de K_m e V_{max} obtidos utilizando pNP β G e celobiose como substratos foram de 1,17; 1,0 mM e 897; 800 μ mol/min/mg de proteína, respectivamente.

Palma-Fernandez (2002) estudou a produção, a purificação e a caracterização das β -glicosidases produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*. A enzima bruta apresentou sua melhor atividade nos pH 4,0-4,5 e uma temperatura ótima de 80°C. A estabilidade, em função do pH, ocorreu em pH de 5,0-9,0. A enzima permaneceu estável após 1 hora a 60°C, retendo 72% de sua atividade original quando incubada a 70°C. Durante o processo de purificação o autor obteve duas β -glicosidases puras com massas molares de 175 e 157 kDa, denominando-as de GI-2 e GI-3. Os valores obtidos de pH ótimo foram 4,5 e 4,0. A temperatura ótima de atividade da GI-2 foi de 80°C e da GI-3 foi de 75°C. A enzima GI-2 mostrou-se estável em uma faixa de pH 4,0-9,0 e a GI-3 em uma faixa de 5,5-8,5. Em relação a termoestabilidade, as β -glicosidases GI-2 e GI-3 mantiveram 85 e 80%, respectivamente, da sua atividade original após 1 hora a 70°C, e ambas foram praticamente inativadas a 80°C. O pNP β G foi utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos. Os valores de K_m e V_{max} foram de 1,17; 1,38 mM e 28,0; 22,4 μ mol/min/mg de proteína, respectivamente para GI-2 e GI-3.

Outra β -glicosidase extracelular de 350 kDa produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* foi purificada e caracterizada por Parry et al. (2001). A enzima apresentou sua melhor atividade catalítica em pH 4,5 a uma temperatura de 80°C. Variando os valores de pH, temperatura e tempo de

incubação, estes verificaram que em pH 5,2, a uma temperatura de 70°C, a enzima permaneceu estável após 30 minutos de incubação, quando a temperatura foi aumentada para 80°C, esta praticamente foi inativada. A enzima foi ativa em diferentes substratos pNP glicosídeos (pNPβG, oNPβG, pNPβPCelobiosídeo) e em diferentes sacarídeos (celobiose, β-trehalose e gentiobiose). Os valores de K_m utilizando pNPβG e celobiose como substratos foram respectivamente, 0,1137 e 0,6370 mM.

Peralta et al. (1997) purificaram e caracterizaram uma β-glicosidase do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*, com massa molar de 55 kDa. A enzima apresentou sua melhor atividade em pH 6,0 e em temperaturas de 50 – 60°C, permanecendo estável em uma faixa de pH 4,0-8,0. Em relação a termoestabilidade, não houve redução da sua atividade original após 1 hora a 50°C. O aumento da temperatura para 70°C fez com que esta perdesse 50% de sua atividade. O potencial catalítico para diferentes substratos também foi estudado. A enzima hidrolisou pNPβG, celobiose, p-nitrofenil β-xilopiranosídeo (pNPβX) e CM-celulose, o K_m encontrado para os respectivos substratos foi de 0,12; 3,24; 0,44 mM e 4,57 mg/ml.

Uma β-glicosidase extracelular de 85 kDa produzida pelo fungo mesofílico *Xylaria regalis*, foi purificada e caracterizada por Wei et al. (1996). A enzima apresentou melhor atividade catalítica a uma temperatura de 50°C em pH 5,0, mantendo-se estável em uma faixa de pH que variou 5,0-8,0. Foram recuperadas 78% de sua atividade original, depois da enzima ser incubada, durante 30 minutos a 50°C. Em temperatura de 60°C, a enzima foi rapidamente inativada. A β-glicosidase purificada apresentou ação catalítica em diferentes substratos, tais como, celobiose, gentiobiose, laminaribiose, CM-celulose, maltose, pNPβG e pNPβX. Os parâmetros cinéticos foram calculados com pNPβG, o K_m obtido foi de 1,72 mM e a V_{max} 326 μmol/min/mg de proteína.

Belancic et al. (2003) purificaram e caracterizaram uma β-glicosidase com massa molar de 100 kDa, produzida pela levedura *Debaryomyces vanrijae* em fermentação submersa. Os valores encontrados pelos autores para temperatura e pH ótimos foram 40°C e 5,0, respectivamente. A enzima reteve sua atividade original em uma faixa de pH de 4,0-5,5 e manteve-se estável a 45°C durante 1 hora de incubação, sendo totalmente inativada a temperatura de 70°C. A β-glicosidase foi ativa em diferentes β-glicosídeos, inclusive em

monoterpenos precursores aromáticos. Os valores de K_m e V_{max} obtidos foram 0,77; 57,9 mM e 668; 84,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, para pNP β G e celobiose respectivamente.

Duas β -glicosidases produzidas pela levedura *Pichia etchellsii* foram purificadas e caracterizadas por Wallecha e Mishra (2003). As enzimas denominadas BGLI (186 kDa) e BGLII (340 kDa), apresentaram pH e temperatura ótimos de 6,0 e 50°C, respectivamente, e mantiveram-se estáveis em uma faixa de pH de 4,0-9,0. As enzimas BGLI e BGLII, perderam 50% de suas atividades originais após 15 e 14 min de incubação a 50°C, respectivamente. As duas enzimas apresentaram atividade em diferentes substratos, celobiose, gentiobiose, laminaribiose, salicina e pNP β G, apenas a BGLI foi ativa em pNP β X. Os parâmetros cinéticos para ambas as enzimas foram calculados utilizando pNP β G. A BGLI e BGLII apresentaram o mesmo valor de K_m , (0,33 mM) enquanto a V_{max} foi de 55 para BGLI e 25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para BGLII.

Mamma et al. (2004) purificaram duas β -glicosidases intracelular do fungo *Penicillium decumbens*. A GI é composta por duas sub-unidades de 28 kDa e em seu estado nativo apresenta 56 kDa. A GII apresenta quatro sub-unidades de 115 kDa com uma massa molar total de 460 kDa. O pH ótimo para as duas enzimas foi 7,0. GI e GII apresentaram maior atividade catalítica a 65 e 75°C, respectivamente. Nenhuma das enzimas manteve-se estável quando incubadas por 1 hora a 70°C. As β -glicosidases exibiram especificidade por diferentes substratos, hidrolisando ligações (1,3), (1,4) e (1,6)- β -glicosídeos assim como aril-glicosídeos. Segundo os autores os valores de K_m obtidos com pNP β G foi o mais baixo descrito na literatura, 0,013 e 0,07 mM respectivamente para GI e GII.

Uma β -glicosidase extracelular de massa molar 100 kDa produzida pela levedura *Debaryomyces pseudopolymorphus* em fermentação submersa, foi purificada por Villena et al. (2006). A enzima apresentou melhor atividade catalítica em pH 4,0 a 40°C. Esta foi rapidamente inativada, quando incubada em temperaturas superiores a 40°C. Os autores relatam que a β -glicosidase apresentou uma ampla especificidade para diferentes tipos de substratos β -glicosídeos, e, também foi capaz de hidrolisar maltose. Os valores de K_m e V_{max}

foram 11,9 mM e 70,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando celobiose como substrato.

A β -glicosidase intracelular da levedura *Pichia pastoris* purificada por Turan e Zheng (2005), apresentou massa molar de 275 kDa, sendo composta por 4 subunidades de 70 kDa. O pH e temperatura ótima da enzima foram respectivamente, 7,3 e 40°C. Esta manteve-se estável em uma faixa de pH que variou de 5,5 a 9,5 e perdeu totalmente sua atividade catalítica quando incubada por 10 minutos a 60°C. A enzima apresentou uma ampla especificidade para substratos β -glicosídeos e os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando pNP β G como substratos. O K_m obtido foi igual 0,12 mM e a V_{max} 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

V. MATERIAL E MÉTODOS

V.1. Microrganismos utilizados

Foi utilizado o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756, isolado de madeira em decomposição em Manaus (AM), Brasil (DA-SILVA, 1992), mantido em ágar Sabouraud e a levedura mesofílica *Aureobasidium pullulans* ER-16, isolada de resíduos da indústria de suco de laranja em Catanduva (SP), Brasil, mantida em PDA (*potato dextrose agar-oxid*).

V.2. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido

Sabugo de milho moído foi utilizado como substrato para a produção da enzima, este foi devidamente lavado com água destilada e posteriormente seco em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação se deu em frascos Erlenmeyers de 500 ml, contendo 5 g de substratos umedecidos com 8 ml e 10 ml de solução nutriente para o *Thermoascus aurantiacus* e para o *Aureobasidium pullulans*, respectivamente. A composição da solução nutriente foi de sulfato de amônio 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% (p/v). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação do microrganismo, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 50°C para o *Thermoascus aurantiacus* e para o *Aureobasidium pullulans* a 28°C.

V.3. Inóculo

***Thermoascus aurantiacus*:** O microrganismo foi cultivado em Erlenmeyers de 250 ml contendo 40 ml do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 50°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 ml de solução nutriente (descrita anteriormente) devidamente

autoclavada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 3 ml desta suspensão para os frascos Erlenmeyers contendo sabugo de milho previamente preparado.

Aureobasidium pullulans: A levedura foi cultivada em erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml do meio PDA (*potato dextrose agar-oxid*) inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 ml de solução nutriente devidamente autoclavada. A inoculação da levedura no substrato se deu pela transferência de 5 ml desta suspensão para os frascos Erlenmeyers contendo sabugo de milho previamente preparado.

V.4. Extração da enzima

Após 96 horas de fermentação as enzimas foram extraídas pela adição de 50 ml de água destilada nos meios fermentados e mantidos em agitação por 1 hora. Posteriormente o material foi centrifugado (10.000xg / 20 min) a 4°C e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) utilizado para os ensaios subseqüentemente descritos.

V.5. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ l do filtrado enzimático, 250 μ l de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 e 250 μ l de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos a uma temperatura de 60°C, a reação enzimática foi paralisada com 2 ml de carbonato de sódio 2M e o p-nitrofenol liberado, foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

V.6. Determinação quantitativa de proteína

O teor total de proteína foi quantificado através do método de Lowry et al. (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.

V.7. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *T. aurantiacus*

V.7.1. Concentração do extrato bruto

A concentração da β -glicosidase bruta foi realizada através da precipitação protéica, utilizando sulfato de amônio até 80% de saturação (p/v), esta solução foi deixada em repouso por aproximadamente 12 horas em banho de gelo. Posteriormente, o extrato bruto foi centrifugado a 10.000xg por 20 minutos e o precipitado foi resuspenso em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. A amostra foi dialisada em tampão acetato 20 mM, pH 5,0 durante 48 horas.

V.7.2. Cromatografia de troca iônica

A enzima concentrada foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em resina aniônica DEAE-Sephadex A-50 (Amersham Biosciences) empacotada em coluna X/K 26/40 da Amersham. O sistema foi equilibrado com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. A amostra foi eluída com um fluxo de 1ml/min, seguido de um gradiente salino de 0 a 0,5 M de NaCl em 2 volumes de coluna, frações de 4 ml foram coletadas. Neste processo cromatográfico foi utilizado o equipamento ÄKTÄ purifier, conectado a um coletor de frações Frac 100 (Amersham Biosciences). As amostras que apresentaram atividade de β -glicosidase foram concentradas e desalinizadas por ultrafiltração (centriprep - Amicon), para serem utilizadas em subseqüentes etapas de purificação.

V.7.3. Cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50

A enzima parcialmente purificada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50 (Amersham Biosciences) em coluna aberta XK 26/100, contendo 480 ml de resina. A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0 e posteriormente a enzima foi eluída com um fluxo de 0,3 ml/mim. Amostras de 2,0 ml do líquido eluído foram coletadas, utilizando o coletor de frações Frac 100 (Amersham Biosciences). As amostras que apresentaram atividade de β -glicosidase, foram reunidas e concentradas por ultrafiltração, para serem utilizadas em estudos de caracterização físico-químico da enzima.

V.8. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans*.

V.8.1. Concentração do extrato bruto

O extrato bruto foi concentrado com 65% de saturação de etanol (v/v). Sob leve agitação, o etanol (-18°C) foi lentamente adicionado ao extrato bruto, previamente refrigerado a 5°C. A solução foi mantida por 12 horas em banho de gelo e o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000xg / 20 min) a 4°C. O precipitado foi resuspenso em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e então submetido a duas filtrações em gel com tamanho diferente de poros.

V.8.2. Cromatografia de filtração em gel Sephadex-G100

A amostra concentrada foi submetida a uma filtração em gel Sephadex-G100 (Amersham Biosciences) em coluna aberta XK 26/100, contendo 500 ml de resina. A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e posteriormente a enzima foi eluída com um fluxo de 0,3 ml/mim. Alíquotas de 3,5 ml do líquido eluído foram coletadas e as frações que

apresentaram atividade da enzima foram unidas, concentradas por ultrafiltração e aplicadas em uma filtração em gel Sephacryl S-200.

V.8.3. Cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200

A enzima parcialmente purificada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 em coluna 16/60 pré-empacotada acoplada ao equipamento ÄKTÄ purifier (Amersham Biosciences). A coluna foi equilibrada com o tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,0, contendo 200 mM de NaCl. A amostra foi aplicada com um fluxo constante de 0,4 ml/min. Nesta etapa alíquotas de 2 ml foram coletadas. As frações com atividade de β -glicosidase foram unidas e submetidas a uma cromatografia de troca iônica.

V.8.4. Cromatografia de troca iônica

Para finalizar o processo de purificação da enzima, foi realizada uma cromatografia de polimento em coluna pré-empacotada Mono-Q HR 5/50 (5 x 50 mm) (Amersham Biosciences). A amostra foi eluída no mesmo tampão das etapas anteriores, com um fluxo de 1 ml/min, seguido de um gradiente salino 0,0 a 1,0 M de NaCl em 40 volumes de coluna, amostras de 0,5 ml foram coletadas. O perfil de eluição e o gradiente salino foram realizados com o auxílio do equipamento ÄKTÄ purifier. As frações que apresentaram atividade de β -glicosidase foram unidas para serem utilizadas em estudos de caracterização físico-químico da enzima.

V.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

V.9.1. Eletroforese em gel desnaturante

O grau de purificação das amostras foi analisado através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 5 minutos em tampão de amostra Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8

contendo SDS 2%, glicerol 10%, DTT 0,1M e azul de bromofenol 0,001 M. O gel separador foi preparado na concentração de 8% e o gel concentrador na concentração de 5%. Como marcador de massa molecular foi utilizado o BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, U.S.A.) no qual estão presentes proteínas que variam de 10 a 220 kDa. Para a revelação dos géis foram utilizados os métodos com reagente de prata e comassie Blue R-250.

V.9.2. Eletroforese em gel não desnaturante

A eletroforese não desnaturante foi realizada da mesma forma descrita no **item V.9.1**, entretanto, foram retirados a etapa de fervura, o DTT e o SDS de todo o sistema. Além da revelação com prata e comassie, também foi realizado o método de coloração de carboidratos com o reativo de Schiff, com o objetivo de confirmar a presença de açúcares na estrutura da molécula protéica.

V.9.3. Determinação da atividade de β -glicosidase em gel de poliacrilamida.

Após a corrida eletroforética em sistema não desnaturante (descrito no item anterior), o gel foi colocado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, por 10 minutos em temperatura ambiente, para ocorrer a troca do pH do sistema. Posteriormente, o gel foi imerso no mesmo tampão contendo 0,1% de esculina (Sigma) e 0,03% de cloreto férrico, a 50°C, até o aparecimento de manchas escuras no gel decorrente da atividade de β -glicosidase. A reação foi paralisada com solução de glicose 10%, responsável pela inibição da atividade enzimática (KWON et al., 1994).

V.9.4. Desglicosilação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans*

Para provar a homogeneidade da proteína, foi necessário desglicosilar a enzima, anteriormente a aplicação desta no gel. Para isso, foi utilizado o “Kit Enzimático para Desglicosilação de Proteína” (Sigma), que apresenta cinco enzimas que atuam sinergisticamente em diferentes pontos dos oligossacarídeos e entre as ligações carboidrato - proteína. A desglicosilação foi realizada sob condições desnaturantes, que de acordo com o fabricante, aumenta a eficiência do processo. Após a adição das enzimas e dos reagentes do “Kit”, a amostra foi mantida por 12 horas a 37°C e posteriormente aplicada em SDS-PAGE. Para a revelação do gel foi utilizado comassie Blue R-250.

V. 10. Caracterização das enzimas purificadas

V.10.1. Determinação do pH ótimo

A determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glicosidase foi realizada incubando-se 0,05 ml das enzimas purificadas em 0,25 ml do substrato p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNPG, Sigma), em diferentes valores de pH, foi utilizado tampão McIlvaine 0,1M variando os valores de pH entre 3,0 e 8,0. A atividade enzimática foi quantificada a 60°C e paralisada com carbonato de sódio 2M após 10 minutos de reação.

V.10.2. Determinação da temperatura ótima

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado incubando-se 0,05 ml da β -glicosidase nas mesmas condições descritas para a determinação da atividade, em diferentes temperaturas, variando entre 40 e 90°C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão McIlvaine 0,1M no pH ótimo das respectivas enzimas.

V.10.3. Determinação do pH de estabilidade

A estabilidade das enzimas referente a variação da escala de pH foi analisada através da incubação das enzimas durante 24 horas a uma temperatura de 25°C em tampão, variando a escala de 3,0 a 11,0. Os tampões utilizados foram o McIlvaine 0,1 M (3,0 – 8,0) e o Glicina – Hidróxido de Sódio 0,1 M (8,5 – 11,0). A atividade remanescente das enzimas foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

V.10.4. Determinação da temperatura de estabilidade

A termoestabilidade das enzimas foi estudada incubando-as diluídas em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, durante 1 hora em diferentes temperaturas, que variaram de 35 a 85°C. Posteriormente, a atividade enzimática remanescente foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

V.10.5. Cinética de termoinativação irreversível

As cinéticas foram medidas como descrito por Tomazic e Klibanov (1988), com pequenas modificações. O percurso de tempo de termoinativação das β -glicosidasas foi medido incubando-se as respectivas enzimas (em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0), às temperaturas indicadas, acondicionadas em tubos de vidros pequenos vedados com tampas de borracha. Periodicamente, usando uma seringa com agulha, amostras foram retiradas, esfriadas a 25°C e armazenadas nesta temperatura por 24 h antes de serem analisadas as atividades residuais. Para a enzima do *T. aurantiacus*, as temperaturas de preincubação e os tempos para remoção foram: a 80°C, a cada 6 min até 60 min; a 82,5°C, a cada 1,5 min até 9 min; a 85°C, a cada 1 min até 6 min e a 87,5°C, a cada meio min até 3 min. Para a enzima do *A. pullulans*, as condições foram: a 80°C, a cada 18 min até 180 min; a 82,5°C, a cada 6 min até 36 min; a 85°C, a cada 3 min até 18 min e a 87,5°C, a cada 1,5 min até 9 min. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas foi definido como o

tempo no qual, após incubação a 80°C (ou outra temperatura), a atividade residual da enzima será 50% da atividade original. O $t_{(1/2)}$ também foi determinado de acordo com a equação (1) abaixo. O coeficiente de velocidade de termoinativação (k_d) foi determinado por regressão linear da representação gráfica do logaritmo natural da atividade residual ($\ln a_r$) em função do tempo de preincubação nas temperaturas indicadas, nos quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas, obedecendo cinética de velocidade de primeira ordem. O k_d será o valor absoluto da inclinação da linha de regressão.

V.10.6. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação das β -glicosidases, energia livre, entalpia e entropia foram calculados conforme as seguintes equações:

$$t_{(1/2)} = 0,693 / k_d \quad (1)$$

$$\Delta G = -RT \ln(k_d h / k_B T) \quad (2)$$

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (4)$$

$$E_a = -R (\text{slope}) \quad (5)$$

Onde ΔG é energia livre (kJ mol^{-1}), R é a constante dos gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a correspondente temperatura absoluta (K), k_d é a constante de termoinativação (min^{-1}), h é a constante de Plank ($11.04 \times 10^{-36} \text{ J mol}^{-1}$), k_B é a constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), ΔH é a entalpia (kJ mol^{-1}), E_a é a energia de ativação para desnaturação (kJ mol^{-1}), e ΔS é a entropia (J mol^{-1}). A energia de ativação para desnaturação (E_a) foi determinada por regressão linear da representação gráfica do logaritmo natural de k_d ($\ln k_d$) em função do recíproco das temperaturas absolutas ($1/T$, K) nas

quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas com cinética de velocidade de primeira ordem, de acordo com equação 5.

V.10.7. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando p-NP- β -D-glicopiranosídeo como substrato (0,05–1,5 mM). A atividade foi dosada nas condições ótimas de cada enzima (pH 4,5 a 75°C para a enzima do *T. aurantiacus* e pH 4,0 a 80°C para a enzima do *A. pullulans*). Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos pela representação gráfica do duplo recíproco (Lineweaver-Burk).

V.10.8. Determinação da especificidade ao substrato

A atividade catalítica das enzimas foi testada em diferentes substratos aril-glicosídeos (p-NP- β -D-glicopiranosídeo, p-NP- α -D-glicopiranosídeo, p-NP- β -D-xilopiranosídeo, p-NP- α -D-galactopiranosídeo, p-NP- β -D-mannopiranosídeo e p-NP- α -L-arabinofuranosídeo), dissacarídeos (maltose, lactose, celobiose, laminariobiose e gentiobiose) e polissacarídeos (CM-celulose, avicel, paramilo, pustulano). A concentração dos substratos foi padronizada em 5 mM, 30 mM e 0,5% (p/v), respectivamente para aril-glicosídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. A metodologia utilizada para dosar a atividade das enzimas sobre os substratos aril-glicosídeos foi a mesma descrita anteriormente no **item V. 5**.

A atividade das enzimas sobre os diferentes sacarídeos foi dosada incubando 0,1 ml de enzima, em suas respectivas condições ótimas, por 10 minutos, em 0,4 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M contendo substrato. O açúcar redutor (glicose) proveniente da hidrólise enzimática foi quantificado pelo método glicose-oxidase. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação.

V.10.9. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade das enzimas

O efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade das β -glicosidases purificadas, foi determinado com a adição de Ca^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Cr^{+2} , Al^{+3} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Na^{+} , Ag^{+} , K^{+} , EDTA e SDS, em uma concentração final de 10 mM, nas enzimas purificadas. Após 15 minutos a 25°C, a atividade residual foi quantificada e comparada o controle (enzima sem tratamento).

V.10.10. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas

Para a determinação do efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas, foi utilizado pNP β G (2 mM) como substrato. A atividade enzimática foi quantificada com a adição destes compostos, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0–100 mM de glicose e 0–20% de etanol). Os ensaios foram realizados a 60°C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5.

V.11. Aplicação das β -glicosidases em terpenos glicosídeos

V.11.1. Extração dos terpenos glicosídeos da uva

O processo de extração dos precursores aromáticos glicosídeos seguiu a metodologia descrita por Mateo et al. (1997), com algumas modificações. Nesta etapa do trabalho a uva Isabel (*Vitis labrusca*), variedade mais plantada e empregada na elaboração dos vinhos de mesa em nosso país (MANFROI, 2004), foi utilizada para a obtenção dos terpenos glicosídeos. Os grãos de uva (300g) foram rompidos e a casca separada da polpa. A casca foi batida em liquidificador com 300 ml de água milli-Q e posteriormente centrifugada 10.000xg / 20 min, o sobrenadante (extrato da casca) foi utilizado nas etapas seguintes.

O extrato de casca (5 ml) foi eluído por um cartucho de C₁₈ fase reversa, Supelco C-18 1g/6ml, (previamente ativado com 5 ml de metanol seguido de 15 ml de água), após a total eluição do extrato de casca, o cartucho foi lavado com 10 ml de água milli-Q, seguido de 5 ml de diclorometano. Os precursores aromáticos glicosídeos foram eluídos com 5 ml de metanol. Este processo foi repetido várias vezes para a obtenção de um maior volume. A amostra extraída (120 ml) foi completamente seca por rotaevaporação a 40°C, os compostos não volatilizados foram resuspendidos em 30 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 4,5 e utilizados como substrato para a ação das enzimas.

V.11.2. Hidrólise dos terpenos glicosídeos

A hidrólise dos terpenos ocorreu no interior de pequenos frascos de vidro, vedados com tampas de borracha, contendo 1,2 ml de terpeno extraído e 0,3 ml de enzima, mantidos a 60°C por 24 horas. Os ensaios foram realizados com os extratos enzimáticos brutos e com as enzimas purificadas, sendo adicionadas 0,5 U de β -glicosidase em cada tubo de hidrólise. O hidrolisado foi comparado com diferentes controles (substrato mais tampão e substrato mais enzima desnaturada por temperatura), para termos certeza que o aparecimento de novos compostos foi resultante da ação enzimática.

V.11.3. Análise dos produtos de hidrólise por cromatografia gasosa (CG)

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard (HP) 5890 equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida HP-FFAP 25 m x 0,2 mm x 0,3 μ m. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1 ml/min, a razão de split foi 1:10 e a temperatura do detector e do injetor igual a 250°C.

Programação térmica do forno: Nos 3 primeiros minutos o forno manteve-se a 70°C, posteriormente a temperatura foi elevada a 180°C a 3,8°C/min e para finalizar foi aumentada até 230°C a 15°C/min.

As amostras foram injetadas por “*Head Space*” estático com o auxílio de uma fibra de adsorção (Supelco – polidimetilsiloxano com espessura de 100 µm). Anteriormente a injeção no cromatógrafo, as amostras foram mantidas por 40 minutos a 50°C, com o objetivo de volatilizar os terpenos desglicosilados, após este período a fibra foi inserida nos frascos e mantida por 5 minutos, posteriormente esta foi exposta no interior do injetor. Os terpenos voláteis (desglicosilados) foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos respectivos padrões (Sigma-Aldrich), injetados nas mesmas condições cromatográficas em que foram realizadas as análises.

V.12. Aplicação das β-glicosidases em isoflavonas glicosiladas

V.12.1. Extração das isoflavonas da soja

Para a extração das isoflavonas 1 kg de soja em grãos foram batidas em liquidificador e passadas por uma peneira de 1,41 mm. A farinha de soja (200g) foi desengordurada pela adição de 400 ml de n-hexano, mantido em constante agitação por 30 minutos a 25°C. Após centrifugação (10.000xg / 20 min), a farinha de soja desengordurada foi seca a temperatura ambiente (LIMA, 2003). As isoflavonas foram extraídas pela adição de 500 ml de metanol 80% em 50 g de farinha de soja desengordurada, mantido em agitação constante por 1 hora a temperatura ambiente (GENOVESE e LAJOLO, 2001). As partículas em suspensão foram separadas do extrato metanólico por centrifugação (10.000xg / 20 min), 300 ml deste extrato foi concentrado, por rotaevaporação a 35°C, para aproximadamente 10 ml. O volume do extrato concentrado foi completado para 50 ml com tampão acetato pH 4,5 com uma molaridade final de 0,1M. Este foi usado como substrato para a hidrólise das isoflavonas pelas enzimas.

V.12.2. Hidrólise das isoflavonas glicosiladas

A hidrólise das isoflavonas ocorreu no interior de pequenos frascos de vidro, vedados com tampas de borrachas, contendo 1,2 ml de isoflavona

extraída e 0,3 ml de enzima, mantidos a 60°C por 24 horas. Os ensaios foram realizados com os extratos enzimáticos brutos e com as enzimas purificadas, sendo adicionadas 0,5 U de β -glicosidase em cada tubo de hidrólise. O hidrolisado foi comparado com diferentes controles (substrato mais tampão e substrato mais enzima desnaturada por temperatura), para termos certeza que o aparecimento de novos compostos foi resultante da ação enzimática.

V.12.3. Análise dos produtos de hidrólise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a análise do produto de hidrólise enzimática foi utilizado o cromatógrafo Dionex equipado com bomba binária P-680, detector de arranjo de diodos (UVD 340U) e coluna de fases reversa Sephasil Peptide C₁₈ de 4,6 X 250 mm, 5 μ m (Pharmacia Biotech). Como fase móvel foi utilizado ácido acético 0,1% em água (A) e ácido acético 0,1% em acetonitrila (B) com um fluxo de 0,8 ml/min. A coluna foi inicialmente equilibrada com 0% de B, após a injeção de 20 μ l de amostra, a concentração de B foi elevada para 40% em 30 minutos, nos 5 minutos seguintes a concentração de B subiu de 40 para 100%, mantendo-se constante por 1,5 minutos, posteriormente desceu para 0%, finalizando a análise com 40 minutos. O processo cromatográfico foi monitorado com comprimento de onda de 260 nm. As isoflavonas foram identificadas pelo tempo de retenção e comparação do espectro de absorção dos respectivos padrões (Sigma-Aldrich), injetados nas mesmas condições cromatográficas em que foram realizadas as análises.

Toda a parte analítica deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Físico-Química, IBILCE – UNESP – São José do Rio Preto – SP, em colaboração com o Prof. Dr. Maurício Boscolo.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo

Themoascus aurantiacus

Uma β -glicosidase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* foi purificada a homogeneidade. O extrato enzimático bruto foi inicialmente concentrado por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. O precipitado foi separado por centrifugação e resuspendido em tampão acetato 20 mM, pH 5,0. A amostra foi desalinizada por diálise no mesmo tampão. Esta etapa apresentou um rendimento final de 91,5% e um fator de purificação de 2,3 vezes (tabela1).

A amostra concentrada foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex A-50, sendo fracionada em quatro picos de proteína. Foi detectada a presença de β -glicosidase nas frações coletadas durante a eluição do quarto pico cromatográfico. O segundo pico protéico apresentou uma alta atividade de xilanase (figura 5), enzima cujo microrganismo é um dos maiores produtores descrito na literatura (LEITE, 2004, PALMA-FERNANDEZ, 2002). A cromatografia de troca iônica apresentou um rendimento final de 75,9% e um fator de purificação de 9,4 (tabela 1). As amostras com atividade de β -glicosidase foram unidas e concentradas por ultrafiltração, para posteriormente serem submetidas a um outro processo cromatográfico.

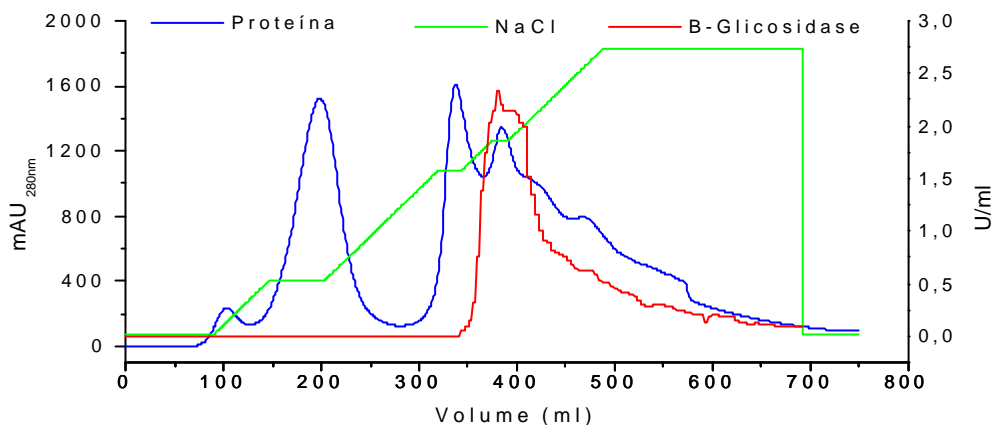


Figura 5: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de troca iônica em resina DEAE- Sephadex A-50. (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 5,0; fluxo de 1 ml/min., gradiente salino 0-0,5 M de NaCl).

A enzima parcialmente purificada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50 (Pharmacia Biotech, Sweden), as frações coletadas entre o volume 170 e 190 ml de eluição, apresentaram atividade de β -glicosidase. Estas frações foram unidas, concentradas e após análise por SDS-PAGE, constatou-se a homogeneidade protéica (figura 6). O processo de purificação da enzima apresentou um rendimento final de 63,6% e um fator de purificação 46,3 vezes, atingindo uma atividade específica de 104,7 U/mg (tabela 1).

Tabela 1: Resumo dos processos de purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Thermoascus aurantiacus*.

	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	119,39	2,26	100	1
concentração (NH₄)₂SO₄	109,25	5,2	91,5	2,3
DEAE-Sephadex A-50	90,68	21,37	75,9	9,4
Sephadex G-50	75,96	104,71	63,6	46,3

Os resultados de purificação obtidos no presente trabalho apresentam um excelente rendimento e um considerável fator de purificação, quando comparados a trabalhos anteriores. Palma-Fernandez et al. (2002) purificaram duas β -glicosidases (GI-2 e GI-3) do fungo *Thermoascus aurantiacus*, após a realização de cinco etapas de purificação, os autores relatam um rendimento de 3,2 e 2,5% e um fator de purificação 71 e 43 vezes, respectivamente para as enzimas GI-2 e GI-3. Belancic et al. (2003) purificaram uma β -glicosidase produzida pela levedura *Debaryomyces vanriijiae* apresentando um fator de purificação de 79 vezes e um rendimento de 49,9%, após três etapas de purificação. Uma β -glicosidase do fungo *Pleurotus ostreatus* foi purificada por Morais et al. (2002), após duas etapas cromatográficas, com um rendimento final de 2%. Mamma et al. (2004) relatam a purificação de duas β -glicosidases do fungo *Penicillium decumbens*, obtendo

como rendimento final 11 e 9,36% e um fator de purificação de 5,11 e 8,23 vezes, para as enzimas GI e GII, respectivamente.

Análises realizadas por eletroforese (SDS-PAGE) após a conclusão dos processos cromatográficos, possibilitaram a observação de uma única banda protéica demonstrando que uma β -glicosidase foi purificada. A enzima apresentou massa molar próxima de 120 kDa (figura 6).



Figura 6: Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida da etapa final de purificação da β -glicosidase do fungo *T. aurantiacus*. 1. Marcador molecular em kDa, 2. fração coletada da cromatografia de gel filtração com alta atividade de β -glicosidase.

Trabalhos anteriores relatam o isolamento de β -glicosidases com massas molares próximas a encontrada no presente trabalho. A enzima purificada por Belancic et al. (2003), da levedura *Debaryomyces vanriijiae*, apresentou massa molar de 100 kDa. Palma-Fernandez et al. (2002) purificaram duas β -glicosidases produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, apresentando massas molares de 175 e 157 kDa para GI-2 e GI-3, respectivamente. Parry et al. (2001) purificaram uma β -glicosidase do fungo *Thermoascus aurantiacus* com massa molar de 350 kDa. Quando comparamos os dados obtidos no presente trabalho com os descritos pela literatura, podemos concluir que o microrganismo *Thermoascus aurantiacus*

apresenta variabilidade genética que resulta na síntese de diferentes isoformas de β -glicosidase.

VI.2. Purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans*

O extrato enzimático bruto foi concentrado com diferentes saturações de etanol, 50%, 65%, 75% e 80% (v/v). A saturação de 65% apresentou uma recuperação de 80,2% da enzima e um elevado fator de purificação, 5,3 vezes (tabela 2). Definindo-a como primeira etapa do processo de purificação desta proteína.

Após a precipitação protéica, a β -glicosidase presente na amostra foi tentativamente isolada em diferentes resinas de troca iônica, com diferentes valores de pH (4,0; 5,5 e 7,4). No entanto, não obtivemos em nenhuma das condições testadas uma resolução satisfatória. Devido a isso, foram realizadas sequencialmente, diferentes estratégias de separação baseadas na massa molecular, e, finalizando o processo de purificação, utilizou-se uma cromatografia de troca iônica de alta resolução.

A enzima concentrada foi submetida a uma filtração em gel Sephadex G-100, que resultou em um rendimento de 48,1% e um fator de 9,3 vezes. Posteriormente a enzima foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200. O cromatograma gerado pelo equipamento ÄKTÄ purifier, demonstrou a eluição de apenas um pico protéico, que coincidiu com a atividade de β -glicosidase (figura 7). O não aparecimento de outros picos protéicos durante esta etapa, provavelmente está relacionado com a etapa anterior, onde a grande maioria das proteínas de baixa massa molar foram separadas da enzima. No entanto, por eletroforese foi possível observar eficiência na filtração em Sephacryl S-200, eficiência esta, confirmada pelo aumento do fator de purificação observado na tabela 2.

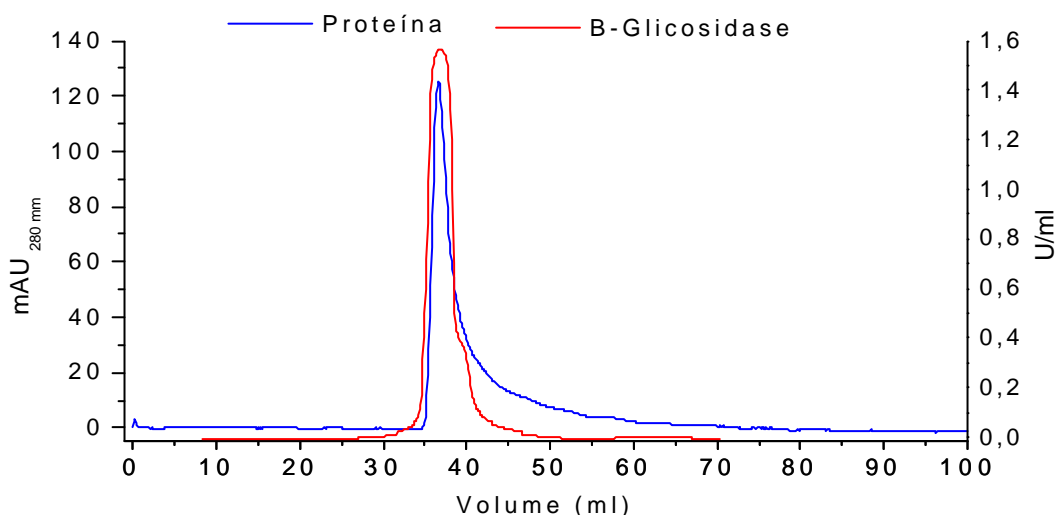


Figura 7: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 4,0, 0,2 M de NaCl; fluxo de 0,4 ml/min).

Para finalizar o processo de purificação, a enzima foi submetida a uma cromatografia de polimento em resina aniônica Mono-Q HR 5/50. Nesta etapa a amostra foi fracionada em três picos protéicos, sendo o primeiro eluído anteriormente ao gradiente salino. Somente o terceiro pico apresentou atividade da enzima. As frações correspondentes a este pico foram juntadas e armazenadas para a utilização nas futuras etapas do trabalho (figura 8).

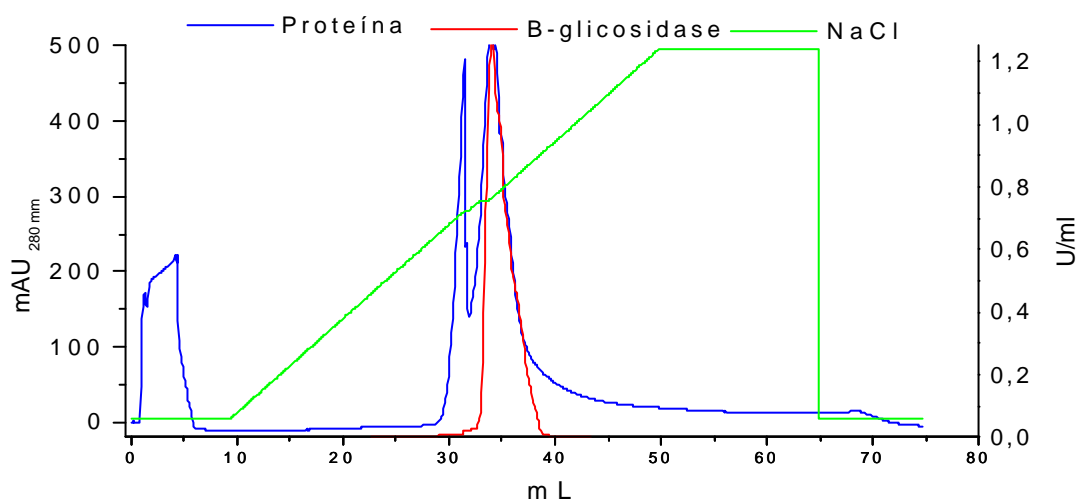


Figura 8: Perfil de eluição da β -glicosidase em cromatografia de troca iônica em resina Mono-Q HR 5/50 (Sistema AKTÄ Purifier; tampão de eluição acetato 20 mM, pH 4,0; fluxo de 1 ml/min., gradiente salino 0-1,0 M de NaCl).

O processo de purificação apresentou um rendimento final de 19%, e, a atividade específica que inicialmente era de 0,794 U/mg, foi aumentada para 28,2 U/mg, refletindo um fator de purificação de 35,5 vezes (tabela 2).

Tabela 2: Resumo dos processos de purificação da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	26	0,794	100	1
Concentração c/ etanol (65%)	20,85	4,23	80,2	5,3
Sephadex G-100	12,51	7,38	48,1	9,3
Sephacryl S-200	7,75	10,09	29,8	12,7
Mono-Q	4,96	28,25	19	35,5

Apesar das dificuldades de purificar enzimas produzidas por fermentação sólida, o processo obtido no presente trabalho, apresenta um perfil similar aos descrito na literatura: um rendimento não muito expressivo e um elevado fator de purificação. Uma β -glicosidase da levedura mesofílica *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-12974 foi purificada por Saha et al. (1994) resultando em um fator de purificação de 129 vezes e um rendimento de 3%. Peralta et al. (1997) relatam a purificação de uma β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Humicola grisea*, com um rendimento final de 15% e um fator de purificação de 38 vezes. Uma β -glicosidase produzida pela levedura *Aureobasidium sp*, foi purificada por Hayashi et al. (1999), estes obtiveram um rendimento final de 28,9% e um fator de purificação de 53,8 vezes. Wei et al. (1996) apresentaram um fator de purificação de 38,4 vezes e um rendimento de 4% na purificação da β -glicosidase produzida pelo fungo *Xylaria regalis*. Duas β -glicosidasas produzidas pela levedura *Pichia etchellsii* foram

purificadas por Wallecha e Mishra (2003), obtendo a homogeneidade das duas enzimas com um rendimento de 17% para a BGL-I e de 7,5% para BGL-II.

VI.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Uma das maiores dificuldades encontrada no desenvolvimento deste trabalho, foi análise eletroforética da β -glicosidase purificada da levedura *A. pullulans*. Diferentes malhas de gel de poliacrilamida foram testadas, 6%, 7% 8% e 10%, em sistema desnaturante e não desnaturante. No entanto, a proteína espalhava-se pela malha do gel e não era observada a formação de bandas protéicas bem definidas (figura 9).



Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante, revelação com prata. Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.

Com o objetivo de resolver este problema, diversos métodos de coloração foram utilizados, tais como: prata, comassie blue (coloração protéica), reativo de Schiff (coloração de carboidratos) e esculina mais cloreto de ferro (gel de atividade). Em todos os tipos de coloração o perfil do gel foi o mesmo, um arraste no início do gel separador. Posteriormente foi constatado que este arraste era ocasionado, devido à grande quantidade de carboidratos na estrutura protéica (hiper-glicosilação), que foi comprovado pela coloração

com o reativo de Schiff. A figura 10 ilustra géis revelados com diferentes métodos de coloração, que apresentam o perfil descrito anteriormente.

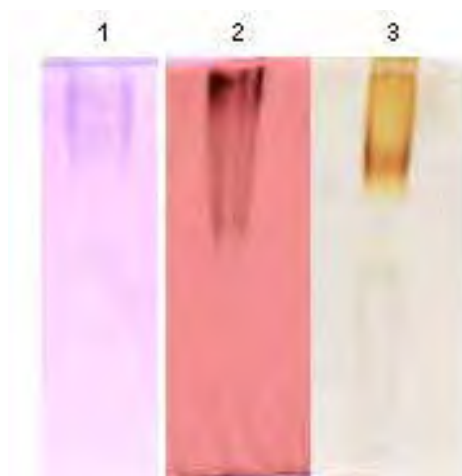


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante, revelação com diferentes métodos. **1.** Coomassie Blue, **2.** Reativo de Schiff, **3.** Prata. Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.

Eletroforeses realizadas em sistema desnaturante também apresentaram arraste na porção superior do gel, no entanto, é possível a visualização de “indícios” de bandas com péssima resolução (figura 11).

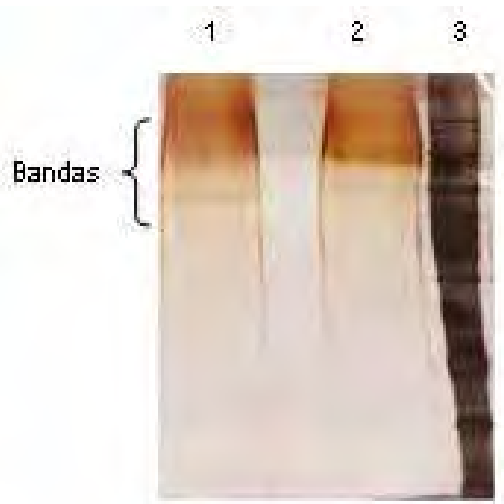


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema desnaturante, revelação com prata. **1 e 2.** Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*. **3.** Marcador de peso molecular.

A determinação da atividade de β -glicosidase em gel não desnaturante, revelou uma elevada atividade da enzima na região superior do gel de separação, que coincide com a região do arraste protéico (figura 12). Fato este, que confirma o espalhamento da amostra pela malha do gel. Como não foi observada a formação de bandas fora da região de arraste, em nenhuma das metodologias de revelação utilizadas, acreditamos na homogeneidade da enzima.



Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sistema não desnaturante. 1. Revelação com Prata, 2. Esculina (atividade β -glicosidase). Amostra resultante da etapa final do processo de purificação da β -glicosidase do *A. pullulans*.

Okuyama et al. (2005) purificaram uma α -glicosidase hiperglicosilada da levedura *Schizosaccharomyces pombe* (cerca de 90% da massa molar da enzima constituída de açúcar). Os autores apresentam em seu trabalho um SDS-PAGE com arraste na região superior do gel separador, idêntico aos apresentados anteriormente. Para solucionar o problema, os mesmos utilizaram a enzima endoglycosidase F para desglicosilar a proteína.

Com o intuito de provar a homogeneidade da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans*, a amostra resultante do processo de purificação anteriormente descrito foi submetida a um tratamento enzimático para desglicosilação protéica. Nesta etapa o “Kit Enzimático para Desglicosilação de Proteína” (Sigma) foi utilizado. A β -glicosidase desglicosilada apresentou uma melhor permeabilidade no gel de poliacrilamida,

onde foi possível observar a formação de apenas uma banda protéica, confirmando a eficiência do processo de purificação da enzima (figura 13).

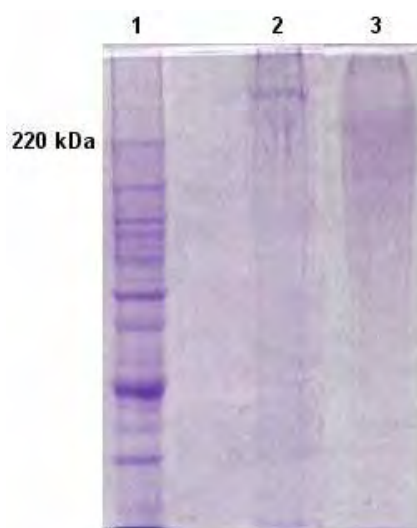


Figura 13: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 8%, sistema desnaturalizante, revelação com Coomassie Blue. 1. Marcador de peso molecular, 2. β -glicosidase do *A. pullulans* purificada e desglicosilada. 3. β -glicosidase do *A. pullulans* purificada não desglicosilada.

Como pode ser observado na figura 13, a β -glicosidase, mesmo desglicosilada, apresentou uma pequena migração pelo gel, localizando-se acima da proteína de maior massa molar do marcador utilizado (220 kDa). Fato este, não nos permitiu a determinação precisa da massa da mesma. No entanto, estes dados associados ao perfil de eluição da enzima em gel Sephacryl S-200 (enzima saiu no V zero da coluna "void"), nos permite inferir que a β -glicosidase purificada do *A. pullulans*, apresenta massa molar maior que 250 kDa. Saha et al. (1994) relatam a purificação de uma β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* com massa molecular aproximada de 340 kDa. Hayashi et al. (1999) purificaram uma β -glicosidase intracelular do microrganismo *Aureobasidium* sp ATCC 20524, esta apresentou uma massa molecular de 331 kDa. Ambos os autores, observaram a presença de carboidratos na estrutura das enzimas, confirmando assim, os resultados obtidos no presente trabalho.

VI.3. Caracterização das β -glicosidasas Purificadas

VI.3.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade das β -glicosidasas purificadas

Os valores encontrados para pH e temperatura ótima da β -glicosidase purificada do fungo *T. aurantiacus*, foram 4,5 e 75°C. A enzima purificada do microrganismo *A. pullulans*, apresentou sua melhor atividade nos valores de pH 4,0-4,5 e a temperatura de ótima foi de 80°C (figuras 14 e 15).

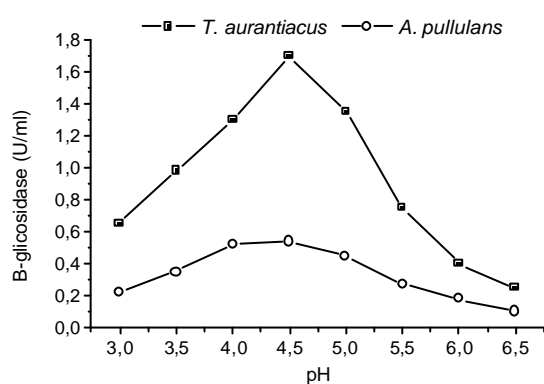


Figura 14: Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH.

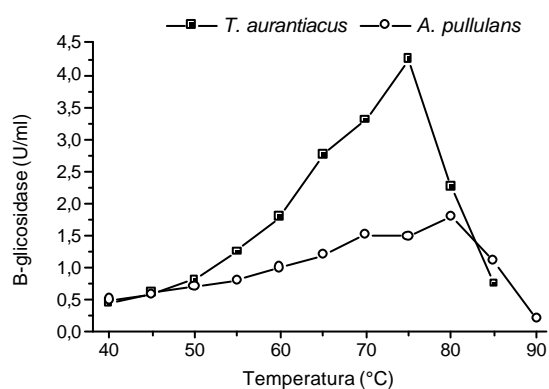


Figura 15: Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura.

A β -glicosidase purificada do fungo *T. aurantiacus* demonstrou estabilidade em uma faixa de pH de 4,5 a 6,5, retendo cerca de 80% de sua atividade original após 24 horas em pH 7,0. Quanto a termoestabilidade, esta manteve-se estável após uma hora de incubação a 70°C. A enzima purificada do microrganismo mesofílico *A. pullulans* reteve sua atividade original em uma ampla faixa de pH, 4,0 a 9,5, e, manteve-se estável após 1 hora a 75°C (figuras 16 e 17).

Os primeiros ensaios de caracterização realizados com as enzimas purificadas, indicaram uma maior termoestabilidade da enzima produzida pelo microrganismo mesofílico. Trabalhos anteriores confirmam a elevada estabilidade, ao pH e a temperatura, das β -glicosidasas produzidas pelos microrganismos *T. aurantiacus* e *A. pullulans*. Hayashi et al. (1999) caracterizaram uma β -glicosidase purificada do microrganismo *Aureobasidium sp.*, o pH e a temperatura ótima obtidos foram 4,0 e 80°C, respectivamente, a

enzima descrita manteve-se estável em uma faixa de pH 2,2 – 9,8 e reteve 88% da sua atividade original após 15 minutos a 80°C. Saha et al. (1994) purificaram uma β -glicosidase do microrganismo *Aureobasidium pullulans*, esta apresentou sua melhor atividade catalítica em pH 4,5 a 75°C, manteve sua atividade original em uma faixa de pH 4,5 – 6,5, os autores relatam que após 1 hora a 60°C não foi observado redução de sua atividade catalítica, e quando a temperatura foi elevada para 80°C a recuperação foi de 55% da original. Os trabalhos citados confirmam a elevada estabilidade da β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans*.

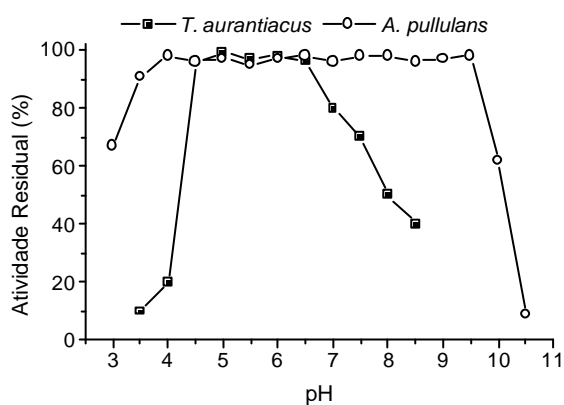


Figura 16: Estabilidade enzimática em função da variação do pH.

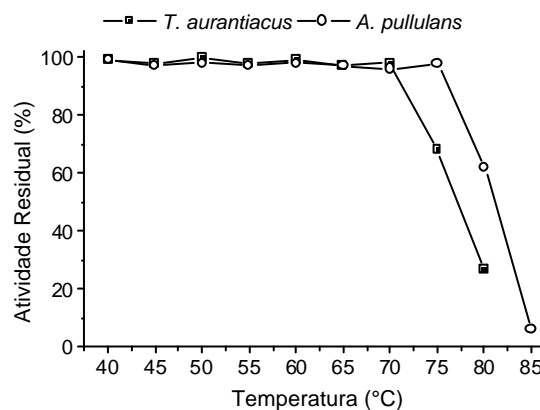


Figura 17: Estabilidade enzimática em função da variação da temperatura.

Palma-Fernandez et al. (2002) purificaram duas β -glicosidases, produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, com características muito próximas as obtidas no presente trabalho. Os valores obtidos de pH ótimo foram 4,5 e 4,0, respectivamente, para GI-2 e GI-3. A temperatura ótima de atividade da GI-2 foi de 80°C e da GI-3 foi de 75°C. A enzima GI-2 mostrou-se estável em uma faixa de pH 4,0-9,0 e a GI-3 em uma faixa de 5,5-8,5. Em relação a termoestabilidade, as β -glicosidases GI-2 e GI-3 mantiveram 85 e 80%, respectivamente, da sua atividade original após 1 hora a 70°C, e ambas foram praticamente inativadas a 80°C. Outra β -glicosidase do fungo *Thermoascus aurantiacus* foi purificada e caracterizada por Parry et al. (2001), a enzima apresentou sua melhor atividade catalítica em pH 4,5 a uma temperatura de 80°C. Variando os valores de pH, temperatura e tempo de incubação, estes verificaram que em pH 5,2 a uma temperatura de 70°C, a

enzima permaneceu estável após 30 minutos de incubação, quando a temperatura foi aumentada para 80°C, esta praticamente foi inativada.

A termoestabilidade das enzimas descritas no presente trabalho torna-se mais significativa quando comparada com enzimas produzidas por outros microrganismos. A β -glicosidase purificada do fungo mesofílico *Xylaria regalis*, por Wei et al. (1996), reteve 78% de sua atividade original após 30 minutos a 50°C, quando incubada a 60°C a enzima foi rapidamente inativada. Peralta et al. (1997) purificaram uma β -glicosidase do fungo termofílico *Humicola grisea*, a enzima manteve-se estável durante 1 hora a 50°C, quando incubada a 70°C pelo mesmo período, perdeu 50% da sua atividade original. Belancic et al. (2003) caracterizaram uma β -glicosidase pura da levedura *Debaryomyces vanrijae*, os autores relatam que a enzima manteve-se estável após 1 hora a 45°C e foi totalmente inativada a 70°C.

A expressiva estabilidade apresentada pelas enzimas e a maior termoestabilidade da β -glicosidase produzida pelo microrganismo mesofílico, estimularam a realização de novos estudos do comportamento das mesmas, em elevadas temperaturas, e a determinação de seus parâmetros termodinâmicos.

VI.3.2. Termoinativação irreversível das enzimas

Como pode ser observado na figura 18, o tratamento a 80°C resultou em uma progressiva inativação de ambas as enzimas, no entanto, a β -glicosidase produzida pelo microrganismo mesofílico *A. pullulans* apresentou uma termoestabilidade muito maior quando comparado com a enzima produzida pelo microrganismo termofílico *T. aurantiacus*. A 80°C a meia vida $t_{(1/2)}$ da enzima do *A. pullulans* foi obtida após 90 minutos de incubação, enquanto a do *T. aurantiacus* após 30 minutos apresentava 50% de sua atividade original. Quando calculada pela Eq. 1, a $t_{(1/2)}$ da enzima do *T. aurantiacus* foi de 29,7 min para 80°C, 6,2 min para 82,5°C, 3,8 min para 85°C e 1,3 min para 87,5°C. Para a β -glicosidase do *A. pullulans* os valores $t_{(1/2)}$ foram de 88,7 min para 80°C, 22,7 min para 82,5°C, 11 min para 85°C e 1,83 min para 87,5°C. Os resultados calculados pela equação a 80°C, confirmam os obtidos a 80°C graficamente.

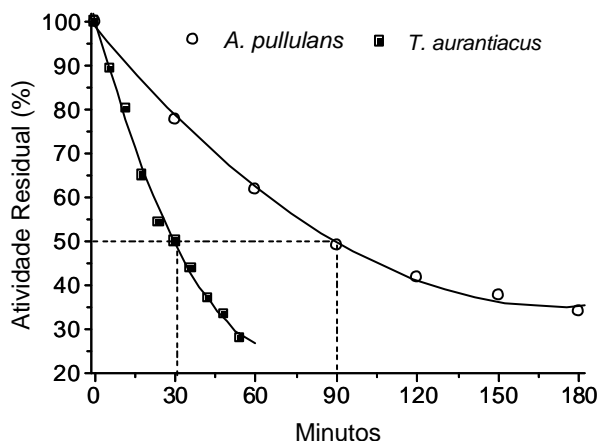


Figura 18: Atividade residual das β -glicosidases brutas em função do tempo de incubação a 80°C.

Os valores do K_d (coeficiente de velocidade de terminativação) foram obtidos pela inclinação da regressão linear da representação gráfica do $\ln ar$ (atividade residual) em função do tempo de incubação (figura 19). Em todas as temperaturas analisadas, a regressão linear ($\ln ar$ x Tempo) apresentou coeficiente de correlação (r) maior que 0,98, e a linearidade obtida indica que terminativação das β -glicosidases obedeceram uma cinética de primeira ordem (figura 19). Isto sugere que a inativação irreversível ocorreu por processo monomolecular (COBOS e ESTRADA, 2003). Rashid e Siddiqui (1998) também reportam uma cinética de primeira ordem para a β -glicosidase do *A. niger*.

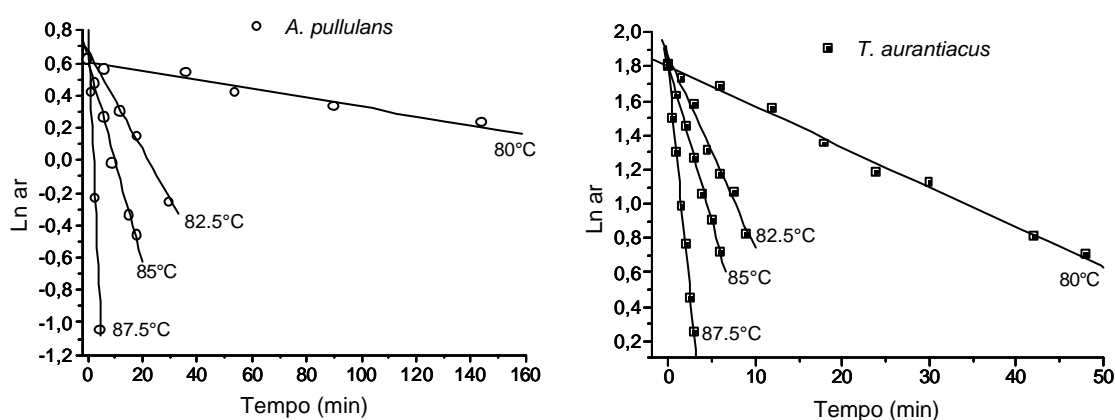


Figura 19: Regressão linear do plote de $\ln ar$ (atividade residual) pelo tempo de incubação a 80; 82,5; 85 e 87,5°C, para a determinação do K_d .

A representação gráfica do K_d em função da temperatura absoluta (figura 20) confirmam a alta termoestabilidade da β -glicosidase do *A. pullulans*. Em todas as temperaturas representadas ao longo da reta, a enzima do *A. pullulans* apresenta um menor K_d quando comparado com o K_d obtido para a enzima do *T. aurantiacus*. A enzima do *A. pullulans* apresentou uma maior estabilidade tanto em temperaturas mais baixas (80°C) quanto nas mais elevadas (87,5°C).

As enzimas quando submetidas a temperaturas elevadas, sofrem um desdobramento parcial, resultando na alteração de sua conformação original e perda da atividade catalítica. Quando o período de incubação em altas temperaturas é relativamente curto, a proteína pode se reorganizar, e, após um determinado tempo, a atividade catalítica é completamente revertida. Mas quando incubada por um longo período, somente uma pequena fração da atividade é recuperada, caracterizando um processo de terminativação irreversível. (TOMAZIC e KLIBANOV, 1988). Como as atividades remanescentes foram calculadas após 24h do tratamento térmico, podemos inferir que o tempo de incubação e as temperaturas utilizadas, foram suficientes para promover uma terminativação irreversível de ambas as enzimas.

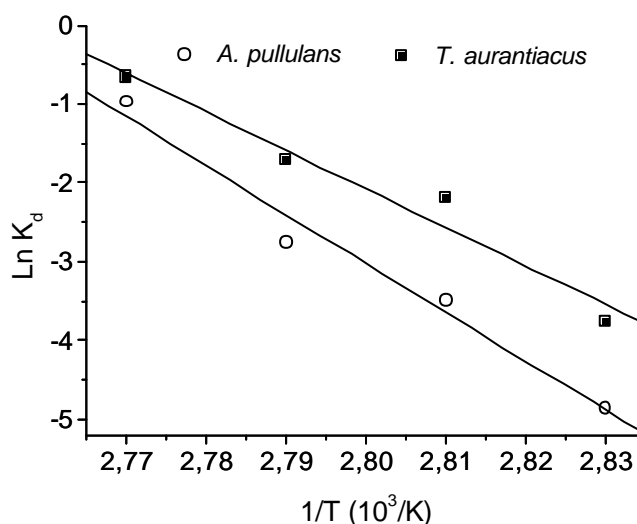


Figura 20: Efeito da temperatura na terminativação irreversível das β -glicosidases.

A energia de ativação para desnaturação (E_a) foi determinada por regressão linear da representação gráfica do $\ln K_d$ em função de $1/T$ (inclinação multiplicada pela constante dos gases, Eq. 5). A E_a foi de 414 KJ mol⁻¹ para a enzima do *T. aurantiacus* e de 537 KJ mol⁻¹ para a enzima do *A. pullulans*. A energia de ativação para desnaturação (E_a) indica a energia necessária para mudar a conformação da enzima (COBOS e ESTRADA, 2003). Portanto, os resultados obtidos sugerem que, nas temperaturas analisadas, a β -glicosidase do *A. pullulans* apresentou uma maior estabilidade de sua estrutura conformacional, quando comparada com a enzima correspondente produzida pelo *T. aurantiacus*.

Tabela 3: Resumo dos parâmetros termodinâmicos das β -glicosidases purificadas.

Parâmetros	Temperatura (°C)							
	80		82.5		85		87.5	
	T. a	A. p	T. a	A. p	T. a	A. p	T. a	A. p
ΔG (kJ mol ⁻¹)	97,76	101,63	95,59	98,55	93,4	95,47	91,3	92,38
ΔH (kJ mol ⁻¹)	411,46	534,12	411,44	534,10	411,42	534,08	411,40	534,06
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	888,86	1225,18	888,46	1225,17	888,32	1225,16	887,93	1225,18

Como pode ser observado na tabela 3, a enzima produzida pelo microrganismo mesofílico apresentou maior ΔG em todas as temperaturas analisadas. O valor de ΔG está intimamente relacionado com a estabilidade da proteína, quanto maior for o ΔG , maior será a estabilidade da enzima (LONGO e COMBES, 1999). Quando a temperatura de incubação foi elevada de 80 para 87,5°C houve uma significativa redução dos valores de ΔG , para ambas as enzimas, indicando que a desestabilização destas proteínas acompanhou o aumento da temperatura. O ΔS praticamente não sofreu alteração com o aumento da temperatura, acredita-se que o aumento da entropia por desnaturação, ocorre devido à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento da proteína (COBOS e ESTRADA, 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a 80°C, grande parte da organização

estrutural, de ambas as enzimas, já foi destruída. Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados na figura 17.

Analisando separadamente os valores de ΔH de cada enzima, podemos observar que não houve variações significativas com o aumento da temperatura. Fato este, sugere que a capacidade térmica das enzimas independe da temperatura (COBOS e ESTRADA, 2003). O ΔH obtido para a enzima do *A. pullulans* foi maior que o obtido para a enzima do *T. aurantiacus*. Segundo Ortega et al. (2004) o valor do ΔH aponta o número de ligações não covalentes que foram quebradas durante o processo de desnaturação protéica. Logo, quanto maior for o ΔH , maior será o número de ligações não covalentes presentes na molécula de proteína. Bruins et al. (2001) relatam que não existe um sistema estrutural complexo que diferencie uma proteína estável de uma não estável; e pequenas alterações moleculares como o número de pontes hidrogênio e dissulfeto, o grau de enovelamento e hidrofobicidade da molécula, a quantidade de interligações iônicas podem gerar grandes mudanças na estabilidade de uma proteína. No entanto, acreditamos que a hiper-glicosilação apresentada pela β -glicosidase do *A. pullulans*, é de fundamental importância na estabilização térmica desta enzima. Segundo Okuyama et al. (2005) a hiper-glicosilação confere a proteína uma menor flexibilidade, resultando em uma maior estabilidade de sua estrutura conformacional.

Comparando as duas enzimas, podemos concluir que a β -glicosidase do microrganismo mesofílico *A. pullulans* é mais resistente a inativação térmica, do que a β -glicosidase produzida pelo fungo termofílico *T. aurantiacus*. Estes resultados contribuem para demonstrar que a complexa compreensão da termoestabilidade enzimática, não está somente associado a termofilia do organismo pelo qual a enzima foi originada.

VI.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando pNP β G como substrato. Nas condições ótimas de atividade, pH 4,5 a 75°C para a enzima do *T. aurantiacus* e pH 4,0 a 80°C para a enzima do *A. pullulans*. A representação gráfica do duplo recíproco ($1/V \times 1/S$) apresentou-se linear, confirmando o comportamento michaeliano, para ambas as enzimas (figura 21).

A β -glicosidase do *T. aurantiacus* apresentou K_m de $0,53 \pm 0,03$ mM e V_{max} de $590,8 \pm 14,0$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os valores obtidos de K_m e V_{max} para a enzima do *A. pullulans* foram respectivamente, $0,93 \pm 0,06$ mM e $29,9 \pm 1,2$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os resultados indicam que a enzima produzida pelo *T. aurantiacus* apresenta maior afinidade pelo pNP β G que a enzima produzida pelo *A. pullulans*. A V_{max} obtida para a β -glicosidase do *T. aurantiacus*, também foi significativamente maior (cerca de 20 vezes) quando comparada com a do *A. pullulans*.

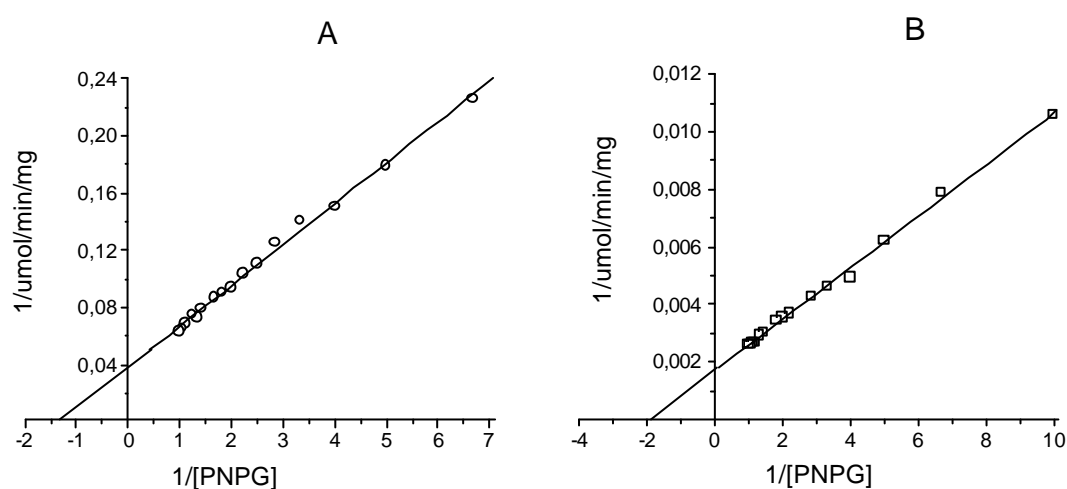


Figura 21: Gráfico duplo recíproco da velocidade de reação em função da concentração de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. (A) *A. pullulans*; (B) *T. aurantiacus*.

Os valores de K_m e V_{max} para β -glicosidases microbianas, citados na literatura, são os mais variados possíveis desde 0,013 a 1,72 mM para o K_m e 10 a 897 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para a V_{max} (BELANCIC et al., 2003; KIMURA et al., 1999; MAMMA et al., 2004; PALMA-FERNANDEZ et al., 2002; PARRY et al., 2001; SAHA et al., 1994; TURAN e ZHENG, 2005; WALLECHA e MISHRA, 2003; WEI et al., 1996). Assim, podemos concluir que não existe um perfil esperado para os valores de K_m e V_{max} de β -glicosidases microbianas, tais parâmetros são típicos para cada enzima.

VI.3.4. Determinação da especificidade ao substrato

A determinação da especificidade das enzimas foi realizada em diferentes substratos aril-glicosídeos e sacarídeos (tabela 4). Os valores obtidos (U/ml) com p-NP- β -D-glicopiranosídeo e celobiose foram utilizados como padrões para comparação com os demais substratos. No entanto, as duas enzimas apresentaram maior atividade catalítica em pNP β G. As atividades relativas obtidas com a hidrólise da celobiose corresponderam a 31,8 e 62,1%, das atividades obtidas utilizando p-NP- β -D-glicopiranosídeo, para as enzimas dos microrganismos *T. aurantiacus* e *A. pullulans*, respectivamente. Estes dados confirmam a elevada afinidade da enzima do *T. aurantiacus* pelo pNP β G.

Dentre os substratos aril-glicosídeos utilizados, a β -glicosidase purificada do microrganismo *T. aurantiacus* apresentou atividade catalítica em p-NP- β -D-glicopiranosídeo e p-NP- α -D-galactopiranosídeo. A enzima também apresentou um excelente potencial para a hidrólise de dissacarídeos de glicose tais como: celobiose (β -1,4), laminariobiose (β -1,3) e gentiobiose (β -1,6). Não foi observada hidrólise significativa de maltose (duas glicoses ligadas por α -1,4) e lactose (galactose e glicose ligadas por β -1,4) (tabela 4).

A β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans* hidrolisou p-NP- β -D-glicopiranosídeo, p-NP- α -L-arabinofuranosídeo e p-NP- β -D-xilopiranosídeo. É importante ressaltar, o elevado potencial desta enzima para a hidrólise de ligações β -1,4 xilosídicas, foi alcançado na hidrólise do pNP β X, cerca de 97% da atividade catalítica obtida com o pNP β G. A mesma enzima, apresentou atividade sobre celobiose, laminariobiose e gentiobiose. A quebra de maltose e lactose também foi observada, mas com uma menor eficiência (tabela 4). Ambas as enzimas não atuaram sobre os polissacarídeos CM-celulose, avicel, paramilo e pustulano, demonstrando uma elevada especificidade para sacarídeos com menor grau de polimerização.

Atividade catalítica para diferentes substratos é comumente encontrada nas β -glicosidases microbianas. Mamma et al. (2004) relatam a hidrólise de diferentes substratos aril-glicosídeos (pNP β G, pNP α G, pNP β Celobiosídeo, pNP β X), sacarídeos (celobiose, gentiobiose, salicina e outros) e flavonóides glicosilados, pela β -glicosidase do *Penicillium*

decumbens. Wallecha e Mishra (2003) purificaram duas β -glicosidases da levedura *Pichia etchellsii*, as enzimas atuaram em diferentes substratos aril-glicosídeos, sacarídeos e alquil β -glicosídeos. Villena et al. (2006) observaram uma hidrólise significativa de maltose, pela β -glicosidase purificada da levedura *Debaryomyces pseudopolymorphus*. Kimura et al. (1999) obtiveram valores muito próximos de K_m e V_{max} utilizando pNP β G e pNP β X como substratos.

Tabela 4: Atividade relativa em diferentes substratos das β -glicosidases purificadas

Substratos	Atividade Relativa (%) ^a	
	<i>T. aurantiacus</i>	<i>A. pullulans</i>
Aril-glicosídeos (5 mM)		
p-NP- β -D-glicopiranosídeo ^b	100	100
p-NP- α -D-glicopiranosídeo	0,0	0,0
p-NP- β -D-xilopiranosídeo	0,0	97,8
p-NP- α -D-galactopiranosídeo	33	0,0
p-NP- β -D-mannopiranosídeo	0,0	0,0
p-NP- α -L-arabinofuranosídeo	0,0	25,2
Dissacarídeos (30mM)		
Celobiose (1,4)- β Glc ^b	100	100
Laminariobiose(1,3)- β Glc	105,3	99,1
Gentiobiose (1,6)- β Glc	110,6	101,6
Maltose (1,4)- α Glc	0,0	17,9
Lactose (1,4)- β Gal	0,0	16,3
Polissacarídeos (0,5%)		
CM-celulose (β -1,4)	0,0	0,0
Avicel (β -1,4)	0,0	0,0
Paramilo (β -1,3-glucan)	0,0	0,0
Pustulano (β -1,6-glucan)	0,0	0,0

^aAs atividades relativas obtidas pela hidrólise dos substratos aril-glicosídeos e dissacarídeos, foram expressas em porcentagem da atividade enzimática obtida utilizando respectivamente, p-NP- β -D-glicopiranosídeo e celobiose, como substratos. ^bAs atividades relativas obtidas com a hidrólise da celobiose, correspondem a 31,8 e 62,1%, das atividades obtidas utilizando pNP- β -D-glicopiranosídeo como substrato, para as enzimas dos microrganismos *T. aurantiacus* e *A. pullulans*.

Os dados descritos na tabela 4 demonstram que as duas β -glicosidases atuam em diferentes substratos glicosídeos, isto é, apresentam uma ampla especificidade. Entretanto, o perfil de hidrólise das enzimas é bastante diferente.

Em geral, as β -glicosidases podem ser classificadas pela identidade da seqüência de nucleotídeos ou pela especificidade ao substrato (BHATIA et al., 2002). Quanto a especificidade ao substrato, as β -glicosidases podem ser classificadas em três grandes grupos: (1) Aril β -glicosidases, (2) celobiasas verdadeiras e (3) enzimas com ampla especificidade, que atuam em diferentes tipos de substratos (BHATIA et al., 2002; VILLENA et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que as duas enzimas pertencem ao terceiro grupo. Segundo Bhatia et al. (2002) a maioria das β -glicosidases microbianas são classificadas nesta mesma categoria.

VI.3.5. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade das enzimas

A β -glicosidase produzida pelo microrganismo *T. aurantiacus* apresentou uma significativa redução em sua atividade catalítica na presença de Al^{+3} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Ca^{+2} . A enzima produzida pelo microrganismos *A. pullulans* exibiu uma menor sensibilidade a presença dos íons analisados, sendo fracamente inibida por Al^{+3} e significativamente por Fe^{+2} e Cu^{+2} (tabela 5). As duas enzimas não dependem de íons metálicos como cofator para suas respectivas atividades, pois não foram afetadas com a presença de agentes quelantes como EDTA (VILLENA et al., 2006). Na concentração utilizada, o detergente SDS não alterou a estrutura tridimensional das β -glicosidases. Após serem incubadas em solução contendo 10 mM de SDS, ambas apresentaram mais de 90% de atividade remanescente.

Os resultados obtidos apresentam similaridades com trabalhos anteriores. Saha et al. (1994) relatam uma independência de cofatores e uma ampla tolerância à presença de íons, para a β -glicosidase produzida pelo microrganismo *A. pullulans*. Duas β -glicosidases do microrganismo *T. aurantiacus* (GI-2 e GI-3) foram purificadas por Palma-Fernandez et al. (2002). Os autores relatam uma pequena queda na atividade catalítica, quando a enzima GI-3 foi tratada com EDTA, e uma expressiva sensibilidade à presença

de determinados íons. A atividade da enzima GI-2 foi menos afetada pela presença de íons metálicos, exceto Ag^+ e Cu^{+2} , e o tratamento com EDTA aumentou em 9% a atividade da mesma.

Tabela 5: Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade enzimática

Reagentes (10 mM)	Atividade Residual (%)	
	<i>T. aurantiacus</i>	<i>A. pullulans</i>
Controle	100	100
Na^+	98,6	90,7
K^+	100	94,4
Ag^+	8,6	11,9
Al^{+3}	34,4	71,7
Fe^{+2}	31	62,4
Cr^{+2}	73,7	82,4
Zn^{+2}	64,9	87,8
Hg^{+2}	7,8	15,9
Mn^{+2}	58	89,6
Mg^{+2}	100	92,5
Cu^{+2}	46,5	41,4
Ca^{+2}	67,3	91,5
Ba^{+2}	94,9	87,8
Ni^{+2}	74,7	89,9
Co^{+2}	99,2	87,8
EDTA	100	93,3
SDS	94,3	93,8

Os metais pesados como Hg^{+2} , Cu^{+2} e Ag^+ apresentam uma elevada afinidade pelos grupos sulfidríla. Geralmente estes íons oxidam os grupos funcionais dos resíduos de cisteína, e podem inibir a atividade enzimática de determinadas proteínas (HAYASHI et al., 1999). As duas β -glicosidases isoladas no presente trabalho foram fortemente inibidas por Ag^+ e Hg^{+2} , sugerindo que o grupo tiol (SH) é essencial para atividade das mesmas (Wei et al., 1996). A inibição da atividade por metais sulfidil-oxidantes é comumente observada em β -glicosidases microbianas (HAYASHI et al., 1999; PALMA-FERNANDEZ et al., 2002; PERALTA et al., 1997; WALLECHA e MISHRA, 2003; WEI et al., 1996).

VI.3.6. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas

A β -glicosidase purificada do *A. pullulans* manteve-se estável (80% da atividade original) em concentrações de 10% de etanol (v/v). Quando a concentração de álcool foi elevada para 20% (v/v) a enzima apresentou apenas 31% de sua atividade (figura 22).

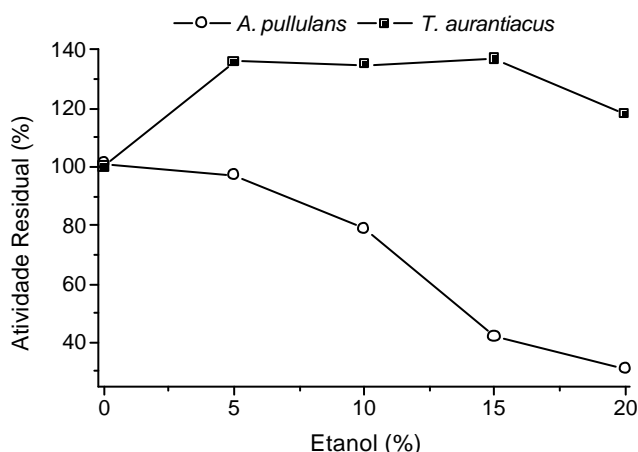


Figura 22: Efeito da concentração de etanol sobre a atividade das β -glicosidases purificadas.

A enzima purificada do *T. aurantiacus* foi ativada com a presença de etanol no meio de reação. Em concentrações de 5 a 15% de etanol, a atividade da enzima foi 35% maior que a original. Quando aumentamos a concentração de etanol para 20%, foi possível observar uma tendência para a queda da atividade (figura 22). O aumento do potencial catalítico pelo etanol, está associado com a atividade glicosil transferase (VILLENNA et al., 2006). O etanol pode aumentar a taxa de reação, de algumas β -glicosidases, por atuar como aceptor para o cátion glicosil intermediário, durante a hidrólise do substrato (BARBAGALLO et al., 2004; PARRY et al., 2001).

As β -glicosidases purificadas foram fortemente inibidas por glicose. Não foi observada atividade enzimática, para ambas as enzimas, em concentrações de 5% de glicose. Para acompanharmos o efeito da glicose sobre a ação das enzimas, a concentração de inibidor foi variada de 0 a 100 mM. Como pode ser observado na figura 23, as enzimas apresentaram um perfil de inibição muito semelhante. Em concentração igual a 100 mM de glicose, foi recuperada aproximadamente 20% da atividade original, para

ambas as enzimas. Quando a concentração do substrato (pNPG) foi elevada para o dobro da concentração do inibidor, a inibição da β -glicosidase do *A. pullulans* foi completamente revertida, enquanto, a enzima do *T. aurantiacus* manteve-se inibida (tabela 6).

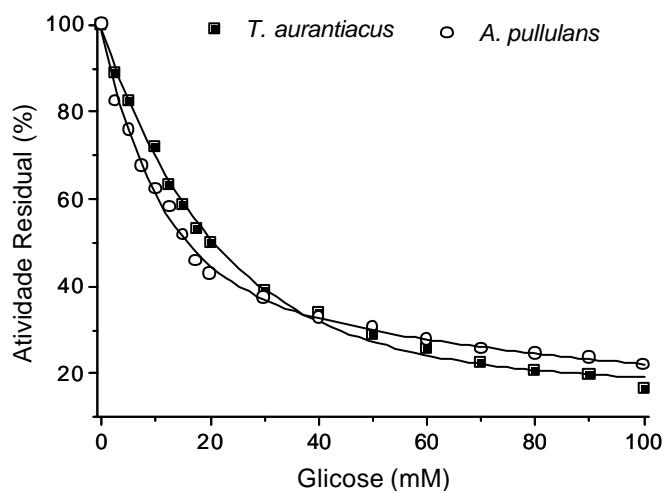


Figura 23: Efeito da concentração de glicose sobre a atividade das β -glicosidases purificadas.

A inibição competitiva pode ser revertida pelo o aumento da concentração do substrato, o mesmo não é observado na inibição não-competitiva (CAMPBELL, 2000). Portanto, o tipo de inibição exercida pela glicose sobre as β -glicosidases é: Competitiva para a enzima do *A. pullulans* e Não-Competitiva para a enzima do *T. aurantiacus*. Segundo Mamma et al. (2004) a inibição competitiva por glicose é uma característica muito comum das β -glicosidases microbianas, embora existam algumas exceções.

Tabela 6: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato e inibidor.

Enzimas	At. residual (%) pNPG - 2 mM	At. residual (%) pNPG - 2 mM Glicose - 20 mM	At. residual (%) pNPG - 40 mM Glicose - 20 mM	Tipo de Inibição
<i>T. aurantiacus</i>	100	52,3	48,6 ^a	Não-Competitiva
<i>A. pullulans</i>	100	45,8	138,8 ^b	Competitiva

^a A inibição da glicose sobre a atividade da enzima do *T. aurantiacus* não foi revertida com o aumento da concentração do substrato, característica típica de inibição não-competitiva. ^b Para a enzima produzida pelo *A. pullulans*, a inibição por glicose foi completamente revertida com o aumento da concentração de substrato, característica típica de inibição competitiva.

Um dos maiores obstáculos na utilização das β -glicosidases em processos industriais é a forte inibição da enzima por glicose. Atualmente existe uma constante busca por β -glicosidases que apresentem elevada termoestabilidade e não sejam inibidas pelo seu produto de hidrólise. Tais características seriam muito apreciáveis em uma enzima, e, provavelmente auxiliariam no processo de sacarificação enzimática do material celulósico (ZANOELO et al., 2004).

Uma alternativa para contornar o problema da inibição por açúcares fermentáveis, está em associar a hidrólise enzimática da celulose a uma fermentação alcoólica, onde a glicose liberada será microbiologicamente convertida em etanol (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007; SAHA et al., 1994). A reversão da inibição por glicose, observada para a enzima do *A. pullulans*, é uma característica muito interessante neste tipo de processo. Entretanto, o consumo de glicose pelo microrganismo fermentador, resulta no aumento da concentração de etanol no meio de reação, cuja enzima apresenta baixa estabilidade (figura 22). Devemos ressaltar que o efeito do etanol sobre a atividade das β -glicosidases foi analisado a 60°C, e a figura 22, ilustra o comportamento das enzimas nesta temperatura. A estabilidade protéica a solventes orgânicos, está intimamente relacionada com a temperatura. Em temperaturas elevadas, as proteínas apresentam uma maior flexibilidade, permitindo a interação do etanol com resíduos internos hidrofóbicos da molécula. Essas interações causam alterações irreversíveis na conformação da proteína, resultando na perda da atividade enzimática (LUCARINI et al., 2005). Portanto a diminuição da temperatura do processo de hidrólise, pode aumentar a estabilidade da β -glicosidase do *A. pullulans* ao etanol, e, viabilizar a utilização da mesma para a sacarificação de materiais celulósicos.

A estabilidade e o aumento da atividade catalítica na presença de etanol, observada para a β -glicosidase do *T. aurantiacus*, são características muito interessantes, mas a tipo de inibição exercida pela glicose dificulta aplicação da mesma, em processos onde exista a presença do inibidor.

VI.4. Aplicação das β -glicosidases em terpenos glicosídeos

O extrato enzimático bruto e as β -glicosidases purificadas foram utilizados para hidrolisar os terpenos glicosídeos extraídos da casca da uva Isabel. As amostras e os controles foram incubados por 24 horas a 60°C. O controle continha extrato de uva (substrato) diluído em tampão sem enzima, a concentração de substrato, o pH e a molaridade do tampão foram mantidas idênticas aos da reação. O extrato enzimático bruto, de ambos os microrganismos, apresentaram atividade catalítica sobre os precursores aromáticos glicosídeos. As análises por cromatografia gasosa, indicaram um significativo aumento na concentração de terpenos livres, nas amostras hidrolisadas com as enzimas brutas (figura 24). Os terpenos foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos respectivos padrões, injetados nas mesmas condições das análises.

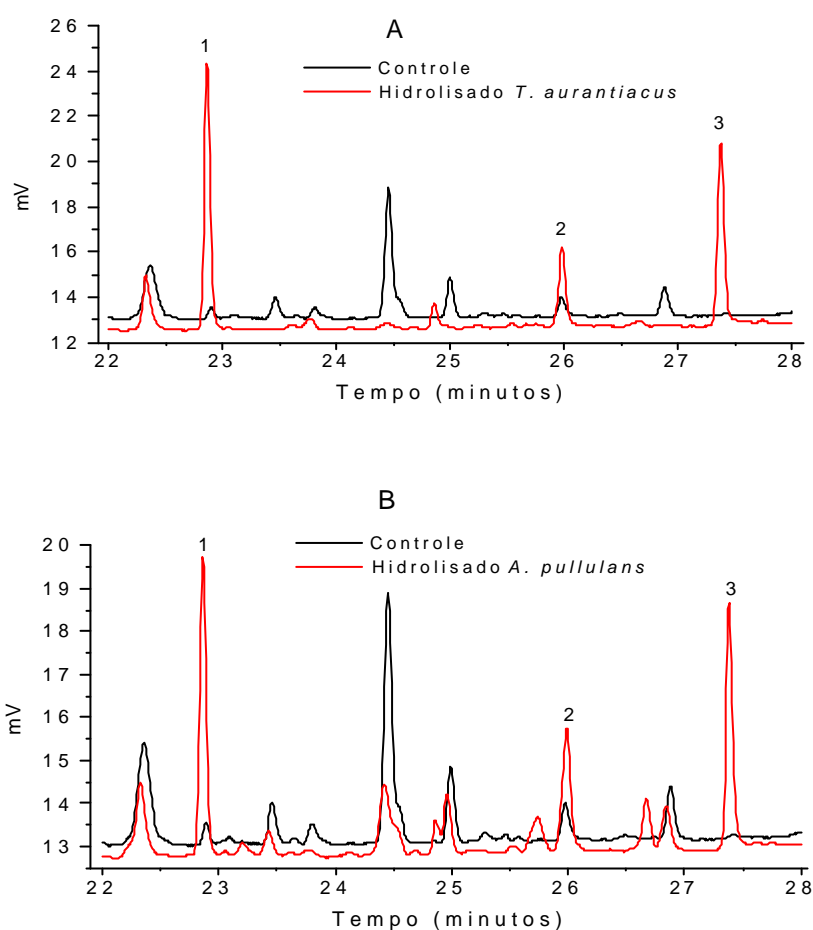


Figura 24: Análise por cromatografia gasosa do produto de hidrólise, dos terpenos glicosídeos, com extrato enzimático bruto. 1. a-Terpineol; 2. Nerol; 3. Geraniol. **A)** *T. aurantiacus*; **B)** *A. pullulans*.

A eficiência na hidrólise dos terpenos glicosídeos, pelos extratos enzimáticos brutos de ambos os microrganismos, fica bastante evidente quando a concentração dos terpenos voláteis no hidrolisado, é expressa em vezes do controle (tabelas 7 e 9).

Tabela 7: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com o extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*.

Terpenos	Controle área do pico (mV*min)	Hidrolisado área do pico (mV*min)	Fator de conversão (vezes)*
Nerol	0,0706	0,2861	4,1
Geraniol	0,0054	0,5567	103,1
a-Terpineol	0,0358	0,7555	21,1

Tabela 8: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com a β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*.

Terpenos	Controle área do pico (mV*min)	Hidrolisado área do pico (mV*min)	Fator de conversão (vezes)*
Nerol	0,0706	0,0738	1,0
Geraniol	0,0054	0,0493	9,1
a-Terpineol	0,0358	0,0918	2,6

Tabela 9: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com o extrato enzimático bruto do *A. pullulans*.

Terpenos	Controle área do pico (mV*min)	Hidrolisado área do pico (mV*min)	Fator de conversão (vezes)*
Nerol	0,0706	0,2413	3,4
Geraniol	0,0054	0,3846	71,2
a-Terpineol	0,0358	0,4413	12,3

Tabela 10: Concentrações de terpenos livres presentes no controle e no hidrolisado com a β -glicosidase purificada do *A. pullulans*.

Terpenos	Controle área do pico (mV*min)	Hidrolisado área do pico (mV*min)	Fator de conversão (vezes)*
Nerol	0,0706	0,1818	2,6
Geraniol	0,0054	0,2848	52,7
a-Terpineol	0,0358	0,3876	10,8

* **Fator de conversão (FC):** Comparação em vezes, entre a quantidade de terpenos voláteis presente no controle (sem enzima) com a obtida após o tratamento enzimático (hidrolisado). Os valores foram calculados dividindo a área do hidrolisado pela área do controle. **FC = área hidrolisado / área do controle.**

Na hidrólise realizada com as enzimas purificadas também foi possível observar um aumento na concentração de α -terpineol, nerol e geraniol (figura 25). Entretanto, a eficiência do processo de hidrólise foi bastante reduzida (tabelas 8 e 10). A β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus* apresentou menor potencial catalítico que a enzima purificada do *A. pullulans*, para a hidrólise dos terpenos glicosídeos da uva Isabel. Estes resultados corroboram com os obtidos para a especificidade enzimática. Onde as duas enzimas apresentam uma ampla especificidade, mas com um perfil de hidrólise diferente.

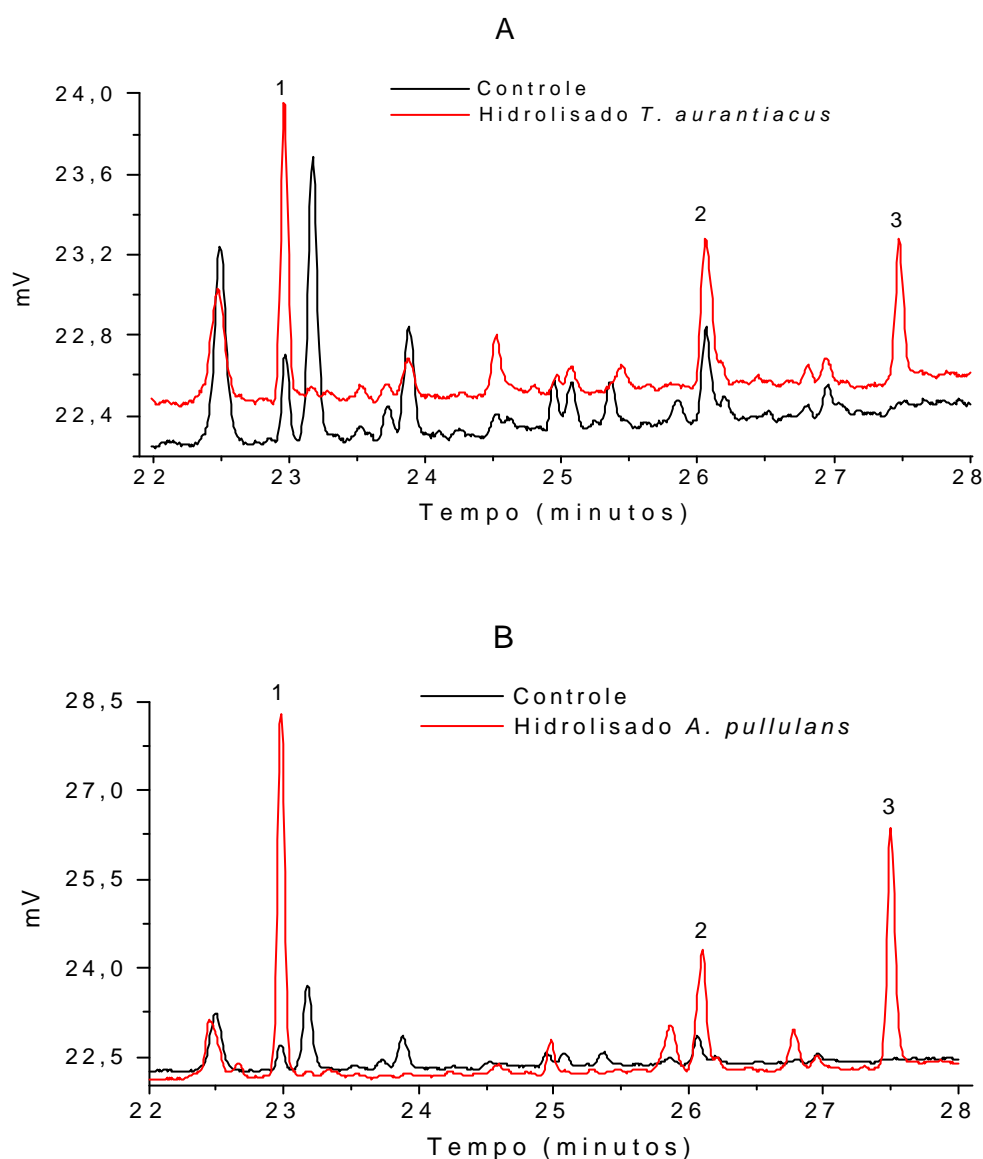


Figura 25: Análise por cromatografia gasosa do produto de hidrólise, dos terpenos glicosídeos, com as β -glicosidases purificadas. 1. α -Terpineol; 2. Nerol; 3. Geraniol. **A)** *T. aurantiacus*; **B)** *A. pullulans*.

Não foi observada a presença de citronellol e linalool, no controle e em nenhuma das amostras hidrolisadas. A ausência destes terpenos livres pode estar associada à ausência dos respectivos precursores glicosídeos na uva Isabel, à baixa recuperação dos precursores durante o processo de extração, ou ainda, à baixa especificidade das enzimas para a hidrólise de tais compostos. Sabe-se que a constituição química da uva pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, variedade cultivada, características do solo, condições climáticas, grau de amadurecimento, condições de armazenamento, etc (CATALUÑA, 1988); durante as diferentes etapas do processo extração, a recuperação dos terpenos glicosídeos foi não monitorada. Tais fatores, associados à eficiência apresentada pelas enzimas, na hidrólise dos demais terpenos analisados, faz-nos crer que a ausência de citronellol e linalool no hidrolisado enzimático, está relacionada com a ausência de seus precursores no extrato de uva.

O extrato enzimático não purificado, de ambos os microrganismos, apresentou uma maior eficiência na hidrólise dos terpenos glicosídeos, quando comparados com as enzimas purificadas. Característica bastante apreciável, tendo em vista que a utilização industrial de enzimas purificadas é economicamente inviável. Os precursores aromáticos não voláteis, podem apresentar outros açúcares, como rhamnose ou arabinose, ligados a molécula de glicose, o que dificulta a ação das β -glicosidases isoladamente (VILLENA et al., 2007). Diferentes trabalhos relatam que uma maior eficiência na liberação dos terpenos voláteis é obtida pela ação sinérgica de rhamnosidases, arabinosidases e β -glicosidases (BARBAGALLO et al., 2004; BELANCIC et al., 2003; HEMINGWAY et al., 1999).

Os resultados obtidos permitem-nos concluir, que as β -glicosidases produzidas pelos microrganismos *T. aurantiacus* e *A. pullulans*, apresentam potencial para hidrolisar os precursores de aroma do vinho, principalmente quando não purificadas. Devemos ressaltar que todos os ensaios descritos no do presente trabalho, foram realizados com terpenos extraídos da uva, e, trabalhos futuros serão necessários para o desenvolvimento de processos adaptativos, que contornem o efeito inibidor da glicose sobre a atividade das enzimas, possibilitando a utilização das mesmas no enriquecimento aromático de sucos e vinhos.

VI.5. Aplicação das β -glicosidases em isoflavonas glicosiladas

As isoflavonas foram extraídas da soja com a adição metanol 80%, após a centrifugação o sobrenadante foi concentrado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, que indicou uma predominância das formas glicosiladas: daidzina, glicitina e genistina (figura 26). As isoflavonas foram identificadas pelo tempo de retenção e comparação do espectro de absorção dos respectivos padrões, injetados nas mesmas condições cromatográficas em que foram realizadas as análises. Trabalhos anteriores relatam a maior concentração de isoflavonas glicosiladas e apresentam cromatogramas muito similares ao obtido no presente trabalho (GENOVESE e LAJOLO, 2001; LIMA, 2003; PARK et al., 2002).

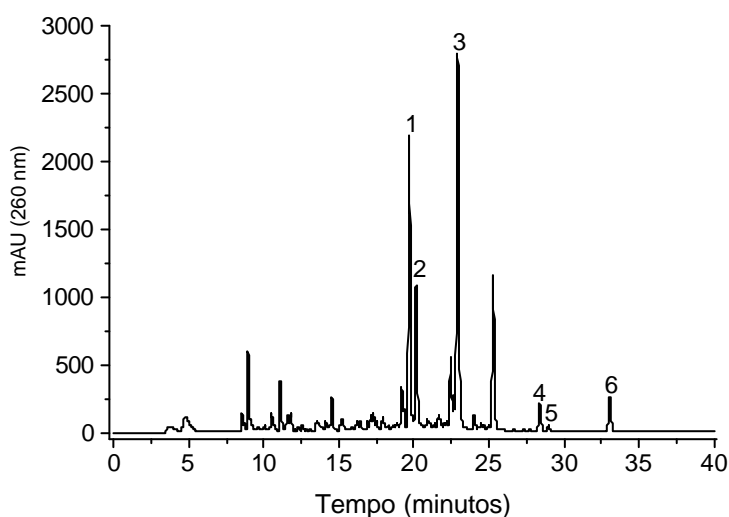


Figura 26: Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de isoflavonas, sem tratamento enzimático. 1. Daidzina; 2. Glicitina; 3. Genistina; 4. Daidzeína; 5. Gliciteína; 6. Genisteína.

As β -glicosidases brutas e purificadas foram utilizadas para hidrolisar as isoflavonas glicosiladas da soja. As enzimas foram incubadas, junto ao extrato de soja, por 24 horas a 60°C em tampão acetato 0,1 M, pH 4,5. Amostras contendo extrato de soja, diluídas em tampão sem enzima, foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente, para nos certificarmos que as alterações nas isoflavonas não foram provocadas pela exposição ao pH e temperatura.

Como pode ser observado na figura 27, após o tratamento enzimático, as isoflavonas glicosiladas foram totalmente convertidas em agliconas, e, o extrato de soja hidrolisado apresenta a predominância de daidzeína, gliciteína e genisteína. Tais resultados foram obtidos com as enzimas brutas e purificadas, de ambos os microrganismos.

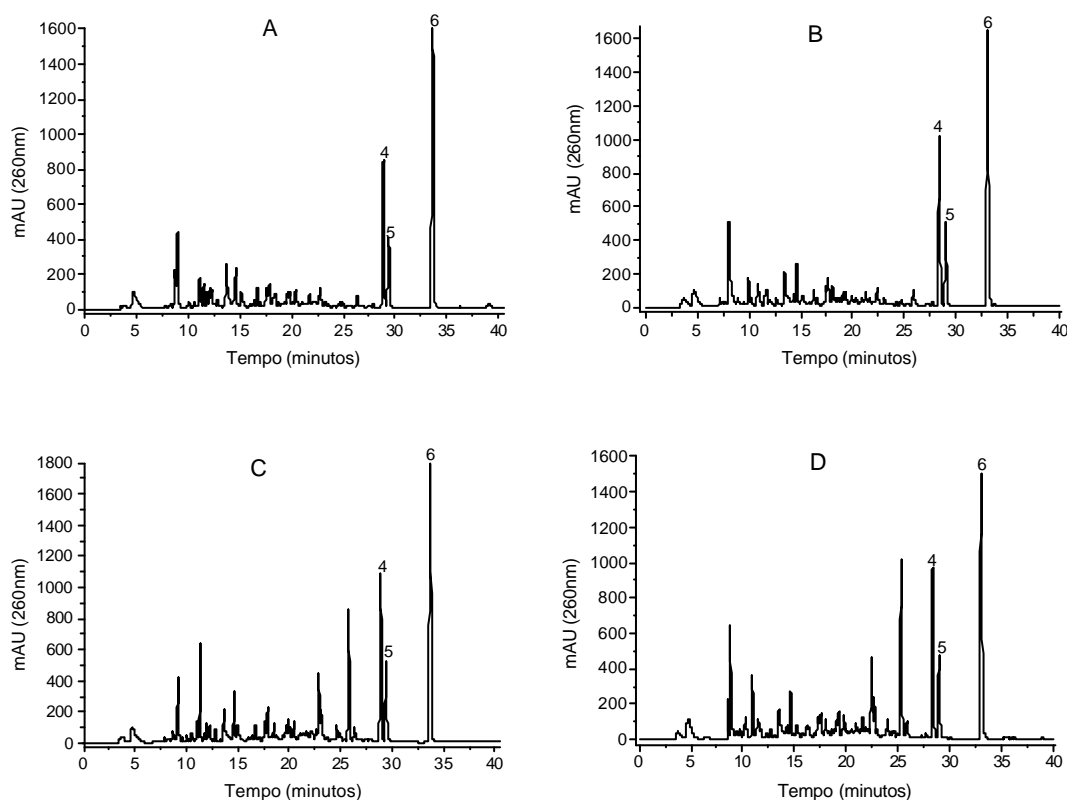


Figura 27: Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de soja hidrolisado. **4.** Daidzeína; **5.** Gliciteína; **6.** Genisteína. **A)** Hidrólise com extrato enzimático bruto do *A. pullulans*; **B)** Hidrólise com β -glicosidase purificada do *A. pullulans*; **C)** Hidrólise com o extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*; **D)** Hidrólise com a β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*.

Ao contrário dos resultados obtidos na hidrólise dos terpenos. Para a hidrólise das isoflavonas glicosiladas, a eficiência catalítica das β -glicosidases purificadas e dos extratos enzimáticos brutos, não apresentaram diferenças significativas (tabelas 11 a 14). O perfil de hidrólise apresentado pelas enzimas brutas e purificadas de cada microrganismo foi muito semelhante. No entanto, quando comparamos o perfil de hidrólise entre as β -glicosidases dos dois microrganismos, fica claro que estas apresentam um espectro de ação

bastante diferente (figura 27). Tais resultados confirmam os obtidos para a especificidade enzimática, descritos anteriormente.

As tabelas a seguir expressam quantas vezes foi aumentada a concentração de agliconas no extrato de soja, após o tratamento enzimático.

Tabela 11: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pelo extrato enzimático bruto do *T. aurantiacus*.

Isoflavonas	Controle área do pico (mAU*min)	Hidrolisado área do pico (mAU*min)	Fator de conversão (vezes)*
Daidzeína	37,1	188,25	5,1
Gliciteína	7,21	95,91	13,3
Genisteína	47,91	373,36	7,8

Tabela 12: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pela β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*.

Isoflavonas	Controle área do pico (mAU*min)	Hidrolisado área do pico (mAU*min)	Fator de conversão (vezes)*
Daidzeína	37,1	167,28	4,51
Gliciteína	7,21	81,63	11,32
Genisteína	47,91	298,0	6,22

Tabela 13: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pelo extrato enzimático bruto do *A. pullulans*.

Isoflavonas	Controle área do pico (mAU*min)	Hidrolisado área do pico (mAU*min)	Fator de conversão (vezes)*
Daidzeína	37,1	184,71	5,0
Gliciteína	7,21	94,38	13,1
Genisteína	47,91	387,35	8,1

Tabela 14: Concentrações de agliconas presentes no controle e no hidrolisado pela β -glicosidase purificada do *A. pullulans*.

Isoflavonas	Controle área do pico (mAU*min)	Hidrolisado área do pico (mAU*min)	Fator de conversão (vezes)*
Daidzeína	37,1	178,16	5,1
Gliciteína	7,21	92,18	13,3
Genisteína	47,91	325,94	6,8

* **Fator de conversão (FC):** Comparação em vezes, entre a quantidade de agliconas presente no controle (sem enzima) com a obtida após o tratamento enzimático (hidrolisado). Os valores foram calculados dividindo a área do hidrolisado pela área do controle. **FC = área hidrolisado / área do controle.**

As isoflavonas glicosiladas que foram analisadas no presente trabalho, daidzina, glicitina e genistina, apresentam apenas uma molécula de glicose em sua estrutura (LIMA, 2003; PARK et al., 2002; RIEDL et al., 2005). Por tanto, a presença de outras enzimas não favorecem a eficiência catalítica das β -glicosidases. Fato que explica a equivalência obtida na hidrólise com as enzimas brutas e purificadas.

Podemos concluir que as β -glicosidases produzidas pelos microrganismos, *T. aurantiacus* e *A. pullulans*, apresentam excelente potencial para a hidrólise das isoflavonas da soja. O que nos estimula a dar continuidade ao trabalho, no sentido de otimizar a hidrólise enzimática destes compostos, viabilizando a aplicação industrial das enzimas.

VII. CONCLUSÕES

As duas β -glicosidases foram purificadas à homogeneidade apresentando um elevado fator de purificação e um considerável rendimento. A hiper-glicosilação apresentada pela enzima do *A. pullulans* impossibilitou a determinação exata da massa molecular da proteína, no entanto, os resultados obtidos permite-nos inferir que a proteína apresenta massa maior que 250 kDa. A massa molar estimada para a β -glicosidase do *T. aurantiacus* foi cerca de 120 kDa. Os dados obtidos no presente trabalho comparados aos descritos na literatura, permitem concluir que microrganismo *T. aurantiacus* apresenta variabilidade genética que resulta na síntese de diferentes isoformas de β -glicosidase.

As análises do efeito do pH e temperatura sobre a estabilidade das β -glicosidases, associados aos parâmetros termodinâmicos obtidos no presente trabalho, confirmam a maior estabilidade da enzima produzida pelo microrganismo mesofílico *A. pullulans*. Provavelmente a expressiva estabilidade apresentada por esta enzima está associada a hiper-glicosilação protéica descrita anteriormente.

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos utilizando pNP β G como substrato. A enzima do *T. aurantiacus* apresentou um menor valor de K_m e uma maior V_{max} , quando comparados com os valores obtidos para a enzima do *A. pullulans*, indicando uma maior afinidade pelo substrato. Ambas as β -glicosidases hidrolisaram diferentes substratos glicosídeos, sugerindo uma ampla especificidade para as duas, porém, com perfis de hidrólise distintos.

Ambas as enzimas foram fortemente inibidas por glicose, mas a inibição da β -glicosidase do *A. pullulans* foi completamente revertida quando a concentração de substrato foi aumentada, o que a torna bastante interessante para os processos de sacarificação. O mesmo não foi observado para a enzima do *T. aurantiacus*. A presença de etanol aumentou o potencial catalítico da β -glicosidase purificada do *T. aurantiacus*, o que caracteriza a presença de

atividade glicosil transferase. O mesmo não foi observado para a enzima do *A. pullulans*. A elevada atividade na presença de etanol associada à estabilidade térmica apresentada pela enzima do *T. aurantiacus*, são características muito apreciáveis para a utilização da mesma em processos de hidrólise enzimática da celulose. A inibição exercida pela glicose poderia ser contornada em processos de simultânea sacarificação e fermentação.

Tanto o extrato enzimático bruto como as enzimas purificadas, de ambos os microrganismos, hidrolisaram os terpenos glicosídeos extraídos da uva Isabel. O extrato enzimático bruto apresentou uma maior eficiência hidrolítica. Provavelmente a presença de diferentes açúcares ligados aos precursores aromáticos, dificultaram a ação das β -glicosidases isoladamente. O extrato enzimático bruto e as enzimas purificadas também hidrolisaram as isoflavonas extraídas da soja. Não foram observadas diferenças significativas entre o potencial catalítico das β -glicosidases purificadas e do extrato enzimático bruto. As isoflavonas glicosiladas que foram analisadas no presente trabalho, daidzina, glicitina e genistina, apresentam apenas uma molécula de glicose em sua estrutura. O que explica a equivalência obtida na hidrólise com as enzimas brutas e purificadas.

Os resultados obtidos até o presente momento, estimulam a continuidade do trabalho, no sentido de viabilizar a aplicação industrial destas enzimas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, v. 27, p. 67-72, 2004.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 26, p. 52-55, 2002.

ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 24, p. 30-35, 2002.

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

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

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M.J.; AGOSIN, E. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1453-1459, 2003.

BRUINS, M.E; JANSSEN, A.E.M.; BOOM, R.M. Thermozyms and Their Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 90, p. 155 – 181, 2001.

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

CARDONA C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDNGNON, J.R. Activity of β -glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 873-878, 2000.

CATALUÑA, E. *As Uvas e Os Vinhos*, Rio de Janeiro, Editora Globo, cap. 2, p. 27-6, 1988.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p. 810-818, 2003.

COUTINHO, M.R. Obtenção de antocianinas presentes no repolho roxo (*Brassica oleracea*) 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DA-SILVA, R. *Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de **Humicola sp.** 179-5 e aplicação destas enzimas* 1992. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO C.M.L. Pectinases, hemicelulases e celulases substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 249-250, 1997.

GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, 86-93, 2001.

GROMIHA, M.M. Important inter-residue contacts for enhancing the thermal stability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry*, v. 91, p. 71-77, 2001.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; PIEN, S.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, v. 55, p. 151-156, 1997.

HAYASHI, S.; MATSUMOTO, K.; WADA, Y.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Stable β -glucosidase from *Aureobasidium* sp. *Letters in Applied Microbiology*, v. 17, p. 75-77, 1993.

HAYASHI, S.; SAKO, S.; YOKOI, H.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*, v. 22, p. 160-163, 1999.

HEMINGWAY K.M.; ALSTON, M.J.; CHAPPELL, C.G.; TAYLOR, A.J. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. *Carbohydrate Polymers*, v. 38, p. 283-286, 1999.

HERNÁNDEZ, L.F.; ESPINOSA, J.C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, M.; BRIONES, A. β -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 80, p. 171-176, 2003.

HO, P. L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 13, p. 24-26, 2000.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*, v. 11, p. 1-5, 2000.

KALOGERIS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KATAPODES, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MADRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*

under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v.38, p. 1099-1104. 2003.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153-156, 2004.

KIMURA, I.; YOSHIOKA, N.; TAJIMA, S. Purification and characterization of a β -glucosidase with β -xylosidase activity from *Aspergillus sojae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 87, p. 538-541, 1999.

KWON, K.; LEE, J.; KANG, H.G.; HAH, Y.C. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*, São Paulo, Sarvier, cap. 11, p. 205-222, 1990.

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

LEITE, R.S.R., BOCCHINI, D.A., MARTINS, E.S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.137, p. 281 - 288, 2007a.

LEITE, R.S.R., GOMES, E., SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium*

pullulans and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1101-1106, 2007b.

LIMA, A.F. *Produção e caracterização de β -glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas* 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LONGO, M.A.; COMBES, D. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.74, p. 25-32, 1999.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRA, L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 267-275, 1951.

LUCARINI, A.C.; KILKIAN, B.V.; PESSOA, A. Precipitação in: *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri, Manole, cap. 5, p. 89-113, 2005.

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

MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 27, p. 183-190, 2004.

MANFROI, V. *Degustação de Vinhos*, Porto Alegre, Editora da UFRGS, cap. 1, p. 19-39, 2004.

MARTINS, E. *Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termófilo **Thermoascus aurantiacus** através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais* 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências e

Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

MATEO, J.J.; GENTILINI, N.; HUERTA, T.; JIMÉNEZ, M.; DI STEFANO, R. Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography A*, v. 778, p. 219-224, 1997.

MORAIS, H.; RAMOS, C.; MATOS, N.; FORGÀCS, E.; CSERHÁTI, T.; ALMEIDA, V.; OLIVEIRA, J.; DARWISH, Y.; ILLÈS, Z. Liquid chromatographic and electrophoretic characterization of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *Journal of Chromatography B*, v. 770, p. 111-119, 2002.

OKUYAMA, M.; TANIMOTO, Y.; ITO, T.; ANZAI, A.; MORI, H.; KIMURA, A.; MATSUI, H.; CHIBA, S. Purification and characterization of the hyperglycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 472-480, 2005.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, p. 631-639, 2004.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.P. *Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico **Thermoascus aurantiacus*** 2002. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.D.; Gomes, E.; Da-Silva, R. Purification and Characterization of two β -Glucosidases from Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Folia microbiologica*, v. 47, p. 685-690, 2002.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown

on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 18, p. 37-45, 2003.

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

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 130-135, 2002.

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

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*, São Paulo, Makrom Books, v. 1, cap. 6, p. 166-187, 1996.

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

PESSOA, A.; KILIKIAN, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri, Manole, cap. 1, p. 1-5, 2005.

RASHID, M.H.; SIDDIQUI, K.S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 109-115, 1998.

RIEDL, K.M.; ZHANG, Y.C.; SCHWARTZ, S.J.; VODOVOTZ, Y. Optimizing dough proofing conditions to enhance isoflavone aglycones in soy bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 8253-8258, 2005.

SAHA, B.C.; FREER, S.N.; BOTHAST, R.J. Production, purification and properties of thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* Oct., v. 60, p. 3774-3780, 1994.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid – state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 1474-1479, 1998.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R.N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Properties of endogenous β -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial technology*, v. 31, p. 1030-1035, 2002.

STRYER, L. *Biochemistry*, New York, W.H. Freeman and Company, cap. 18, p. 463-482, 1995.

TOMAZIC, S.J.; KLIBANOV, A.M. Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* α -amylases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 3086-3091, 1988.

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

TURAN, Y.; ZHENG, M. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Moscow)*, v. 70, p. 1363-1368, 2005.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p.1-43, 2001.

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

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

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; PÉREZ, A.I.B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 420–425, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*, New York, Wiley, cap 5, p. 71-104, 1995.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. *Fundamentos de Bioquímica*, Porto Alegre, Artmed, cap. 8, p. 196-214, 2000.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two β -glucosidase from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1649, p. 74-84, 2003.

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

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

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