

GABRIELA PICCOLO MAITAN

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASES
LIVRE E IMOBILIZADA DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

GABRIELA PICCOLO MAITAN

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASES
LIVRE E IMOBILIZADA DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Pollyanna Amaral Viana
(Coorientadora)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Coorientador)

Prof. Eduardo Basílio de Oliveira

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)

Dedico este trabalho

À Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

À Rafael Ferreira Alfenas

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ter concedido o dom da vida, por me permitir construir este trabalho e por estar sempre comigo nos momentos difíceis.

À minha mãe, Maria Angelina, pelo incentivo, pelos conselhos, pelo exemplo de caráter e, principalmente, pelas orações.

Ao meu pai, Denizart, pelo carinho, pela empolgação em todas as etapas da minha vida e por me ensinar a importância dos estudos.

Aos meus irmãos, Júlio Humberto e Paula, que sempre me apoiaram e tiveram muita paciência comigo. Muito obrigada pela confiança e pela amizade de vocês!

Ao meu noivo Rafael Ferreira Alfenas, que está sempre presente em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada pelo amor, pela atenção, pela paciência e por sempre solucionar os meus problemas!

À Cláudia, por estar sempre por perto, com os conselhos mais sábios.

Aos meus sogros, Rita e Acelino, por toda a participação, preocupação e torcida durante a realização deste trabalho.

À toda minha família que sempre está presente, me dá forças e me apoia em todas as minhas decisões. Principalmente à Valéria Piccolo Barcelos Bissoli, que muito contribuiu para este trabalho.

Agradeço de maneira muito especial à minha professora e orientadora Valéria Monteze Guimarães, pela paciência, pelo carinho, pelos conselhos e por toda a atenção dedicada à realização deste trabalho. Acima de tudo agradeço pela sua amizade e por me incentivar e empolgar todas as vezes que eu ía em sua sala.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela amizade, pelo carinho e pelos conhecimentos transmitidos durante esses anos.

À professora Pollyanna Amaral Viana que me abriu as portas para que eu hoje pudesse estar com esta equipe maravilhosa e por aceitar participar deste trabalho.

Aos professores Eduardo Basílio de Oliveira e Luciano Gomes Fietto, por se disponibilizarem a me auxiliar nas correções deste trabalho.

A todos os demais professores pelos ensinamentos, que contribuíram para minha formação profissional.

À Lorena e Rômulo, pelo tempo dedicado a este trabalho e pela amizade que acabamos construindo. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Enzimologia Aplicada e Análises Bioquímicas, onde a maior parte deste experimento foi realizada. Obrigada a vocês todos por tornarem meus dias mais felizes!

Um agradecimento especial aos amigos Maíra, Daniel, Larissa e Sérgio, pela enorme contribuição que deram neste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda e pela amizade de vocês!

Também agradeço aos amigos dos Laboratórios de Biotecnologia Molecular e Proteômica e Bioquímica de Proteínas por serem sempre tão solícitos e prestativos em tudo o que precisamos para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela atenção, pela amizade e por literalmente me salvar em várias ocasiões.

Ao funcionário do BIOAGRO Cássio, que sempre foi muito solícito nos empréstimos dos materiais.

A todos os meus amigos que mesmo distantes estiveram sempre presentes, em especial Juliana, Luciana, Solimar e Sylvia. Meninas, muito obrigada pela força!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo suporte técnico concedido.

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

Enfim, agradeço a todos aqueles que passaram pela minha vida e contribuíram para que eu pudesse crescer como pessoa! Mais uma vez, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Gabriela Piccolo Maitan, filha de Denizart Ribeiro Maitan e Maria Angelina Piccolo Maitan, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 18 de janeiro de 1986.

Em março de 2004 iniciou seus estudos em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

De setembro de 2006 a agosto de 2007 participou de um programa sanduíche em que cursou um ano de sua graduação na *École Nationale Supérieure d'Agrologie et des Industries Alimentaires*, em Nancy, na França.

Em janeiro de 2009, graduou-se em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em julho de 2009, iniciou o Curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 22 de fevereiro de 2011, com defesa de dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos Gerais	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. β -Glicosidases	4
3.2. β -Glicosidases de leveduras.....	5
3.3. Aplicações biotecnológicas de β -glicosidases	6
3.4. Mecanismo de ação de β -glicosidases	9
3.5. Aspectos gerais da produção de enzimas de microrganismos	11
3.6. Permeabilização de células	12
3.7. Imobilização de células.....	13
3.8. Imobilização de células em alginato de cálcio	15
3.9. Considerações sobre a levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Reagentes	20
4.2. Microrganismo	20
4.3. Manutenção da cultura	20
4.4. Meios de cultura, fontes de carbono e tempos para produção de β -glicosidases por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	21
4.5. Cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	21
4.6. Extração de β -glicosidases	22
4.7. Purificação da β -glicosidase intracelular.....	24
4.7.1. Diálise.....	24
4.7.2. Cromatografia de troca iônica	24
4.7.3. Ultrafiltração	25
4.7.4. Cromatografia de filtração em gel	25
4.7.5. Cromatografia de interação hidrofóbica.....	25
4.8. Determinação da atividade da β -glicosidase	26
4.8.1. Com o substrato sintético pNP β Glc.....	26
4.8.2. Com açúcares redutores	26

4.8.3. Com açúcar não redutor	27
4.8.4. Com polímero	27
4.8.5. Com outros substratos sintéticos	28
4.9. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos...	28
4.10. Determinação do grau de pureza da β -glicosidase	29
4.10.1. Eletroforese	29
4.10.2. Coloração dos géis de eletroforese	29
4.11. Determinação da massa molecular	30
4.11.1. Por eletroforese	30
4.11.2. Por filtração em gel.....	30
4.12. Permeabilização das células de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	31
4.13. Imobilização das células permeabilizadas de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	31
4.13.1. Efeito da relação célula:alginate na atividade da β -glicosidase.....	32
4.13.2. Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginate na atividade da β -glicosidase	32
4.13.3. Efeito do número de esferas de alginate ensaiadas na atividade da β -glicosidase	32
4.13.4. Efeito da agitação na determinação da atividade de β -glicosidase	33
4.14. Caracterização enzimática	33
4.14.1. Efeito do pH.....	33
4.14.2. Efeito da temperatura	33
4.14.3. Análise de termoestabilidade	34
4.14.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da β -glicosidase	34
4.14.5. Meia-vida da β -glicosidase	34
4.14.6. Determinação dos parâmetros cinéticos	35
4.14.7. Determinação da especificidade da β -glicosidase para diversos substratos.....	35
4.14.8. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASES POR <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 ..	37
5.1.1. Cultivo da levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	38
5.1.2. Atividade de β -glicosidases de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1.....	40

5.2. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE INTRACELULAR DE <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	48
5.2.1. Purificação da β -glicosidase intracelular produzida pela levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	49
5.2.2. Determinação da massa molecular	52
5.2.3. Caracterização Enzimática	55
5.2.3.1. Efeito do pH	55
5.2.3.2. Efeito da temperatura.....	57
5.2.3.3. Análise da termoestabilidade	58
5.2.3.4. Meia-vida da β -glicosidase intracelular	59
5.2.3.5. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})	61
5.2.3.6. Especificidade da β -glicosidase intracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1.....	62
5.2.3.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase intracelular purificada de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	65
5.3. IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 EM ALGINATO DE CÁLCIO	68
5.3.1. Efeito do tempo de permeabilização das células de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 na atividade de β -glicosidase	69
5.3.2. Estudo das condições de imobilização das células permeabilizadas de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	70
5.3.2.1. Efeito da relação célula:alginato na atividade da β -glicosidase .	70
5.3.2.2. Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato na atividade da β -glicosidase.....	71
5.3.2.3. Efeito do número de esferas de alginato ensaiadas na atividade da β -glicosidase	72
5.3.2.4. Efeito da agitação durante o ensaio de determinação da atividade enzimática na atividade de β -glicosidase	73
5.3.3. Caracterização da β -glicosidase contida em células imobilizadas de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	75
5.3.3.1. Efeito do pH	75
5.3.3.2. Efeito da temperatura.....	77
5.3.3.3. Análise da termoestabilidade	78

5.3.3.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela β -glicosidase contida nas células imobilizadas de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1.....	79
6. CONCLUSÕES.....	81
7. PERSPECTIVAS	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO

MAITAN, Gabriela Piccolo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Produção, purificação e caracterização de β -glicosidases livre e imobilizada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientadores: Pollyanna Amaral Viana e Sebastião Tavares de Rezende.

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer melhores condições de cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 para produção de β -glicosidases, purificar e caracterizar esta enzima, imobilizar as células da levedura contendo a β -glicosidase intracelular em alginato de cálcio e caracterizar a enzima imobilizada. Para produção da β -glicosidase intracelular, a levedura foi cultivada por 12 h em meio YP contendo celobiose como fonte de carbono. A enzima foi purificada por cromatografias de troca iônica, filtração em gel e interação hidrofóbica e, ao final do processo, a β -glicosidase apresentou um fator de purificação de 99,3 vezes, com um rendimento de 8 %. A massa molecular da enzima foi de aproximadamente 198 kDa, quando estimada por SDS-PAGE, e de aproximadamente 178 kDa, quando estimada por filtração em gel. A enzima apresentou atividade máxima em pH 6,0 e na temperatura de 45 °C. Os valores de meia-vida para a β -glicosidase foram de 356, 312, 73 e 5 minutos, nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C, respectivamente. Os valores de K_M e V_{max} , utilizando o substrato $pNP\beta Glc$, foram 0,434 mM e 0,021 mM/min, respectivamente. A enzima apresentou especificidade absoluta para glicose em posição β e a atividade enzimática foi completamente inibida por cloreto de ferro, nitrato de prata e SDS, todos nas concentrações finais de 0,2 e 2 mM. Após imobilização das células de *D. hansenii* em alginato de cálcio, a enzima apresentou máxima atividade em pH 5,5 e na temperatura de 50 °C. A imobilização proporcionou à enzima maior termoestabilidade nas temperaturas de 45 e 50 °C. Os valores de $K_{M\ app.}$ e de $V_{max\ app.}$, com o substrato $pNP\beta Glc$, foram, respectivamente, 4,35 mM e 3,63 μmol de $pNP/min/g$ célula. *D. hansenii* é uma levedura não patogênica e encontrada em diversos tipos de alimentos. Assim, a utilização das células desta levedura imobilizadas em alginato de cálcio, na indústria de alimentos, não acarretaria problemas para a saúde humana. Neste caso, a enzima é mais estável e o processo é mais econômico por não haver gastos com purificação enzimática e ainda pela possibilidade de reutilização das esferas de alginato contendo a enzima β -glicosidase.

ABSTRACT

MAITAN, Gabriela Piccolo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Production, purification and characterization of free and immobilized β -glucosidases from *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-Advisers: Pollyanna Amaral Viana and Sebastião Tavares de Rezende.

The objectives of this work were to establish the best conditions for *Debaryomyces hansenii* UFV-1 yeast cultivation for β -glucosidase production, purification and characterization. In addition, another objective was to immobilize the yeast cells containing the intracellular β -glucosidase in calcium alginate and characterize the immobilized enzyme. The yeast produced an intracellular β -glucosidase when grown for 12 h in YP medium containing cellobiose as carbon source. The enzyme was purified by ion exchange, gel filtration and hydrophobic interaction chromatographies and at the end of the process, the β -glucosidase showed a purification factor of 99.3 times, with a yield of 8 %. The molecular mass was approximately 198 kDa when estimated by SDS-PAGE, and approximately 178 kDa when estimated by gel filtration. The maximum activity occurred at pH 6.0 and temperature of 45 °C. The intracellular β -glucosidase half-life values were 356, 312, 73 and 5 minutes, at temperatures of 40, 45, 50 and 55 °C, respectively. The K_M and V_{max} values using the substrate $pNP\beta$ Glc were 0.434 mM and 0.021 mM/min, respectively. The enzyme showed absolute specificity for glucose in β position and the enzymatic activity was completely inhibited by ferric chloride, silver nitrate and SDS, all of them at final concentrations of 0.2 and 2 mM. The yeast cells were immobilized in calcium alginate and the enzyme showed pH and temperature optima of 5.5 and 50 °C, respectively. The immobilization provided higher enzyme thermostability at temperatures of 45 and 50 °C. The $K_{M\ app}$ and $V_{max\ app}$ values, with the substrate $pNP\beta$ Glc, were 4.35 mM and 3.63 mmol of pNP /min/g cell, respectively. *D. hansenii* is a nonpathogenic yeast and it is found in various types of food. So, the use of immobilized cells of this yeast in calcium alginate in food industry would not cause problems for human health. In this case, the enzyme is more stable and the process is more economical because there is no spending on enzyme purification and also the possibility of reuse of alginate beads containing the enzyme β -glucosidase.

1. INTRODUÇÃO

β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β -(1,4) terminais, função essencial a muitos processos biológicos. Estas enzimas são alvo de grande interesse para a bioquímica, medicina e biotecnologia. As funções fisiológicas postuladas para a enzima β -glicosidase são diversas: hidrólise dos isoflavonóides glicosídeos em soja desenvolvendo agliconas (Xue *et al.*, 2009), catabolismo do glicosídeo ceramida em tecidos humanos, metabolismo de cianoglicosídeos, defesa de plantas contra patógenos (Khan e Akhtar, 2010), síntese de diversos oligossacarídeos e glicoconjugados, aprimoramento do *flavor* de alguns alimentos e bebidas (Ducret *et al.*, 2002), produção de etanol a partir da bioconversão da celulose, gerando combustíveis renováveis (Bhatia *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2010), entre outras.

As β -glicosidases podem ser obtidas de humanos (Hays *et al.*, 1996), insetos (Terra e Ferreira, 1994), plantas (Geerlings *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2002) e microrganismos. A enzima tem sido produzida por bactérias (Gueguen *et al.*, 1997), fungos (Dhake e Patil, 2005) e leveduras (González-Pombo *et al.*, 2008).

Debaryomyces hansenii é uma espécie de levedura não patogênica, amplamente encontrada em diversos tipos de alimentos, principalmente produtos fermentados ricos em proteínas, como salsichas e queijos (Encinas *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2002) e que vem sendo estudada para a produção de enzimas hidrolíticas, especialmente α -galactosidases (Viana *et al.*, 2006, 2007; Junior *et al.*, 2009). Estudos indicam que esta levedura é também capaz de produzir β -glicosidase (Riccio *et al.*, 1999, Yanai e Sato, 1999). Assim, a utilização das células desta levedura ou da enzima produzida pela mesma não acarretaria problemas no processamento de alimentos.

Ultimamente, as indústrias têm utilizado enzimas isoladas de microrganismos para obtenção de vários produtos. A demanda para tais enzimas é elevada porque as mesmas são específicas e não produzem resíduos tóxicos (Tortora *et al.*, 2005). Os microrganismos têm a vantagem de alta produção de enzimas e, assim, há um grande interesse por β -glicosidases de leveduras, com a finalidade de aplicação em processos industriais.

A utilização de enzimas em processos industriais vem aumentando significativamente. Este aumento é provocado principalmente pela tendência mundial de substituição de processos industriais já estabelecidos por novos, especialmente biotecnológicos, mais específicos, de menor consumo energético e menos agressivos ao ambiente. Porém, os métodos que utilizam enzimas puras têm custo elevado pois os processos de purificação são caros e trabalhosos e, além disso, a enzima permanece no produto final e não pode ser reutilizada. Uma alternativa para estes problemas é a imobilização de células que contenham a enzima de interesse. Após imobilização, as enzimas intracelulares continuam ativas e podem agir sobre seus substratos, com a vantagem de não haver custos com extração e purificação, além de permitir sua reutilização. Segundo Tortora *et al.* (2005), para a maioria das finalidades industriais, as enzimas devem estar imobilizadas na superfície de algum suporte sólido e então manipuladas de forma que possam converter um fluxo contínuo de substrato a produto, sem haver perdas.

Assim, a imobilização de células de *D. hansenii* UFV-1 que contenham β -glicosidase intracelular, que não é patogênica, pode ser uma alternativa promissora e econômica para melhorar a qualidade de diversos produtos alimentícios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram estabelecer as melhores condições de cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 para a produção de β -glicosidases, purificar as enzimas obtidas para sua caracterização cinético-bioquímica, bem como permeabilizar e imobilizar as células da levedura contendo a β -glicosidase intracelular em alginato de cálcio para posterior comparação das propriedades das enzimas livre e imobilizada.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as melhores condições para a produção de β -glicosidases por *D. hansenii* UFV-1;
- Isolar e purificar as β -glicosidases obtidas;
- Caracterizar, bioquímica e cineticamente, a enzima purificada: efeitos de pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade em diferentes valores de pH, efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática, determinação da meia-vida da enzima, da especificidade por diferentes substratos naturais, sintéticos e polímeros e determinação dos valores de K_M e V_{max} ;
- Permeabilizar e imobilizar as células de *D. hansenii* UFV-1 contendo a β -glicosidase intracelular;
- Caracterizar, bioquímica e cineticamente, a enzima contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1: efeitos de pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade em diferentes valores de pH, e determinação do valor de $K_{M\ app.}$ e $V_{max\ app.}$;
- Comparar as propriedades da β -glicosidase livre e imobilizada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. β -Glicosidases

As β -glicosidases ou β -D-glicosídeo glicohidrolases (EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β -(1,4) terminais (Figura 1). São enzimas que possuem funções variadas e se encontram amplamente difundidas na natureza. O interesse inicial no estudo das β -glicosidases surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (Lynd *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). β -Glicosidases são largamente distribuídas em plantas, fungos e leveduras e apresentam uma série de propriedades enzimáticas de acordo com a sua origem e as condições de crescimento do microrganismo produtor. As β -glicosidases constituem um grupo majoritário entre as glicosil hidrolases. São enzimas bem caracterizadas, biológica e industrialmente importantes, e atualmente têm sido objeto de vários estudos, devido à possibilidade de sua utilização em um grande número de processos biotecnológicos (Cairns e Esen, 2010).

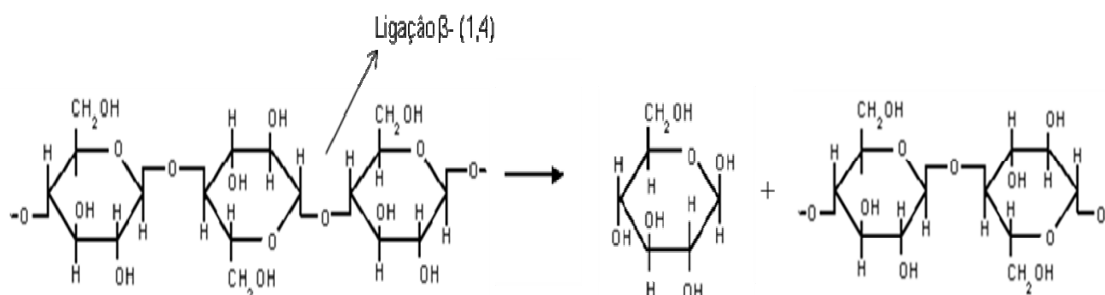


Figura 1: Ação hidrolítica de β -glicosidases e seu ponto de atuação.

β -glicosidases representam um grupo heterogêneo de enzimas e, em geral, dois sistemas de classificação são descritos na literatura, sendo baseados na especificidade de substrato e na identidade da sequência de aminoácidos (Bathia *et al.*, 2002).

Na classificação baseada na especificidade de substrato, as β -glicosidases são divididas em três grupos: aril β -glicosidases, que agem em aril-glicosídeos; celobiasas verdadeiras, que são capazes de hidrolisar celobiose; e β -glicosidases com ampla especificidade de substrato. Dados da

literatura demonstram que a grande maioria das β -glicosidases já caracterizadas pertence a esta última categoria (Bhatia *et al.*, 2002).

Entre as classificações que foram propostas para a identificação das β -glicosidases baseada na identidade de sequência de aminoácidos, a mais aceita é aquela baseada tanto na similaridade das sequências de aminoácidos quanto nos padrões de enovelamento destas enzimas (Souza, 2009). Nesta classificação, as glicosil hidrolases são classificadas em 88 famílias e as β -glicosidases, que representam um grupo importante entre as glicosil hidrolases, estão reunidas nas famílias 1 e 3. A família 1 inclui β -glicosidases originárias de arqueobactérias, plantas e mamíferos; a estrutura tridimensional de várias destas enzimas já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de α -hélices e folhas β , além da presença de vários resíduos altamente conservados, localizados nas proximidades do sítio ativo. Na família 3 estão classificadas 44 β -glicosidases, originárias de bactérias, fungos e leveduras, sendo o estudo desta família um pouco mais restrito (Bhatia *et al.*, 2002).

3.2. β -Glicosidases de leveduras

As β -glicosidases podem ser obtidas de humanos (Hays *et al.*, 1996), insetos (Terra e Ferreira, 1994), plantas (Geerlings *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2002) e microrganismos. A enzima tem sido produzida por bactérias (Gueguen *et al.*, 1997), fungos (Dhake e Patil, 2005) e leveduras (González-Pombo *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos têm mostrado que algumas leveduras possuem atividade de β -glicosidase (McMahon *et al.* 1999; Riccio *et al.* 1999; Manzanares *et al.* 2000). Algumas espécies pertencentes à *Candida spp.* e *Debaryomyces spp.* são produtoras de β -glicosidases extracelulares (Rosi *et al.* 1994; McMahon *et al.*, 1999) enquanto que em *Hanseniaspora spp.* e *Kloeckera spp.* a enzima tem sido localizada essencialmente dentro das células (Vasserot *et al.*, 1989, 1990; Rosi *et al.*, 1994). Em algumas espécies de leveduras, como *Brettanomyces spp.*, *Dekkera spp.*, *Pichia spp.*, e *Hansenula spp.*, as β -glicosidases reportadas são tanto extra como intracelulares (Rosi *et al.*, 1994; McMahon *et al.*, 1999; Manzanares *et al.*, 2000; Spagna *et al.*, 2002). Nestas espécies de leveduras, a repressão da biossíntese da enzima foi observada quando utilizou-se glicose como fonte de carbono (Blondin *et al.*,

1983; Vasserot *et al.*, 1989; Charoenchai *et al.*, 1997). Mateo e Di Stefano (1997) demonstraram que, em *Saccharomyces cerevisiae*, a atividade de β -glicosidase é fracamente sensível à presença de glicose, de acordo com prévias observações por outros autores (Darriet *et al.*, 1988; Delcroix *et al.*, 1994).

As β -glicosidases produzidas pelas leveduras *Candida molischiana*, *Candida wickerhamii* e *Saccharomyces cerevisiae* são menos sensíveis à inibição por altas concentrações de glicose e têm uma vasta especificidade por agliconas (Gunata *et al.*, 1990; Darriet *et al.*, 1988).

A levedura *D. hansenii* produz uma β -glicosidase extracelular cuja atividade não é inibida por altas concentrações de etanol e de glicose e não é grandemente influenciada por valores ácidos de pH e por baixas temperaturas (Rosi *et al.*, 1994, Rosi *et al.*, 1996). Além disso, também já foi relatado que esta levedura produz β -glicosidase intracelular (Riccio *et al.*, 1999, Yanai e Sato, 1999).

3.3. Aplicações biotecnológicas de β -glicosidases

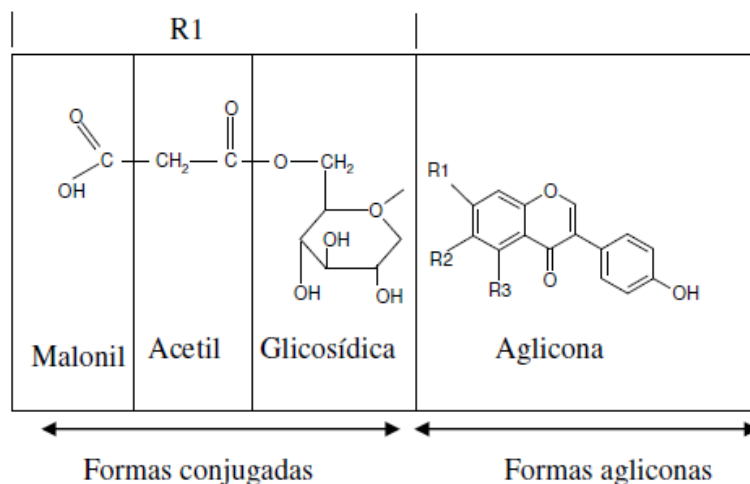
Juntamente com outras enzimas, as β -glicosidases tem sido aplicada, por exemplo, na indústria de alimentos, no processamento de frutas, para melhorar a qualidade do sabor, aroma, coloração, clarificação e viscosidade de sucos (Daenen *et al.*, 2008). Outra aplicação biotecnológica de β -glicosidases inclui a redução da viscosidade de certos polissacarídeos empregados em preparações comerciais de alimentos (Hashimoto *et al.*, 1998).

A indústria vinícola também tem feito uso de β -glicosidases para melhorar a qualidade de vinhos (Tate e Reynolds, 2006). A atividade de β -glicosidases produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* (Decker *et al.*, 2000), *Saccharomyces cerevisiae* (Hernández *et al.*, 2003), *Oenococcus oeni* (Barbagallo *et al.*, 2004), entre outros, levam à hidrólise de compostos não voláteis a terpenos voláteis, contribuindo para aumentar a produção de aroma durante a fabricação de vinhos.

Além disso, as β -glicosidases têm sido utilizadas na hidrólise das formas β -glicosídicas das isoflavonas presentes em produtos de soja às formas agliconas e à glicose (Bhatia *et al.*, 2002, Xue *et al.*, 2009). O interesse em soja e produtos a base de soja tem crescido significativamente nas últimas décadas

devido aos seus benefícios nutricionais e promotores da saúde (Marazza *et al.*, 2009). Muitos pesquisadores têm se voltado para o estudo dos fitoquímicos da soja, especialmente as isoflavonas, por seus efeitos benéficos à saúde. As isoflavonas da soja têm uma importante função na prevenção da osteoporose, de doenças cardiovasculares, de vários tipos de câncer dependentes de hormônio, como câncer de mama e de próstata, e no alívio dos sintomas do climatério (Adlercreutz, 2002; Omoni e Aluko, 2005) Também são eficazes na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo total e do LDL colesterol, reduzindo assim os riscos de doenças cardiovasculares (Cassidy *et al.*, 2003; Branca e Lorenzetti, 2005; Park *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Cashman, 2007; Duffy *et al.*, 2007; Syed *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007).

As isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides, que possuem três anéis benzeno em sua estrutura (Setchell e Cole, 2003). Os diferentes radicais ligados a esses anéis dão origem às 12 diferentes formas de isoflavonas (Figura 2), divididas em quatro grupos: os glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), as formas malonil (malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina), as formas acetil (acetildaizina, acetilgenistina e acetilglicitina), e as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Park *et al.*, 2001). A forma química na qual a isoflavona se encontra é importante devido à sua influência na biodisponibilidade, atividade biológica e, então, nos efeitos fisiológicos alcançados (Setchell *et al.*, 2002; Tsangalis *et al.*, 2005, 2007).



Isoflavonas	R1	R2	R3
Genisteína	OH	H	OH
Daidzeína	OH	H	H
Gliciteína	OH	OCH ₃	H
Genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
Daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
Glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
Acetil-genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	OH
Acetil-daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	H
Acetil-glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	OCH ₃	H
Malonil-genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	OH
Malonil-daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	H
Malonil-glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Figura 2: Estrutura química dos isoflavonóides naturalmente encontrados em soja (Ribani, 2008).

Muitos pesquisadores têm atribuído o efeito biológico das isoflavonas às formas agliconas e não às formas glicosídicas (Kaya *et al.*, 2008; Izumi *et al.*, 2000; Kawakami *et al.*, 2005). As agliconas são altamente bioativas por serem mais facilmente absorvidas pela mucosa intestinal (Brown *et al.*, 2002). As isoflavonas nas formas glicosídicas são mais polares e solúveis em água. Assim, são mais difíceis de serem absorvidas pelo epitélio intestinal e têm atividades biológicas relativamente fracas quando comparadas às agliconas correspondentes (Setchell *et al.*, 2002).

Outro motivo pelo grande interesse por β -glicosidases está focado na sua aplicação para a hidrólise de celulose (Bhatia *et al.*, 2002). A celulose é a biomolécula mais abundante na natureza e a maior fonte de energia renovável na terra e sua conversão em açúcares solúveis é de grande interesse biotecnológico. As β -glicosidases são componentes de um sistema de celulasas no qual três categorias de enzimas, endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), agem

sinergisticamente para catalisar a conversão de celulose em glicose e outros intermediários (Pal *et al.*, 2010).

β -glicosidases também têm sido aplicadas na indústria de combustíveis para a produção de etanol a partir da celulose. Este processo permite a produção de combustíveis renováveis (Howard *et al.*, 2003).

Em adição às suas aplicações industriais e funções na sacarificação de materiais celulolíticos, as β -glicosidases apresentam importantes funções biológicas em tecidos de plantas, tais como, ativação de fitormônios (Estruch *et al.*, 1991), resistência a fitopatógenos e síntese de β -glucanas durante o desenvolvimento da parede celular (Khan e Akhtar, 2010).

Em humanos e outros mamíferos, a β -glicosidase está envolvida na hidrólise de glicocerebrosídeos. A deficiência desta enzima leva à doença de Gaucher, uma doença genética e progressiva resultante do acúmulo de glicocerebrosídeos nos lisossomos (Khan e Akhtar, 2010). Além disso, a lisozima, uma enzima secretada nas lágrimas para prevenir infecções bacterianas dos olhos, também é uma β -glicosidase que cliva ligações β -(1,4) entre os açúcares ácido N-acetil glucosamina e ácido N-acetil murâmico, localizados na parede celular de bactérias gram-negativas (Khan e Akhtar, 2010).

As β -glicosidases catalisam a clivagem seletiva de ligações glicosídicas que são essenciais em muitas vias biológicas cruciais como a degradação de polissacarídeos estruturais e de estocagem, sinalização celular, oncogênese, interações hospedeiro-patógeno, bem como em várias outras aplicações biotecnológicas (Bhatia *et al.*, 2002). As β -glicosidases também podem ser utilizadas na síntese de diversos oligossacarídeos, glicoconjugados, alquil e amino-glicosídeos (Khan e Akhtar, 2010).

Entretanto, vale ressaltar que as enzimas com aplicações biotecnológicas promissoras devem apresentar atividades e propriedades desejáveis.

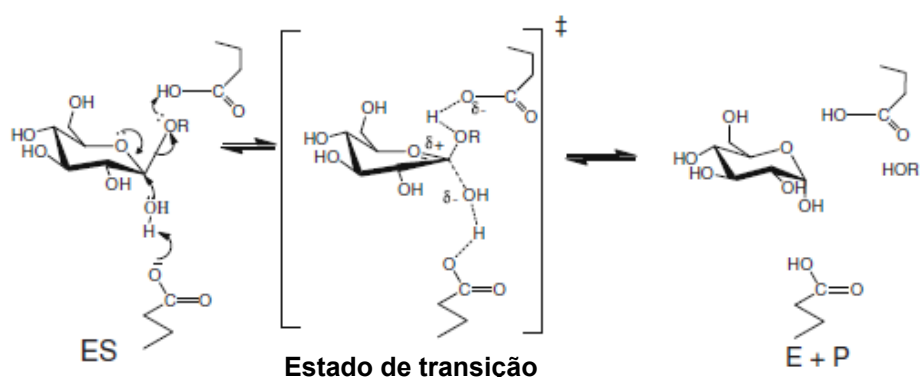
3.4. Mecanismo de ação de β -glicosidases

A hidrólise enzimática de ligações glicosídicas geralmente inclui a catálise ácida envolvendo pelo menos dois resíduos principais: um resíduo deve ser doador de próton e o outro deve ser um resíduo nucleófilo. A hidrólise

pode ocorrer via dois mecanismos principais, nos quais haverá inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (Figura 3). O mecanismo pelo qual a reação ocorre depende da distância entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Nas enzimas que catalisam a reação por meio do mecanismo de retenção, estes resíduos apresentam uma distância média de 5,5 Å, enquanto que naquelas que atuam por meio do mecanismo de inversão, a distância média é de 10 Å (Cairns e Esen, 2010).

No mecanismo de inversão, uma molécula de água ativada é responsável pelo ataque nucleofílico direto do carbono anomérico, para deslocar a porção aglicona em um único passo (Figura 3A). A base catalítica extrai um próton da molécula de água enquanto o ácido catalítico protona o grupo aglicona liberado. Em contrapartida, a maioria das β -glicosidases caracterizadas são enzimas retentoras e realizam a catálise em dois passos, glicosilação e desglicosilação (Figura 3B). Durante a glicosilação, a porção aglicona se afasta concomitante à doação de próton do sítio catalítico ácido/base e ao ataque nucleofílico da base catalítica ao carbono anomérico, gerando um intermediário enzima-açúcar, ligado covalentemente. No passo de desglicosilação o processo é revertido, e a molécula de água ataca para deslocar o nucleófilo catalítico da glicose. Os dois passos, de glicosilação e de desglicosilação, apresentam um estado de transição (Cairns e Esen, 2010).

(A) Mecanismo de inversão



(B) Mecanismo de retenção

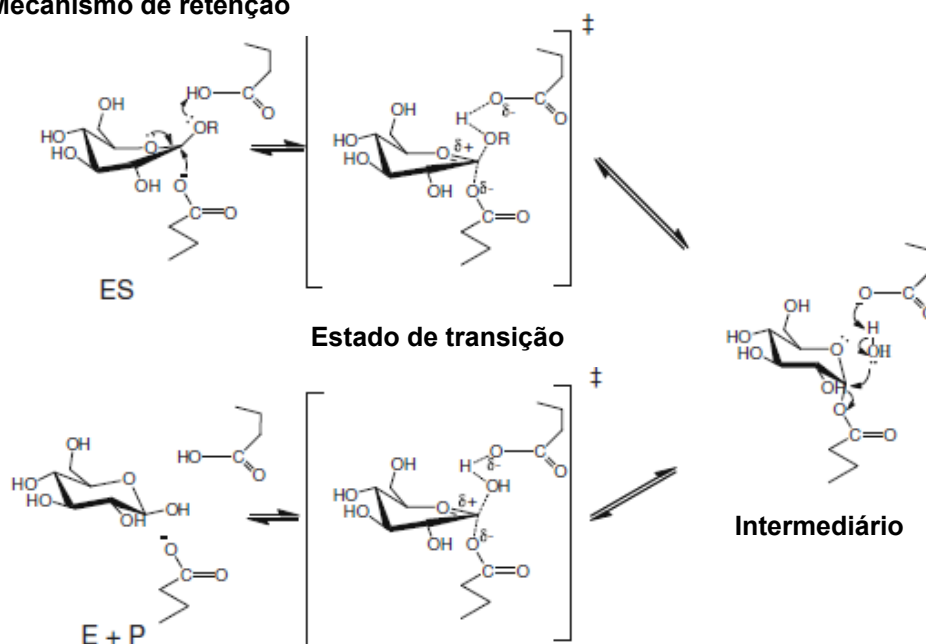


Figura 3: Mecanismos de hidrólise enzimática de ligações glicosídicas. **(A)** Mecanismo de inversão; **(B)** mecanismo de retenção (Cairns e Esen, 2010, traduzido para o português).

3.5. Aspectos gerais da produção de enzimas de microrganismos

De acordo com Azevedo (1985), as enzimas são utilizadas pelo homem no processamento de alimentos desde a mais remota antiguidade, muito embora havia pouco ou nenhum conhecimento sobre os fenômenos que ocorriam. A singularidade das enzimas decorre do elevado grau de especificidade pelo substrato em condições amenas, sob as quais atuam. As condições fisiológicas, a temperatura, a pressão, o pH e a concentração enzima-substrato são muito moderados quando comparadas às condições normalmente exigidas para obtenção da mesma velocidade da reação com a maioria dos catalisadores não-enzimáticos. Segundo o mesmo autor, o conhecimento sobre

as propriedades das enzimas e seus mecanismos de atuação cresceu com o passar do tempo e técnicas mais adequadas para isolar e purificar enzimas individuais foram decifradas, além de maiores facilidades de recuperar esses catalisadores, possibilitando sua reutilização em diversas configurações de reatores. Como resultado desse desenvolvimento, um maior número de utilizações potenciais de enzimas na medicina, indústria e em técnicas analíticas foi conduzido.

A maioria das enzimas isoladas em escala industrial é extracelular e seu isolamento é mais simples do que as enzimas intracelulares. Independente do interesse na produção de enzima, intracelular ou extracelular, existem diversos tipos de manipulações que podem ser utilizadas para aumentar a produção de uma determinada enzima (Azevedo, 1985). Dentre elas destacam-se a padronização das condições ótimas de cultivo, a concentração de células no inóculo e avaliação da sua viabilidade, tempo e temperatura de crescimento, pH do meio e velocidade de agitação da cultura.

Segundo Politzer *et al.* (2006) a tecnologia enzimática está visivelmente em atraso no Brasil, o que é paradoxal considerando que o país possui uma enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis, passíveis de serem transformadas, via tecnologia enzimática, em produtos úteis e de maior valor agregado. Os autores também ressaltam a importância da tecnologia enzimática na indústria de alimentos, uma das maiores usuárias de enzimas internacionalmente, sendo o Brasil um grande produtor de alimentos.

3.6. Permeabilização de células

O uso de células de microrganismos contendo enzimas de interesse em bioconversões é vantajoso quando comparado com o uso destas enzimas purificadas, por dispensar as etapas de purificação e pelo aumento da estabilidade enzimática (Junior *et al.*, 2009). Entretanto, as barreiras de permeabilidade do envelope celular para substrato e produtos levam a baixas taxas de reação das enzimas contidas nestas células (Kondo *et al.*, 2000). Assim torna-se muito importante o desenvolvimento de métodos efetivos para a redução das barreiras de permeabilidade e para o preparo de células com alta taxa de atividade. Uma das maneiras de aumentar a permeabilidade celular é a extração de alguns lipídios de membrana pelo uso de solventes. Com este fim,

vários processos de permeabilização de células de microrganismos, com solventes orgânicos como tolueno, tween 80, etanol, mistura clorofórmio-etanol e isopropanol têm sido testados para o aumento da permeabilidade do envelope celular (Kubal e D'Souza, 2004; Stano *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2000).

Kondo *et al.* (2000), trabalhando com células permeabilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente para a expressão de glioxalase 1, relataram que as células permeabilizadas apresentavam 317 vezes mais atividade de glioxalase 1 do que as células não permeabilizadas. Kubal e D'Souza (2004), trabalhando com células permeabilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, contendo a enzima catalase, para a remoção de peróxido de hidrogênio em leite, após a pasteurização, relataram que a permeabilização aumentava a atividade de catalase de 300 para 1875 U/g de célula. Jordão *et al.* (2001) estudaram a capacidade das células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* contendo a enzima β -galactosidase em hidrolisar o açúcar lactose em leite. Os autores relataram que a enzima contida nas células permeabilizadas e secas apresentou boa capacidade de hidrólise da lactose no leite (0,35 mM/min/mg de célula) e alta estabilidade à temperatura ambiente.

3.7. Imobilização de células

Imobilização é a restrição da mobilidade da célula em um espaço definido, provendo altas concentrações das mesmas, com preservação da atividade catalítica das enzimas (Nursevin *et al.*, 2003). A imobilização protege a célula e as enzimas nela contidas das tensões ambientais como pH, temperatura, sais, solventes e inibidores, além de oferecer várias vantagens como aumento da produtividade da fermentação, processo de produção contínuo, estabilidade das células, baixo custo e capacidade de reutilização (Junior *et al.*, 2009).

Segundo Pikington *et al.* (1998), as técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro categorias principais baseadas nos mecanismos físicos empregados: fixação ou adsorção em suporte sólido; aprisionamento dentro de uma matriz porosa; agregação através de floculação natural ou artificial e retenção de células atrás de barreiras.

Imobilização de célula em um suporte sólido é conseguida por adsorção física devido a forças eletrostáticas ou por ligação covalente entre o suporte e a membrana da célula. Sistemas que usam células imobilizadas em uma superfície sólida são muito populares devido à facilidade relativa da realização deste tipo de imobilização. Como exemplos de suportes sólidos usados neste tipo de imobilização podem ser citados os materiais derivados de celulose, como DEAE-celulose, madeira e serragem, e alguns materiais inorgânicos, como porcelana porosa e vidro poroso.

A imobilização por aprisionamento dentro de uma matriz porosa é baseada na inclusão de células dentro de uma rede rígida impedindo que as células se difundam no meio circunvizinho, enquanto permitem ainda a transferência de nutrientes e metabólitos. Um exemplo característico deste tipo de imobilização é o aprisionamento em géis de polissacarídeos como alginato, ágar e ácido poligalacturônico.

Floculação de células é a agregação de células que formam uma unidade maior ou a propriedade das células em suspensões de aderirem em grupo e sedimentar rapidamente. A capacidade de formar agregados é principalmente observada em fungos e células de plantas. Agentes floculantes artificiais ou *cross-linkers* podem ser usados para aumentar a agregação em culturas de células que não floculem naturalmente. A floculação de leveduras é uma propriedade importante para a indústria de cerveja, afetando a produtividade e a qualidade, além de remoção e reutilização das leveduras (Jin e Speers, 1998).

Retenção de células atrás de uma barreira pode ser obtida por uso de membrana de microporos, por aprisionamento das células em microcápsula ou através de imobilização de célula em uma superfície de interação com dois líquidos imiscíveis.

De acordo com Kourkoutas *et al.* (2004), o uso de sistemas imobilizados oferece muitas vantagens em relação às células livres incluindo atividade prolongada e estabilidade do biocatalisador; altas densidades de células por unidade de volume de biorreator, o que conduz a alta produtividade da fermentação; captação de substrato aumentada e melhoria de rendimento; viabilidade de processo contínuo; tolerância aumentada para alta concentração de substrato e redução de inibição devido aos produtos formados; viabilidade de conduzir fermentações a baixas temperaturas, melhorando a qualidade de

produto; recuperação dos produtos mais fácil por redução de exigências de separação e de filtração, reduzindo assim os custos de equipamentos e demandas de energia; regeneração e reutilização do biocatalisador por períodos estendidos em operações em bateladas, sem removê-lo do biorreator, e redução do risco de contaminação microbiana devido às altas densidades de células.

Kubal e D'Souza (2004) utilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae*, contendo a enzima catalase, imobilizadas em casca de ovo, para a remoção de peróxido de hidrogênio em leite. Os autores relataram que as células imobilizadas foram capazes de degradar todo o peróxido de hidrogênio durante 10 reutilizações, sem perda de eficiência. Além disso, os autores também relataram o aumento da termoestabilidade da enzima após a imobilização. Van Der Sluis *et al.* (2001) imobilizaram células das leveduras halotolerantes *Candida versatilis* e *Zygosaccharomyces rouxii* em gel de óxido de polietileno para a produção de *flavor* em molho de soja. Os autores relataram que a imobilização diminuía consideravelmente o tempo requerido para o desenvolvimento do *flavor*.

3.8. Imobilização de células em alginato de cálcio

Alginato é um biopolímero encontrado na natureza extraído principalmente de algas marinhas marrons (*Phaeophyta*). Em termos moleculares, o alginato é um polissacarídeo linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) unidos por ligações 1,4 podendo variar em composição e sequência, dependendo da alga de origem (Figura 3).

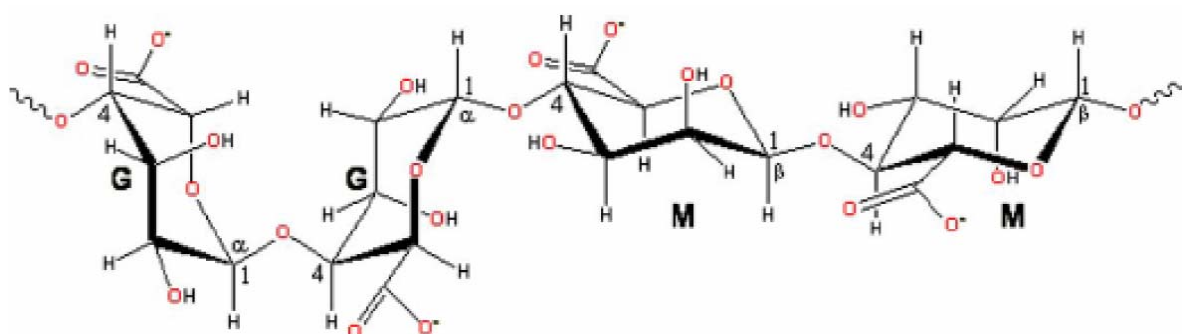


Figura 4: Estrutura química do alginato. G é o grupo ácido gulurônico e M é o grupo ácido manurônico.

Em presença de cálcio e outros cátions divalentes, o alginato apresenta a propriedade de formar gel, pois o cálcio induz um efeito cooperativo entre os blocos G formando uma rede 3D de acordo com o modelo *egg-box* (Clark e Ross-Murphy, 1987) (Figura 4).

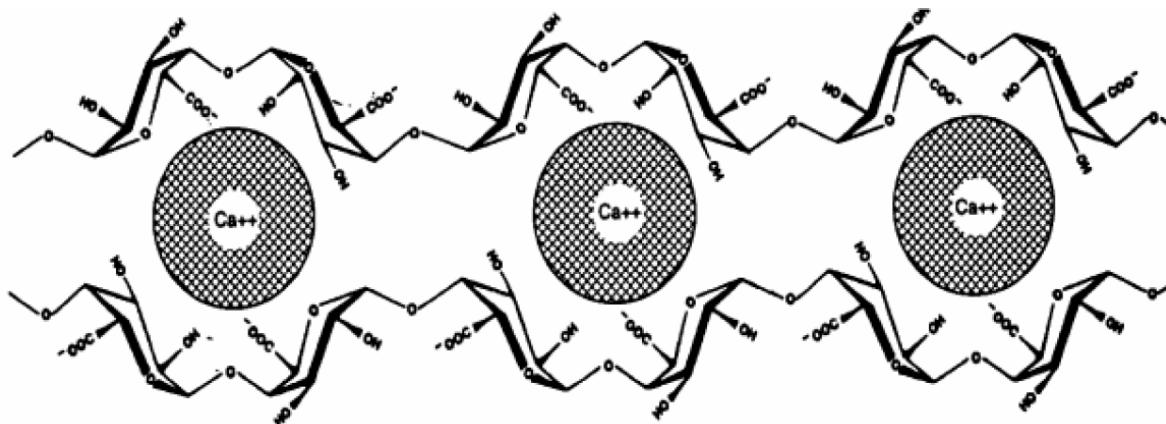


Figura 5: Modelo *eggs-box* para a formação do gel de alginato com íons cálcio (Clark e Ross-Murphy, 1987).

O encapsulamento de biocatalisadores em hidrogel, e mais especificamente em cápsula de gel alginato de cálcio, é uma técnica de imobilização que tem sua aplicação amplamente difundida. Ela consiste no aprisionamento do biocatalisador dentro de uma cápsula de gel de membrana semipermeável a qual fica em contato com solução aquosa. A imobilização em alginato de cálcio oferece vantagens como atoxicidade, biocompatibilidade, simplicidade, baixo custo e fácil disponibilidade (Zhou *et al.*, 2010). O hidrogel de alginato de cálcio é extensamente usado na indústria de alimentos como emulsificante e em aplicações biotecnológicas, inclusive no encapsulamento de células ou cultura de tecidos (Miralles *et al.*, 2001).

O gel de alginato, assim com outros hidrogéis, possui em sua estrutura grupos hidrofílicos carregados. Em solução aquosa estes grupos são capazes de absorver água com conseqüente aumento de volume das partículas do gel (*swelling*). A tendência osmótica e termodinâmica de absorver água é contrabalanceada pela força resultante das ligações cruzadas dentro da rede tridimensional de gel. O ponto de equilíbrio entre as forças que controlam a absorção ou a liberação de água nos hidrogéis é conhecido como equilíbrio de *swelling* (Saraydin *et al.*, 2002). Este equilíbrio é afetado por alguns estímulos externos como temperatura, pH, concentração de solvente, luz e campo

magnético. O equilíbrio de *swelling* é uma característica muito importante para células imobilizadas em hidrogéis, pois parece estar diretamente ligado à capacidade de difusão de substrato e produtos dentro da rede tridimensional do gel (Saraydin *et al.*, 2002).

Zhou *et al.* (2010) imobilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae* contendo a enzima álcool desidrogenase em gel de alginato com incorporação de quitosana, para a redução do ácido fenil glioxílico. A enzima reteve 62,76 % de sua atividade original após a imobilização, mas apresentou uma maior estabilidade térmica quando imobilizada. Após 1 h de incubação a 70 °C, a álcool desidrogenase imobilizada reteve 48,71 % da sua atividade enquanto a enzima livre não apresentava mais atividade enzimática.

Wang *et al.* (2010) estudaram a imobilização de celobiase comercial em gel composto de alginato de sódio e quitosana para posterior comparação da atividade enzimática com relação à celobiase livre, contra diferentes substratos. As celobiasas livre e imobilizada foram empregadas na hidrólise de Avicel e papel de filtro, juntamente com celulasas comerciais. A eficiência de hidrólise da celobiase imobilizada foi muito maior do que a da enzima livre. Foi também demonstrado que a estabilidade térmica da enzima à 60 e à 70 °C foi significativamente aumentada com o processo de imobilização.

Um estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de sódio e álcool polivinílico para fermentação de farelo de milho a etanol foi conduzido por Rakin *et al.* (2009). Os resultados indicaram que a fermentação foi mais rápida e o rendimento em etanol foi maior para as células da levedura imobilizadas em alginato.

Pan *et al.* (2007) imobilizaram β -glicosidase de *Aspergillus niger* para analisar a conversão de isoflavonas glicosídicas em suas formas agliconas em soja. Segundo os autores, a estabilidade da enzima imobilizada foi consideravelmente melhor do que a da enzima nativa. A β -glicosidase foi empregada para a produção de genisteína e 84,94 % da atividade enzimática e 56,05 % de conversão foram mantidos após 6 reutilizações.

Junior *et al.* (2009) demonstraram que a α -galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1 permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio foi mais eficiente na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em leite de soja do que a enzima contida nas células somente permeabilizadas. A imobilização proporcionou à α -galactosidase uma grande estabilidade térmica e

atividade em uma vasta gama de pH. Além disso, as células imobilizadas foram reutilizadas, reduzindo os custos do processo.

3.9. Considerações sobre a levedura *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii é a espécie de levedura não patogênica mais frequentemente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas, como salsichas e queijos (Encinas *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2002; Masoud e Jakobsen, 2005, Andrade *et al.*, 2010; Del Bove *et al.*, 2009). Possui alta tolerância ao sal, capacidade de crescimento em baixas temperaturas e em valores de pH mais baixos, comparada com *Saccharomyces cerevisiae*. Estas duas espécies metabolizam ácidos orgânicos e aminoácidos, regulando a acidez de produtos fermentados e também possuem atividades lipolíticas e proteolíticas, contribuindo assim para o desenvolvimento do *flavor* (Durá *et al.*, 2002; Olensen e Stahnke, 2000; Sorensen e Samuelsen, 1996).

Nos dias atuais, o interesse na fisiologia, bioquímica e nos aspectos genéticos de *D. hansenii* tem crescido vertiginosamente devido ao impacto na indústria de fermentações (Strauss *et al.*, 2001; Bolumar *et al.*, 2003 a,b).

A levedura *D. hansenii* tem sido estudada e explorada do ponto de vista de seu potencial biotecnológico, sendo utilizada em pesquisas para produção de proteases (Bolumar *et al.*, 2008), de α -galactosidases extra e intracelulares (Viana *et al.*, 2006, 2007), de etanol (Menon *et al.*, 2010) e de xilitol a partir de xilose (Prakash *et al.*, 2010).

Viana *et al.* (2006, 2007) determinaram as condições ideais para a produção de α -galactosidases por *D. hansenii* UFV-1, purificaram e caracterizaram estas enzimas. Além disso, os autores estudaram o uso das células permeabilizadas da levedura contendo a enzima α -galactosidase intracelular para a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose presentes em leite de soja, obtendo redução de 70% dos teores de rafinose e 100 % dos teores de estaquiose, após 6 h de incubação a 60 °C.

Menon *et al.* (2010) estudaram a utilização de uma espécie termotolerante de *D. hansenii*, bem como suas células imobilizadas em alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir da fermentação de glicose e xilose. Segundo os autores, as células imobilizadas foram reutilizadas por 6 vezes a 40 °C, com uma eficiência de fermentação de 100 %.

Prakash *et al.* (2010) demonstraram um excelente potencial fermentativo de uma nova espécie termotolerante de *D. hansenii* para a produção de xilitol a partir de xilose. O rendimento da produção de xilitol se equiparou ao valor máximo teórico e as células da levedura imobilizadas em alginato de cálcio produziram xilitol mais eficientemente. As células imobilizadas foram reutilizadas por 6 vezes consecutivas, sem perda aparente da capacidade de fermentação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Tecnologia Bioquímica, Enzimologia Aplicada e Análises Bioquímicas, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

4.1. Reagentes

Os reagentes maltose, melibiose, gentiobiose, celobiose, glicose, celulose, *p*-nitrofenol (ρ NP), *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NP β Glc), *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal), *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ NP α Man), *p*-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (ρ NP β Man), *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xyl), *p*-nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ NP α Ara), *m*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*m*NP α Gal), *o*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*o*NP β Glc) e *o*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*o*NP α Gal), ácido bicinconínico e solução de 4 % (p/v) CuSO₄ foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Da Merk S. A. Indústrias Químicas (Darmstadt, Germany), foram obtidos os reagentes sacarose e lactose.

As resinas DEAE-Sepharose, Sephacryl S-300 e Phenyl Sepharose foram obtidas da GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analíticos.

4.2. Microrganismo

A linhagem de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 pertence à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos - BIOAGRO - UFV.

4.3. Manutenção da cultura

A levedura mantida a - 80 °C em glicerol e YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 2 % de glicose), foi ativada em meio YPD sólido (1,5 % ágar), e incubada em câmara de crescimento por 72 h a 28 °C. As

placas foram mantidas a 4 °C e este estoque foi repicado e utilizado para padronização do inóculo.

4.4. Meios de cultura, fontes de carbono e tempos para produção de β -glicosidasas por *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Os meios de cultura utilizados para o crescimento da levedura *D.hansenii* foram:

- Meio YP: 1 % (p/v) de extrato de levedura e 2 % (p/v) de peptona.
- Meio mineral (MME) com extrato de levedura: contém, por litro de água destilada, 0,62 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5 g de extrato de levedura.
- Meio mineral (MM): contém, por litro de água destilada, 0,62 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os açúcares utilizados como fonte de carbono, na concentração de 1 % (p/v), foram: celobiose, maltose, celulose (Avicel®) e glicose. Os tempos de incubação testados para produção das β -glicosidasas pelo microrganismo foram 0, 12, 24, 36 e 48 h.

4.5. Cultivo de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A levedura *D. hansenii* mantida em placas a 4 °C foi ativada em YPD líquido, em Erlenmeyers de 250 mL, sendo incubada em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 180 rpm, por 12-15 h, a 28 °C. Após este período, o meio foi centrifugado a 4000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células de *D. hansenii* foram inoculadas nos meios de cultura (concentração inicial de 0,15 mg/mL) contendo as diferentes fontes de carbono, sendo que estes foram incubados nas mesmas condições descritas acima. Nos tempos 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, os Erlenmeyers correspondentes foram retirados do *shaker* e os meios neles contidos foram congelados para posterior análise de determinação da atividade enzimática e do crescimento celular.

O crescimento da levedura foi estimado pela medida da massa celular fresca obtida a partir da centrifugação dos meios a 15000 g por 20 minutos.

4.6. Extração de β -glicosidases

A levedura *D. hansenii* UFV-1 foi ativada conforme o item 4.5. As células obtidas após centrifugação a 4000 *g* por 5 minutos foram inoculadas em meio de cultivo apropriado. Após incubação em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, a 180 rpm, pelos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, a 28 °C, a cultura foi centrifugada a 15000 *g* por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima extracelular. As células foram rompidas seguindo procedimento usando ultrassom e Triton X-100 e o extrato centrifugado foi utilizado como fonte de β -glicosidase intracelular (Figura 6).

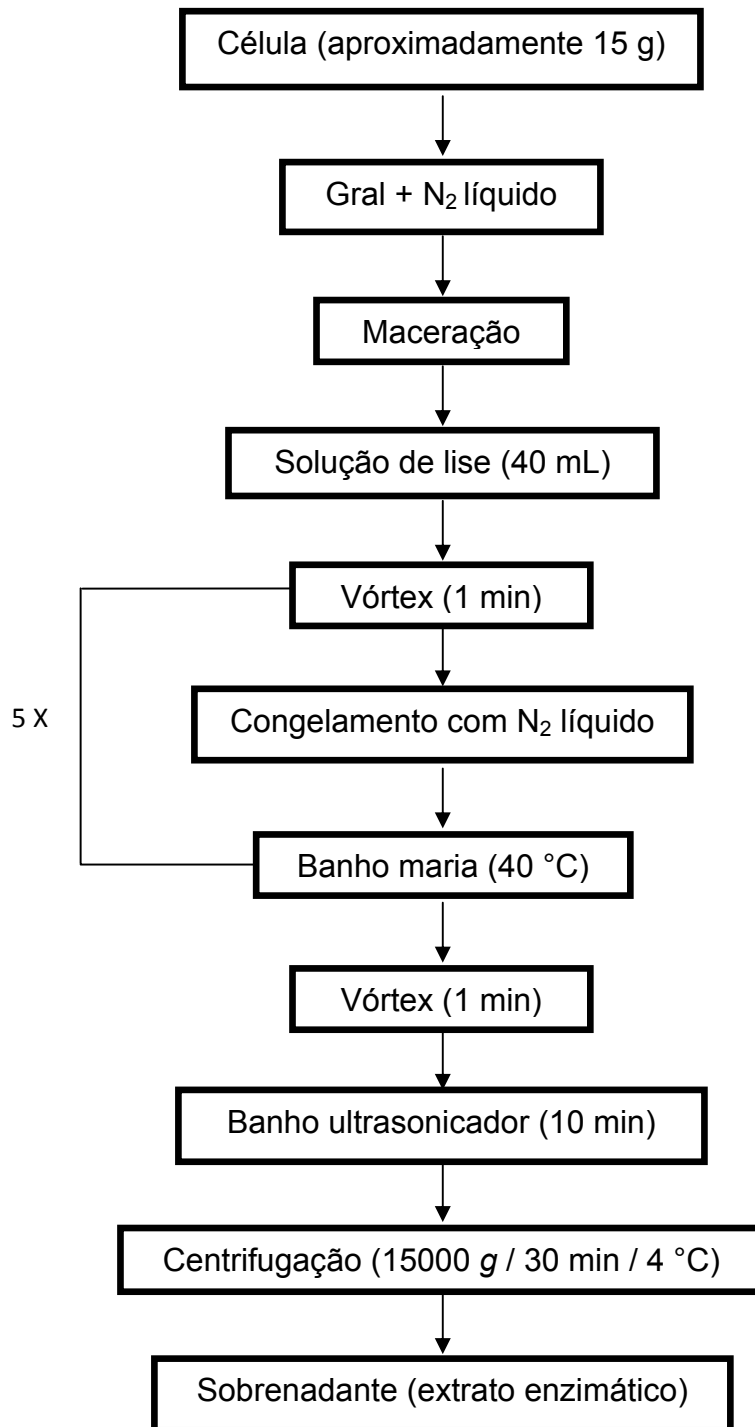


Figura 6: Seqüência das etapas de extração da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1.

A solução de lise foi preparada com tampão acetato de sódio 0,1 M e Triton X-100 0,25 % (p/v).

4.7. Purificação da β -glicosidase intracelular

A β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 foi purificada de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 7). Cada uma destas etapas estão descritas nas seções 4.7.1 a 4.7.5.

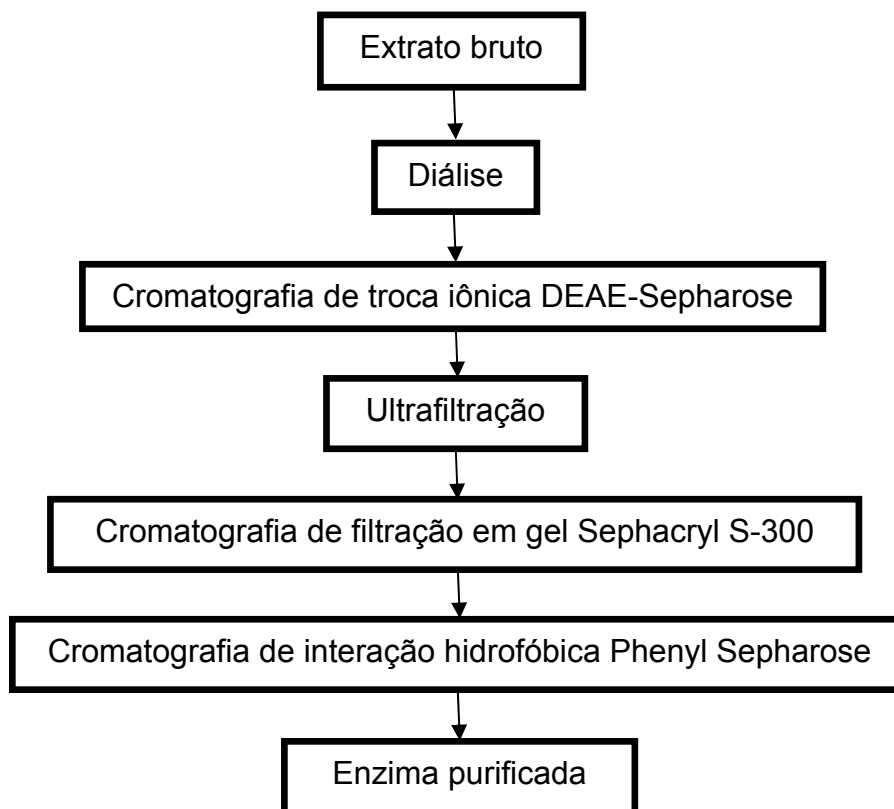


Figura 7: Sequência das operações utilizadas no processo de purificação da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1.

4.7.1. Diálise

O extrato bruto foi submetido à diálise contra 4 L de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, por 15 h, a 4 °C. Neste processo foi utilizada uma membrana de diálise com um poro de exclusão de 3 kDa.

4.7.2. Cromatografia de troca iônica

A amostra dialisada foi submetida à cromatografia de troca iônica convencional em uma coluna (2,0 x 6,8 cm) de DEAE-Sepharose previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0. As proteínas foram

eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado por tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0, e o mesmo tampão contendo 0,8 M de NaCl. Todo o processo foi realizado a 4 °C, com fluxo de 60 mL/h. Frações de 2 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade de β -glicosidase foram reunidas.

4.7.3. Ultrafiltração

O processo de ultrafiltração foi utilizado durante as etapas de purificação para concentração da amostra enzimática proveniente da cromatografia de troca iônica. As frações foram coletadas usando uma membrana de ultrafiltração Amicon® Ultra, Millipore (Billerica, MA, USA) com um poro de exclusão de 3 kDa. O processo foi realizado em centrífuga refrigerada Beckman J2-MI a 3500 rpm, por 1 hora, à 4 °C (rotor JA-17).

4.7.4. Cromatografia de filtração em gel

A amostra concentrada, proveniente da ultrafiltração, foi submetida à cromatografia de filtração em gel em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) em uma coluna (26/60) de Sephacryl S-300 previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão com fluxo contínuo de 60 mL/h e foram coletadas frações de 1,5 mL. As frações com atividade de β -glicosidase foram reunidas.

4.7.5. Cromatografia de interação hidrofóbica

A amostra proveniente da cromatografia de filtração em gel foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica, em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), em uma coluna (1,6 x 2,5 cm) de Phenyl Sepharose previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 contendo 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguido por um gradiente salino decrescente formado por tampão fosfato de sódio, 25 mM, pH 7,0 contendo 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A corrida foi realizada com fluxo

contínuo de 240 mL/h e foram coletadas frações de 1,5 mL. As frações com atividade de β -glicosidase foram reunidas para posterior determinação do grau de pureza, da massa molecular e para caracterização cinético-bioquímica.

4.8. Determinação da atividade da β -glicosidase

4.8.1. Com o substrato sintético ρ NP β Glc

Para o ensaio da atividade da β -glicosidase foi utilizado o substrato sintético ρ NP β Glc (4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo). As misturas de reações continham 650 μ L de tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0, 250 μ L de solução ρ NP β Glc 2 mM e 0 - 100 μ L do extrato enzimático. As reações foram conduzidas por 15 min, em banho-maria a 45 °C, e interrompidas pela adição de 1 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μ moles de ρ NP, utilizando uma curva padrão construída com 0 - 0,2 μ moles de ρ NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ moles/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ρ NP por minuto, nas condições de ensaio.

Para a determinação da atividade enzimática das células permeabilizadas, o ensaio foi conduzido com 100 μ L de suspensão de células (extrato enzimático) previamente diluída em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0. O restante do ensaio seguiu os mesmos passos descritos acima.

Para a determinação da atividade de β -glicosidase das células imobilizadas, o ensaio foi conduzido com os mesmos reagentes descritos anteriormente com a substituição da suspensão de células por 4 esferas de alginato.

4.8.2. Com açúcares redutores

Para os ensaios da atividade da β -glicosidase intracelular com os açúcares redutores celobiose, melibiose, maltose, gentiobiose e lactose, a glicose liberada da reação foi determinada por meio do método da glicose oxidase (Sternberg *et al.*, 1970). O ensaio foi conduzido com 250 μ L de solução

de açúcar redutor 10 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 250 µL de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido por 30 minutos a 45 °C. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 minutos, sendo depois colocados em água fria para redução da temperatura do meio de reação. Ao final desta primeira etapa, 0,5 mL do reativo de glicose oxidase foi adicionado à reação e a mistura foi novamente incubada por 15 minutos a 37 °C. A concentração de glicose formada foi estimada espectrofotometricamente, a 510 nm, por uma curva padrão construída com 0-0,15 µmoles de glicose, utilizando-se uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

4.8.3. Com açúcar não redutor

Para o ensaio com o substrato sacarose, a atividade da β-glicosidase intracelular foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzida com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) pelo método de Miller (1956). A mistura de reação continha 750 µL de tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0, 500 µL de solução do substrato sacarose 10 mM e 250 µL de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido por 30 minutos a 45 °C. Após este período, foi adicionado 0,5 mL do reagente DNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e deixadas em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Os valores de absorvância obtidos a 540 nm foram transformados em µmoles de glicose, utilizando uma curva padrão construída com 0-2 µmoles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 2 mg/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

4.8.4. Com polímero

O ensaio para atividade da β-glicosidase intracelular também foi realizado com o polímero celulose (Avicel®), nas concentrações de 0,1 e 1 %

(p/v), com o uso do reagente dinitrossalicilato (Miller, 1956), como descrito no item 4.8.3.

4.8.5. Com outros substratos sintéticos

Os ensaios da atividade da β -glicosidase intracelular foram idênticos ao descrito no item 4.8.1, exceto que foram utilizados os substratos ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NP β Glc), ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal), ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ NP α Man), ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (ρ NP β Man), ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xyl), ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ NP α Ara), m -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (m NP α Gal), o -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o NP β Glc) e o -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (o NP α Gal).

4.9. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos

As concentrações protéicas nas preparações enzimáticas obtidas logo após extração da β -glicosidase das células da levedura foram determinadas pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) conforme descrito por Smith *et al.* (1985). Nos tubos contendo a solução com as proteínas (0-100 μ L) foi adicionado, em intervalos de 30 segundos, 1 mL do reagente de trabalho (Reagente A: Solução de ácido bicinconínico - 50 mL e Reagente B: solução de 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1 mL). A mistura foi agitada rapidamente e em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C, por exatos 30 minutos. Após este período, os tubos foram retirados em intervalos de 30 segundos e deixados 20 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram efetuadas em intervalos de 30 segundos em espectrofotômetro a 562 nm e o teor de proteína foi determinado conforme curva padrão construída com 0,24 % (p/v) de albumina sérica bovina (BSA).

Para quantificar as proteínas presentes nos extratos enzimáticos obtidos com as etapas de purificação, utilizou-se o método de absorção no ultravioleta, ou seja, leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Em geral, considera-se que uma leitura de 1,0 em 280 nm equivale a uma concentração de 1,0 mg/mL de proteína.

4.10. Determinação do grau de pureza da β -glicosidase

4.10.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,6, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 100 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Company. As amostras submetidas à eletroforese foram, anteriormente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 % (p/v), lavadas com acetona gelada e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 4 minutos e aplicadas no gel (Laemmli, 1970).

4.10.2. Coloração dos géis de eletroforese

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum *et al.*(1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume) por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 minutos com solução de etanol 50 % (p/v). Os géis foram lavados, por 1 minuto, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Em seguida, os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados, por 30 minutos, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 μ L de formaldeído 37 % (v/v) e lavados 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 μ L de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

4.11. Determinação da massa molecular

A determinação da massa molecular da β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 foi feita por duas técnicas descritas nas seções 4.11.1 e 4.11.2, eletroforese e filtração em gel, respectivamente.

4.11.1. Por eletroforese

Para a determinação da massa molecular da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %). Os marcadores de massa molecular utilizados foram os da Fermentas Life Sciences, uma mistura de 14 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas. A massa molecular da β -glicosidase foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas padrão (distância percorrida no gel, em centímetros) com o logaritmo das massas moleculares.

4.11.2. Por filtração em gel

A massa molecular da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, na sua conformação nativa, foi estimada por cromatografia de filtração em gel utilizando a resina Sephacryl S-200, em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). A coluna (16/60), foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4, contendo 100 mM de KCl. O fluxo utilizado em todas as cromatografias foi de 60 mL/h, sendo que as frações coletadas tinham um volume de 1,5 mL.

Uma cromatografia utilizando azul de dextrana foi executada, com o objetivo de determinar o volume vazio da coluna.

A massa molecular da β -glicosidase foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, as constantes de eluição das proteínas padrão (relação entre o volume de eluição da proteína e o volume vazio da coluna) com as massas moleculares das respectivas proteínas. Os padrões de massa molecular foram albumina (66 KDa), álcool desidrogenase (150 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), β -amilase (200 KDa) e citocromo c (12,4 KDa), todos da Sigma Chemical Company.

4.12. Permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

O protocolo de permeabilização das células de *D. hansenii* UFV-1 foi o desenvolvido por Junior *et al.*, 2009. As células congeladas, obtidas a partir da centrifugação do meio YP utilizando celobiose como fonte de carbono após 12 h de cultivo, foram pesadas e misturadas a uma solução de etanol 50 % (v/v) na seguinte proporção: 450 μ L de solvente para 0,2 g de célula. A mistura foi mantida sob agitação lenta, à temperatura ambiente, pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4000 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram secas em estufa por 1 hora a 37 °C.

As células de *D. hansenii* UFV-1 permeabilizadas e secas foram novamente pesadas para determinação da atividade de β -glicosidase intracelular, conforme descrito no item 4.8.1.

O estudo do tempo de permeabilização celular foi feito por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida de teste de Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

4.13. Imobilização das células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A imobilização das células de *D. hansenii* UFV-1 foi realizada de acordo com Junior *et al.*, 2009. Após terem sido permeabilizadas e secas, as células de *D. hansenii* foram misturadas a uma solução de alginato de sódio 2 % (p/v), previamente autoclavada, em diferentes proporções de célula para cada 1 g de alginato. Cada uma das misturas foi adicionada, gota a gota, através de uma bomba peristáltica, em uma solução de CaCl_2 0,1 M, para a formação das esferas de alginato de cálcio contendo as células imobilizadas. Para melhor formação do retículo e estabilização da rede tridimensional do gel de alginato, as esferas foram mantidas na solução de CaCl_2 0,1 M por diferentes tempos a 4 °C. Posteriormente, estas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e armazenadas no mesmo tampão a 4 °C, até o uso.

Frações contendo um número específico de esferas de alginato foram ensaiadas para a determinação da atividade da β -glicosidase contida nas

células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 conforme descrito no item 4.8.1. O número de partículas formadas durante o processo de imobilização foi determinado multiplicando o número médio de esferas formadas durante 1 minuto pelo tempo total, uma vez que o fluxo da bomba peristáltica permaneceu constante durante todo o processo.

4.13.1. Efeito da relação célula:alginate na atividade da β -glicosidase

Para estudar o efeito da relação célula:alginate, usada durante a formação das esferas de alginate, na atividade da β -glicosidase, foram testadas as proporções de 4 e 8 g de célula para cada 1 g de alginate. Após a formação das esferas, a atividade da β -glicosidase foi quantificada conforme o item 4.8.1.

O estudo da relação célula:alginate foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida de teste F de Snedecor para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

4.13.2. Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginate na atividade da β -glicosidase

Depois de formadas, as esferas de alginate foram mantidas em solução de CaCl_2 0,1 M por 12 e 24 horas. As esferas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e armazenadas no mesmo tampão a 4 °C. A determinação da atividade da β -glicosidase foi realizada conforme descrito no item 4.8.1.

O estudo do tempo de reticulação foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida de teste F de Snedecor para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

4.13.3. Efeito do número de esferas de alginate ensaiadas na atividade da β -glicosidase

Para melhor quantificação da atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas, foram testados diferentes números de esferas de alginate

no ensaio de atividade enzimática. Assim, foram testadas 3, 4 e 12 esferas sendo que o ensaio seguiu os mesmos passos do item 4.8.1.

O estudo do número de esferas de alginato a serem ensaiadas foi feito por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida de teste de Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

4.13.4. Efeito da agitação na determinação da atividade de β -glicosidase

Para avaliar o efeito da agitação sobre a atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas, o ensaio de atividade com o substrato sintético $pNP\beta Glc$, descrito no item 4.8.1, foi realizado sob agitação lenta, utilizando-se um agitador de bancada e um banho termostático.

O estudo do efeito da agitação foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida de teste F de Snedecor para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

4.14. Caracterização enzimática

4.14.1. Efeito do pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 4.8.1 exceto que o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH utilizando-se tampões Mcllvaine (Mcllvaine, 1921), na faixa de 2,0 a 8,0.

4.14.2. Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 4.8.1 exceto que o ensaio foi realizado em várias temperaturas compreendidas entre 10 e 60 °C.

4.14.3. Análise de termoestabilidade

A estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada foi testada em várias temperaturas. Para a enzima livre, alíquotas (0-100 μ L) da enzima purificada foram pré-incubadas em solução tampão fosfato de sódio, 25 mM, pH 7,0, nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C, por diferentes tempos. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para atividade foram conduzidos como descrito no item 4.8.1. Para a β -glicosidase imobilizada, as esferas de alginato contendo as células da levedura foram pré-incubadas em solução tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0, nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C, por diferentes tempos. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para atividade foram conduzidos como descrito no item 4.8.1.

Também foi determinada a estabilidade da enzima livre durante 15 dias à temperatura ambiente (23 °C) e durante 3 meses na temperatura de 4 °C. As atividades da enzima foram determinadas conforme descrito no item 4.8.1.

4.14.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da β -glicosidase

O efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase foi testado pré-incubando a solução da enzima ou as esferas de alginato contendo as células da levedura na faixa de pH de 2,0 a 8,0, por 30 minutos, no gelo. Após o período de pré-incubação, a atividade das enzimas livre e imobilizada foi conduzida como descrito no item 4.8.1.

4.14.5. Meia-vida da β -glicosidase

O ensaio para determinar a meia-vida da enzima foi feito utilizando-se 0-100 μ L da enzima purificada e 650 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. As misturas foram pré-incubadas nas mesmas temperaturas e tempos utilizados na determinação das termoestabilidades. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para as atividades da β -glicosidase foram conduzidos conforme descrito no item 4.8.1. As curvas de meia vida foram construídas pelo programa Curve Expert, versão 1.4 para Windows.

4.14.6. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obtenção dos valores de K_M e V_{max} para a enzima livre, os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes do substrato sintético $pNP\beta Glc$. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 4.8.1, porém, utilizando-se concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0; 2,2; 2,6; 3,0; 3,2; 3,6; 4,0; 4,2; 4,6 e 5,0 mM para $pNP\beta Glc$.

Para determinar o efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, os ensaios de atividade foram conduzidos como descrito no item 4.8.1, porém, utilizando-se concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mM para $pNP\beta Glc$.

Os valores de K_M e V_{max} para a enzima livre e de $K_{M\ app}$ e $V_{max\ app}$ para a enzima imobilizada foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato, Curva de Michaelis-Menten, e pelo gráfico duplo-recíproco, Gráfico de Lineweaver-Burk, pelo programa Curve Expert, versão 1.4 para Windows.

4.14.7. Determinação da especificidade da β -glicosidase para diversos substratos

Ensaio enzimáticos foram realizados com diversos substratos sintéticos, naturais e polímeros com o objetivo de determinar a especificidade da β -glicosidase purificada.

As atividades da β -glicosidase intracelular foram estimadas com outros substratos sintéticos, além do $pNP\beta Glc$, como, p -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo ($pNP\alpha Glc$), p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($pNP\alpha Gal$), p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo ($pNP\beta Gal$), p -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo ($pNP\alpha Man$), p -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo ($pNP\beta Man$), p -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo ($pNP\beta Xyl$), p -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo ($pNP\alpha Ara$), m -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($mNP\alpha Gal$), o -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo ($oNP\beta Glc$) e o -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($oNP\alpha Gal$). Os ensaios foram realizados como descrito no item 4.8.5.

As atividades da β -glicosidase intracelular também foram estimadas com os açúcares redutores celobiose, lactose, maltose, melibiose e gentiobiose, como descrito no item 4.8.2, com o açúcar não redutor sacarose, como descrito no item 4.8.3 e com o polímero celulose (Avicel®), conforme descrito no item 4.8.4.

4.14.8. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase intracelular, foram analisados utilizando-se 450 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 0-100 μ L das enzimas purificadas e 200 μ L de soluções 1 e 10 mM de cada um dos seguintes compostos: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nitrato de prata, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de potássio, cloreto de cálcio, β -mercaptoetanol, D-glicose, uréia, maltose, celobiose, celulose (Avicel®), glicerol, etanol, ácido acético, Triton X-100, carbonato de cálcio, cloreto de cobalto, sulfato de magnésio, cloreto de zinco, sulfato de zinco, iodeto de potássio, sulfato de sódio, fluoreto de sódio, cloreto de ferro, sulfato de manganês, cloreto de manganês. Os ensaios das atividades foram conduzidos conforme descrição no item 4.8.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASES POR *Debaryomyces hansenii* UFV-1

5.1.1. Cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1

O crescimento da levedura *D. hansenii* UFV-1, nos diferentes meios testados, pode ser visualizado na Figura 8.

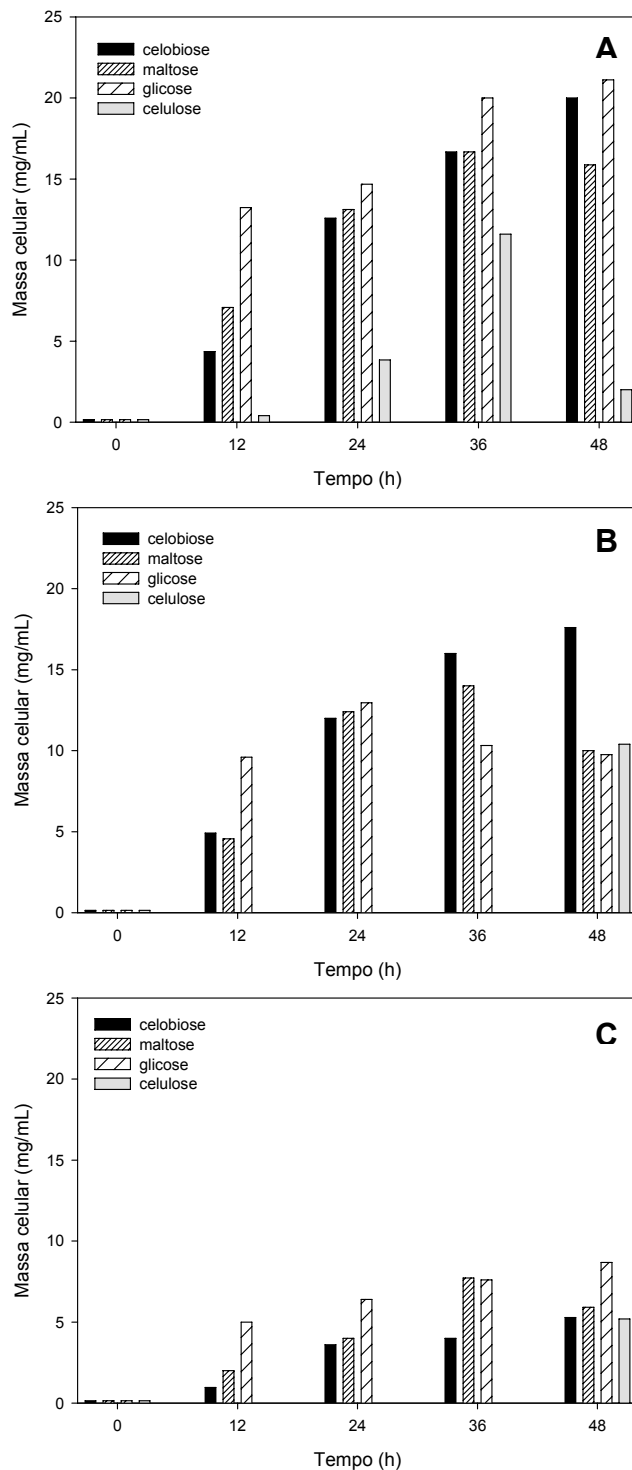


Figura 8: Massa celular obtida a partir da cultura de *D. hansenii* UFV-1 em (A) YP, (B) MME e (C) MM, em diferentes tempos de cultivo, com diferentes fontes de carbono. Os valores estão corrigidos para mg/mL de meio de cultura.

Os três meios, YP, MME e MM, foram testados com o objetivo de avaliar o requerimento nutricional e o efeito de cada um dos açúcares no crescimento celular e produção de β -glicosidase. O meio YP é o meio mais completo, rico em nutrientes; o meio MME é um meio intermediário, contém sais minerais e extrato de levedura; e o meio MM é um meio pobre, contendo somente sais minerais.

Conforme pode ser observado na Figura 8A, o meio de cultura contendo extrato de levedura e peptona (YP) foi o que promoveu maior produção de massa celular comparado aos demais. *D. hansenii* UFV-1 cresceu em todas as fontes de carbono testadas e em todos os tempos testados. No meio YP, que possui diversos precursores biossintéticos, os açúcares foram principalmente utilizados como fonte de energia. Assim, assimilados como fonte de energia, os açúcares foram menos específicos em promover o crescimento celular. Quando celobiose e glicose foram utilizadas, a levedura cresceu progressivamente até 48 h. Para a maltose e a celulose, a levedura cresceu até 36 h, diminuindo em seguida até 48 h. Observa-se que, para o meio YP, os açúcares que mais induziram o crescimento da levedura foram a glicose e a celobiose, no tempo de 48 h de cultivo (21,1 e 20 mg/mL, respectivamente). Provavelmente a glicose, que é um monossacarídeo, serviu como fonte de energia mais facilmente assimilada pela levedura. Os dissacarídeos celobiose e maltose também promoveram aumento de massa celular, entretanto celobiose foi mais eficiente. Por outro lado, o polissacarídeo celulose foi o menos eficiente em promover o crescimento celular.

Villena *et al.* (2006) testaram o crescimento da levedura *D. pseudopolymorphus* em meio YP, contendo celobiose ou glicose como fontes de carbono, por 72 h a 30 °C. Os autores relataram que a levedura produziu massa celular 1,2 vezes menor no meio contendo glicose.

No meio de cultura contendo sais minerais e extrato de levedura (MME) (Figura 8B), também foi observado crescimento de *D. hansenii* UFV-1 em todos os açúcares testados, mas não nos diferentes tempos. No caso da celobiose, a levedura cresceu progressivamente até 48 h. Para a maltose, houve crescimento do microrganismo até 36 h, diminuindo em seguida até 48 h. Quando se utilizou glicose, *D. hansenii* UFV-1 cresceu até 24 h e, em seguida, seu crescimento diminuiu nos tempos 36 e 48 h. No caso da celulose, o crescimento só foi verificado no tempo 48 h de cultivo. Observa-se que, para o

meio MME, a fonte de carbono que mais induziu o crescimento da levedura foi a celobiose, no tempo de 48 h (17,6 mg/mL). No caso do meio MME, observa-se uma maior especificidade dos açúcares na produção de massa celular. A levedura provavelmente utilizou os açúcares como fonte de energia mas mais especificamente como fonte de carbono. O extrato de levedura presente no meio deve ter fornecido os co-fatores e co-enzimas necessários à atividade enzimática e assim, a celobiose, que tem 12 carbonos foi mais eficiente como fonte de carbono do que o monossacarídeo glicose (6 C) em promover o crescimento celular.

De acordo com a Figura 8C, no meio de cultura contendo apenas sais minerais (MM), a levedura exibiu menor crescimento comparada aos outros meios. *D. hansenii* UFV-1 foi capaz de crescer em todas as fontes de carbono testadas, mas não em todos os tempos. Observou-se que com a celobiose e a glicose o crescimento aumentou progressivamente até 48 h. Já para o açúcar maltose, *D. hansenii* UFV-1 cresceu até 36 h, diminuindo em seguida até 48 h. Para a celulose, o crescimento só foi verificado no tempo 48 h de cultivo. Observa-se que, para o meio MM, a fonte de carbono que mais induziu o crescimento da levedura foi a glicose, no tempo de 48 h (8,68 mg/mL). No meio MM, o açúcar provavelmente foi utilizado principalmente como fonte de carbono, mas para ativação do complexo enzimático que permite sua utilização são necessários os co-fatores enzimáticos. Nestas condições, provavelmente o açúcar mais facilmente metabolizável pela levedura foi a glicose, e assim foi capaz de promover aumento de massa celular, embora reduzido quando comparado aos outros meios.

5.1.2. Atividade de β -glicosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Para os três meios testados - YP, MM, MME - com as diferentes fontes de carbono - celobiose, maltose, celulose e glicose – não foi observada produção da β -glicosidase extracelular por *D. hansenii* UFV-1.

Porém, a levedura produziu uma quantidade significativa da enzima intracelular (Figura 9).

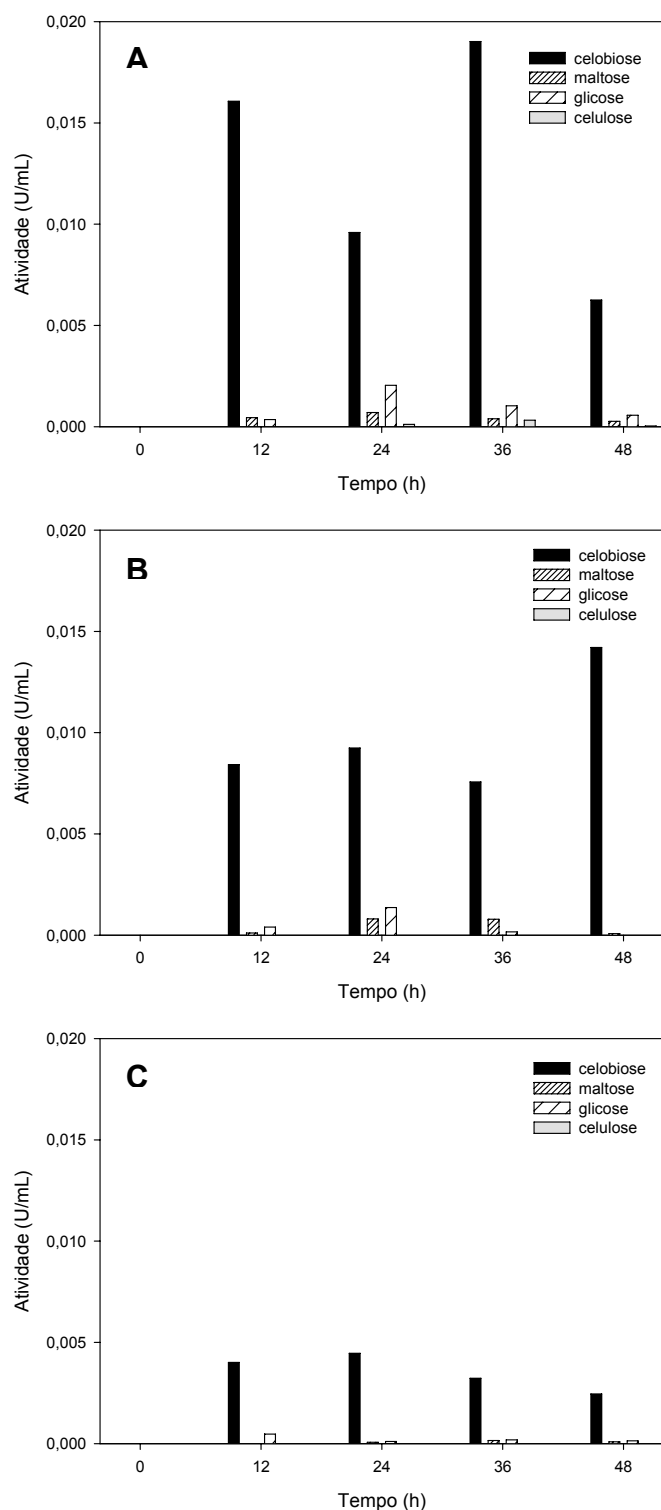


Figura 9: Atividade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 cultivada nos meios (A) YP, (B) MME e (C) MM, em diferentes tempos e fontes de carbono. Os valores de atividade foram corrigidos para U/mL de cultura.

Os dados mostrados na Figura 9 indicam que nas condições de cultivo testadas, celobiose foi um bom indutor da atividade de β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1. De acordo com a Figura 9A, observa-se que a levedura, quando cultivada por 36 h em meio YP com o açúcar celobiose,

apresentou máxima atividade de β -glicosidase, 0,019 U/mL. Porém, esta atividade foi próxima àquela determinada com 12 h de cultivo, também com celobiose como fonte de carbono (0,016 U/mL). As outras fontes de carbono praticamente não induziram atividade de β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 no meio YP, nos tempos testados, com exceção da glicose, no tempo de 24 h (0,002 U/mL).

Quando a levedura foi cultivada no meio mineral contendo extrato de levedura (MME) (Figura 9B), a celobiose induziu maior atividade de β -glicosidase intracelular, 0,014 U/mL, no tempo de 48 h. As outras fontes de carbono praticamente não induziram atividade de β -glicosidase no meio MME, nos tempos testados.

De acordo com a Figura 9C, no meio mineral MM com a fonte de carbono celobiose, a maior atividade de β -glicosidase intracelular, 0,004 U/mL, foi detectada com 24 h de cultivo, muito próxima da atividade encontrada para este mesmo açúcar, no tempo de 12 h.

Pode-se observar que, para os meios YP e MM, a fonte de carbono que mais favoreceu o crescimento celular não foi aquela que mais induziu a atividade enzimática. A maior atividade enzimática ocorreu na presença de celobiose, nos tempos de cultivo de 36, 48 e 24 h, respectivamente, para os meios YP, MM e MME. Porém para os meios YP e MM, o maior crescimento celular ocorreu com a fonte de carbono glicose no tempo de 48 h. Somente para o meio MME, as condições de maior crescimento celular e maior atividade enzimática coincidiram.

Resultado semelhante de indução da atividade de β -glicosidase pela celobiose, observado para *D. hansenii* UFV-1, foi descrito para outros microrganismos. Belancic *et al.* (2003) observaram que quando cultivada em meio YP contendo celobiose como fonte de carbono, a levedura *D. vanriijiae* produziu grandes quantidades de β -glicosidase extracelular com atividade máxima detectada em 60 h de cultivo. Segundo os mesmos autores, esta produção se aproximou à de fungos filamentosos comumente utilizados em aplicações biotecnológicas. Num estudo realizado por Villena *et al.* (2006), *D. pseudopolymorphus* foi crescida em meio YP contendo duas diferentes fontes de carbono, celobiose e glicose, para a produção de β -glicosidase extracelular. A levedura cresceu nos dois meios testados, mas a maior atividade enzimática foi obtida quando se utilizou celobiose como açúcar indutor no tempo de 40 h.

Porém, segundo os autores, a atividade enzimática decresceu após 48 h de cultivo. Barbosa *et al.* (2010) demonstraram que a levedura *D. pseudopolymorphus* apresentou maior atividade de β -glicosidase extracelular (0,02 U/mL) quando crescida em meio YP contendo celobiose. Os autores testaram quatro fontes de carbono - glicose, maltose, lactose e celobiose - e concluíram que a celobiose é comumente utilizada para o *screening* de leveduras produtoras de β -glicosidases devido à sua capacidade indutora. Entretanto, Hernández *et al.* (2003) relataram que a maior produção de β -glicosidase por *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida quando se utilizou meio YP com glicose como açúcar indutor.

Em acordo com os resultados obtidos para a levedura *D. hansenii* UFV-1, a utilização de celobiose também induziu a síntese de β -glicosidase intracelular por *D. hansenii*, e de forma semelhante, não houve produção da enzima extracelular (Riccio *et al.*, 1999; Yanai e Sato, 1999).

A atividade de β -glicosidase foi também expressa em função da massa celular obtida para cada meio, nos diferentes tempos de cultivo (Figura 10).

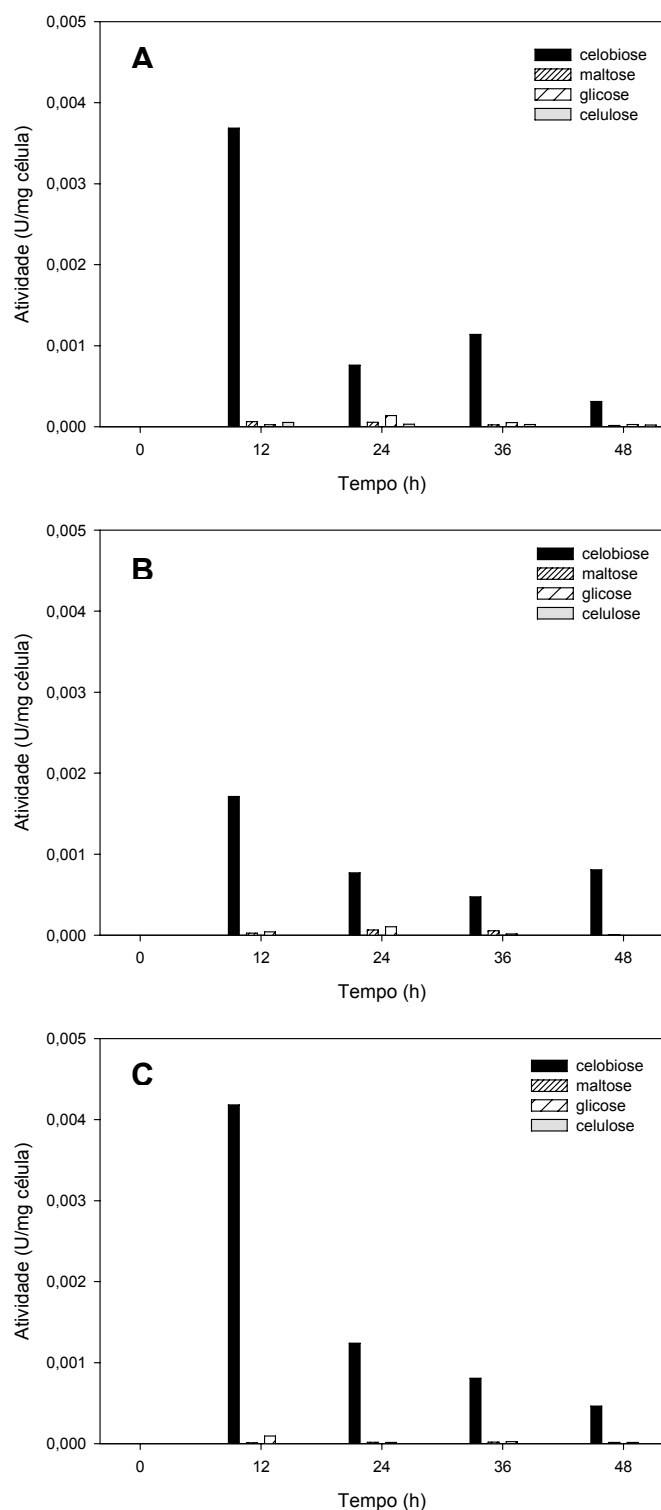


Figura 10: Atividade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 relacionada com a massa celular obtida nos meios **(A)** YP, **(B)** MME e **(C)** MM, em diferentes tempos de cultivo, com diferentes fontes de carbono. Os valores de atividade foram corrigidos para a massa inicial de células e o volume inicial de meio. No caso dos meios MM e MME com a fonte celulose, os valores de atividade para os tempos de 12, 24 e 36 h não puderam ser calculados visto que não houve crescimento celular.

Na Figura 10 A, B e C, observa-se que nos meios YP, MME e MM a atividade enzimática proporcional à massa celular foi sempre maior quando se

utilizou celobiose como fonte de carbono no tempo de cultivo de 12 h (0,004, 0,002 e 0,004 U/mg célula, respectivamente). Nesse tempo, a atividade enzimática era razoavelmente alta enquanto a massa celular ainda era reduzida. Esses dados mais uma vez confirmam a eficiência da celobiose em induzir a atividade de β -glicosidase.

Uma vez que esse trabalho visou à produção da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 para purificação e caracterização, a atividade de β -glicosidase também foi expressa em atividade específica (U/mg de proteína) (Figura 11).

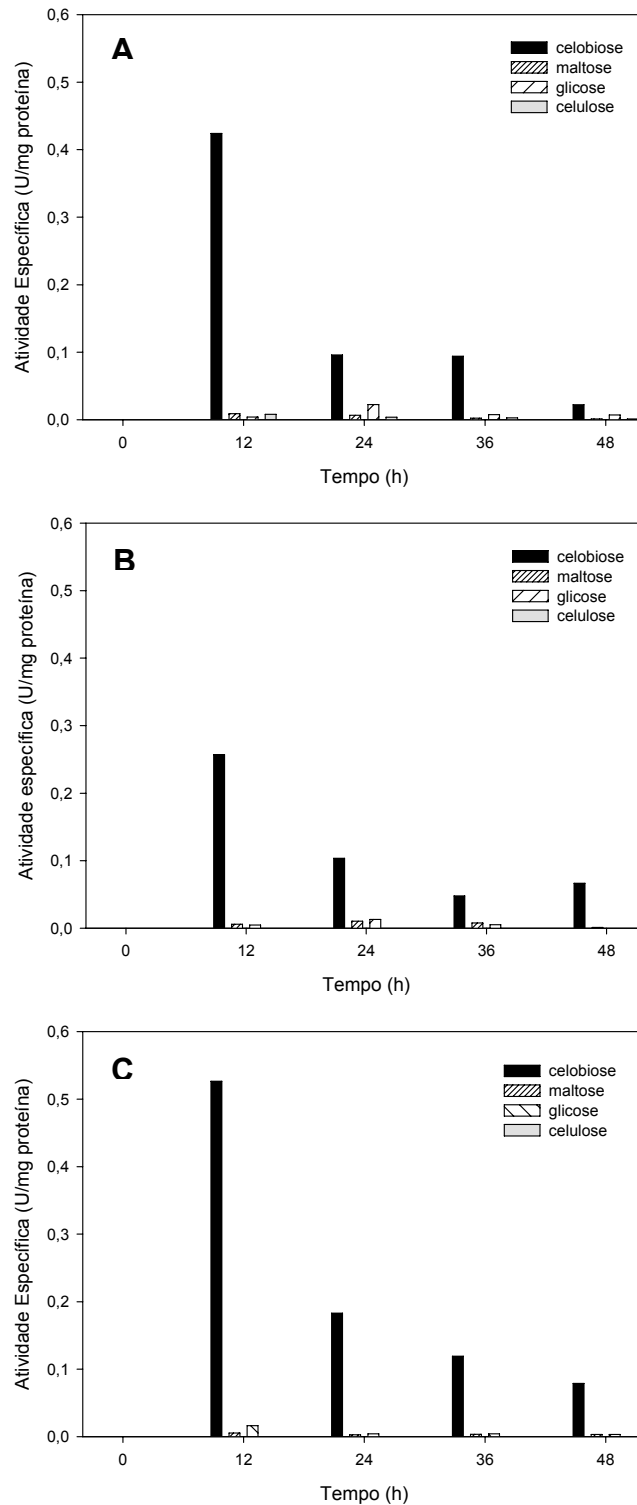


Figura 11: Atividade específica da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 cultivada nos meios (A) YP, (B) MME e (C) MM, em diferentes tempos e fontes de carbono.

Na Figura 11 A, B e C, maiores atividades específicas, 0,42, 0,26 e 0,53, U/mg proteína, foram determinadas nos meios YP, MME e MM, respectivamente, com celobiose no tempo de 12 h de cultivo. Assim, estes três meios contendo celobiose seriam os melhores para posterior purificação da

enzima intracelular, visto que as relações entre a atividade da β -glicosidase e a quantidade total de proteínas são as maiores.

Uma vez que o processo de purificação visa a aumentar a atividade específica da amostra enzimática, retirando as proteínas contaminantes, seria suposto que a amostra mais adequada para esse fim deveria ser aquela que apresentasse maior atividade específica inicial. Entretanto, outros fatores devem ser analisados no processo de produção da enzima pela levedura. Como mostrado na Tabela 1, *D. hansenii* UFV-1 cultivada no meio YP contendo celobiose, por 12 h, produziu quantidade expressiva de células (4,36 mg/mL), rendeu alta atividade enzimática (0,016 U/mL) e a atividade específica foi relativamente alta (0,42 U/mg proteína). Isso é desejável visto que a enzima é intracelular e, portanto, para este caso, quanto maior a quantidade de células, maior será a produção de β -glicosidase.

Tabela 1: Produção de β -glicosidase intracelular por *D. hansenii* UFV-1, nos meios YP, MME e MM contendo celobiose como fonte de carbono, no tempo 12 h de cultivo.

Meios (12 h)	Atividade β -glicosidase (U/mL)	Massa celular (mg/mL)	Atividade β -glicosidase (U/mg de proteína)
YP + Celobiose	0,016	4,36	0,42
MME + Celobiose	0,008	4,92	0,26
MM + Celobiose	0,004	0,96	0,53

Visando à produção e à purificação da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, com base nos resultados obtidos, selecionou-se, para o crescimento da levedura e conseqüente produção da enzima, o meio YP contendo celobiose como fonte de carbono, no tempo de 12 h de cultivo (Tabela 1). Vale ressaltar que, embora a atividade de β -glicosidase intracelular da levedura cultivada no meio YP com celobiose por 36 h tenha sido maior (0,019 U/mL) em relação ao tempo de 12 h, os valores foram muito próximos, e, assim, optou-se pelo cultivo por 12 h, levando a uma maior economia de tempo e de energia, além de evitar possíveis contaminações.

**5.2. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE
INTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1**

5.2.1. Purificação da β -glicosidase intracelular produzida pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A β -glicosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1 foi extraída conforme descrito no item 4.6 e as etapas de purificação estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Resumo das operações que constituíram o processo de purificação da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1.

Etapa	Proteína (mg)	Atividade (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto	1171,81	174,02	0,15	1	100
Diálise	621,06	125,43	0,2	1,4	72
DEAE-Sepharose	22,05	111,61	5,06	33,9	64
Ultrafiltração	8,88	55,05	6,19	41,6	32
Sephacryl S-300	4,75	45,6	9,6	64,4	26
Phenyl Sepharose	0,97	14,53	14,8	99,3	8

No processo de purificação da enzima (item 4.7), primeiramente o extrato bruto sofreu uma diálise, uma vez que o tampão de lise das células continha o detergente Triton X-100 e sais que interfeririam na etapa seguinte do processo de purificação. A amostra foi então submetida à cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE-Sepharose e, posteriormente, a fração de maior atividade enzimática foi concentrada por ultrafiltração e submetida à cromatografia de filtração em gel, em uma coluna de Sephacryl S-300. Como última etapa do processo, realizou-se uma cromatografia de interação hidrofóbica em uma coluna de Phenyl Sepharose.

O perfil cromatográfico da cromatografia de troca iônica está representado na Figura 12.

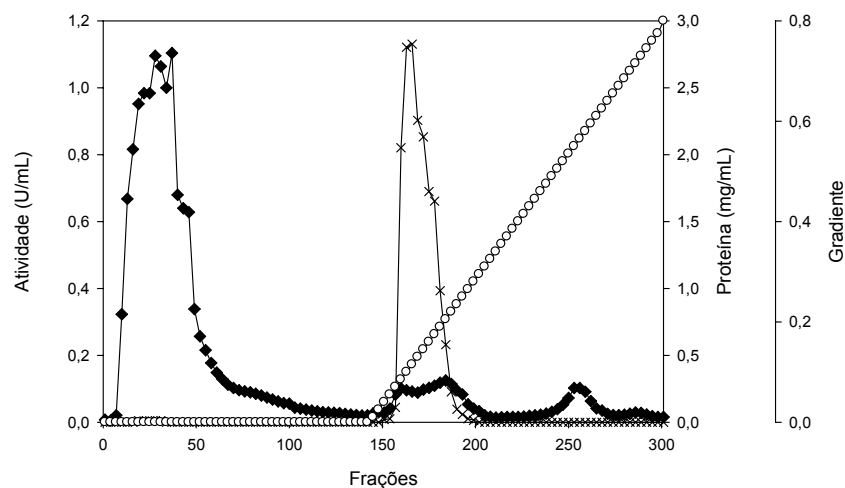


Figura 12: Perfil cromatográfico da amostra de β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, proveniente da etapa de diálise, em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose. Atividade de β -glicosidase (x); proteína (♦); gradiente de NaCl de 0 a 0,8 M (o).

O perfil da eluição da cromatografia em coluna de troca iônica revelou a presença de apenas uma fração protéica com atividade de β -glicosidase, que foi eluída com aproximadamente 0,1 M de NaCl. A maior parte das proteínas foi eluída em um pico anterior, que não apresentou atividade de β -glicosidase. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e concentradas por ultrafiltração para posteriormente serem submetidas à cromatografia de filtração em gel, em coluna Sephacryl S-300, em FPLC.

O perfil da cromatografia de filtração em gel está representado na Figura 13.

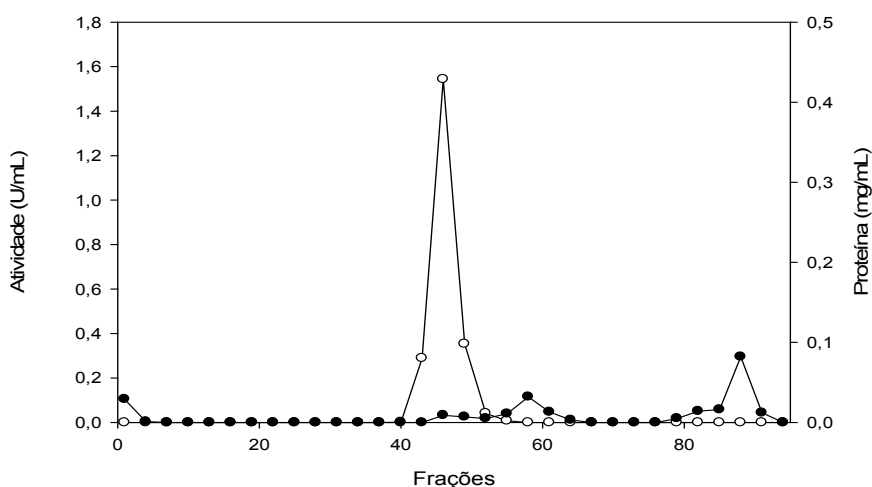


Figura 13: Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 proveniente da cromatografia de troca iônica, em cromatografia de filtração em gel, em coluna de Sephacryl S-300. Atividade de β -glicosidase (o) e proteína (●).

O perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel também revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de β -glicosidase. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica, em uma coluna de Phenyl Sepharose, em FPLC.

O perfil cromatográfico da interação hidrofóbica está representado na Figura 14.

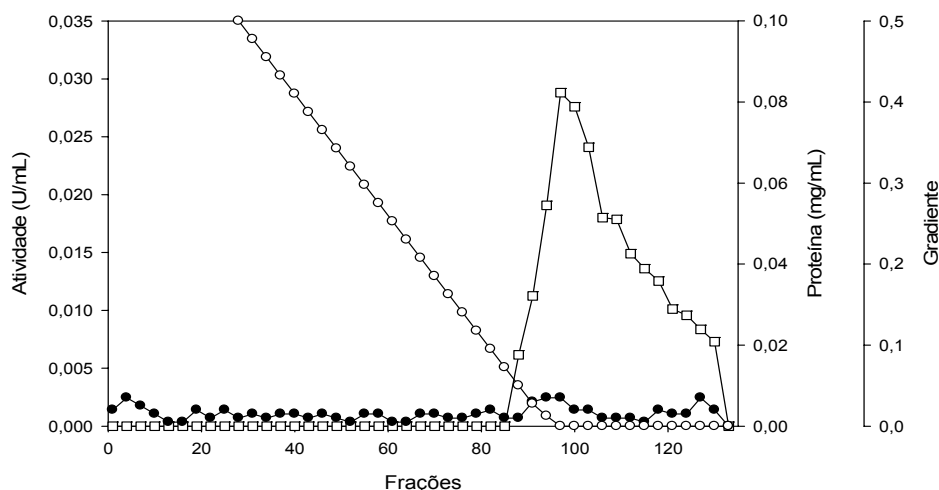


Figura 14: Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, proveniente da cromatografia de filtração em gel, em cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose. Atividade de β -glicosidase (\square); proteína (\bullet); gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,5 a 0 M (\circ).

O perfil de eluição da cromatografia de interação hidrofóbica também revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de β -glicosidase, que foi eluído quando o gradiente salino já tinha se esgotado, ou seja, apenas com tampão fosfato de sódio, 25 mM, pH 7,0. Foi observado um aumento na atividade específica de 1,5 vezes em relação à etapa anterior.

Ao final do processo de purificação, a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 apresentou um fator de purificação de 99,3 vezes, com um rendimento de 8 % (Tabela 2).

As frações ativas, eluídas de cada etapa do processo de purificação, foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE, 12,5 %) e o perfil de migração está apresentado na Figura 15. A análise eletroforética da amostra de β -glicosidase proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica revelou a presença de três bandas protéicas (Figura 15B).

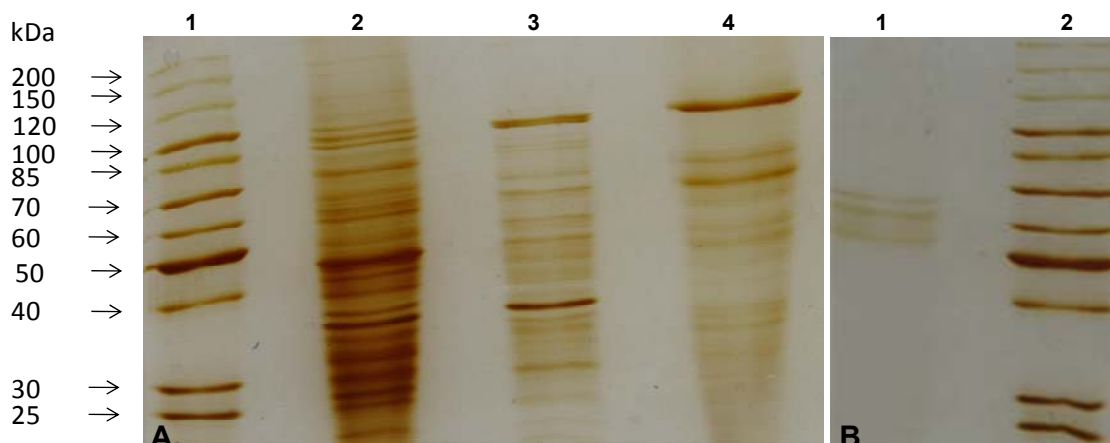


Figura 15: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,5 %) corado com prata de amostras contendo β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1. **(A)** 1- marcadores de massa molecular, 2 - extrato bruto, 3 - fração enzimática proveniente da troca iônica, 4 - fração enzimática proveniente de filtração em gel. **(B)** 1 - fração enzimática proveniente da interação hidrofóbica, 2 - marcadores de massa molecular.

Como pode ser verificado, com base no gel SDS-PAGE obtido, observa-se que o número de bandas protéicas diminuiu consideravelmente do extrato bruto para a última etapa de purificação, a cromatografia de interação hidrofóbica. Isso valida a tabela de purificação apresentada anteriormente (Tabela 2) pois confirma o alto grau de pureza da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 obtido após todas as etapas cromatográficas.

5.2.2. Determinação da massa molecular

A massa molecular da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 foi estimada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão com a distância percorrida no gel SDS-PAGE, em centímetros (Figura 16). Como a amostra proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica apresentou três bandas no gel, pressupõe-se que a enzima possa ser um trímero, com subunidades de 72, 68 e 58 kDa e, portanto, com massa molecular total de aproximadamente 198 kDa.

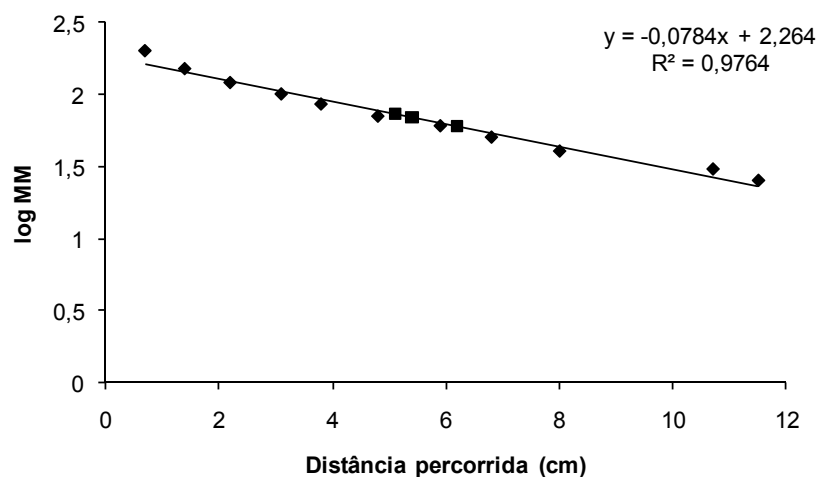


Figura 16: Determinação da massa molecular da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1. Distâncias percorridas pelos padrões protéicos (♦) e pela β -glicosidase (■).

Além disso, a massa molecular da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, na sua conformação nativa, foi determinada por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200, em FPLC. A massa molecular da enzima foi estimada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se as massas moleculares das proteínas padrão com a constante de eluição das mesmas (Figura 17). Como o volume de eluição do composto azul de dextrana foi de 39,85 mL e o volume de eluição da β -glicosidase foi de 47 mL, a constante de eluição da β -glicosidase foi 1,179 e, assim, o valor estimado para a massa molecular da enzima foi de aproximadamente 178 kDa.

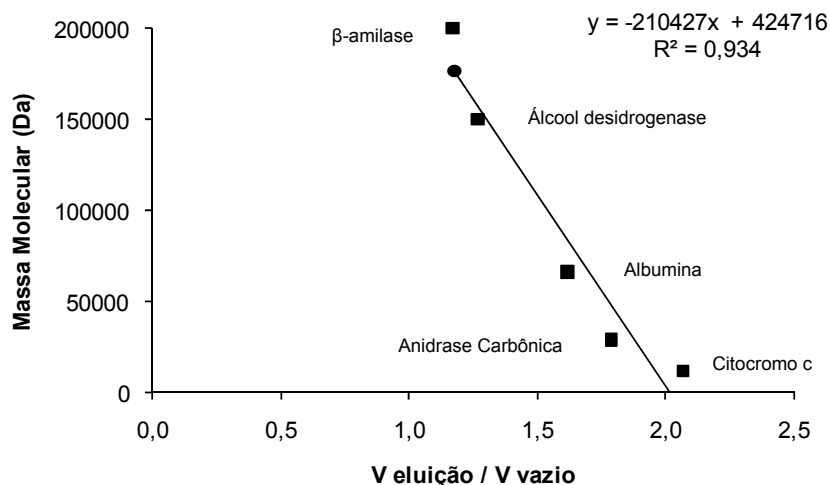


Figura 17: Determinação da massa molecular da β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 por filtração em gel em resina Sephacryl S-200, em FPLC. Constantes de eluição dos padrões de massa molecular (■); constante de eluição da β -glicosidase (●).

Comparando os resultados obtidos para a determinação da massa molecular por SDS-PAGE e por filtração em gel, percebe-se que as três bandas visualizadas no gel eletroforético equivalem a uma massa molecular de 198 kDa, que é um valor relativamente próximo ao obtido pela cromatografia de filtração em gel, de 178 kDa. Baseado nestes valores pode-se pressupor que a β -glicosidase intracelular seja um trímero, mais especificamente um heterotrímero. Obviamente seria necessário um estudo mais aprofundado para tal afirmação como, por exemplo, a realização da técnica de espectrometria de massa.

Dados existentes na literatura demonstram resultados diferentes ao obtido para a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1. Parry *et al.* (2001) relataram que a β -glicosidase extracelular purificada do fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou-se como um homotrímero, sendo que a massa molecular de cada um dos monômeros foi de 120 kDa, por SDS-PAGE. Belancic *et al.* (2003) concluíram que a massa molecular da β -glicosidase de *D. vanriijiae* foi de 100 kDa, quando determinada por SDS-PAGE. Villena *et al.* (2006) demonstraram que a β -glicosidase de *D. pseudopolymorphus* é um monômero e sua massa molecular nativa foi de aproximadamente 100 kDa. Riccio *et al.* (1999) relataram que duas β -glicosidasas extracelulares de *D. hansenii* apresentaram massas moleculares de 109 e 81 kDa por SDS-PAGE. Segundo os autores, as duas bandas foram observadas em gel nativo, indicando que as duas enzimas são monômeros. Já Yanai e Sato (1999)

determinaram que a massa molecular da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* Y-44 foi de 95 kDa por gel nativo, sendo esta enzima um monômero. Kaur *et al.* (2007) determinaram que a massa molecular da β -glicosidase de *Melanocarpus sp.* foi de aproximadamente 92 e 102 kDa, por SDS-PAGE e filtração em gel, respectivamente.

5.2.3. Caracterização Enzimática

5.2.3.1. Efeito do pH

Atividades acima de 65 % foram observadas na faixa de pH entre 5,5 e 7,0; entretanto, a atividade máxima foi determinada em pH 6,0. Atividades menores foram observadas em pH 5,0 (37 % da atividade) e 7,5 (34 %). Nos valores de pH 4,5 e 8 a atividade reduziu drasticamente e entre os pHs 2 e 4 a atividade da β -glicosidase foi nula (Figura 18).

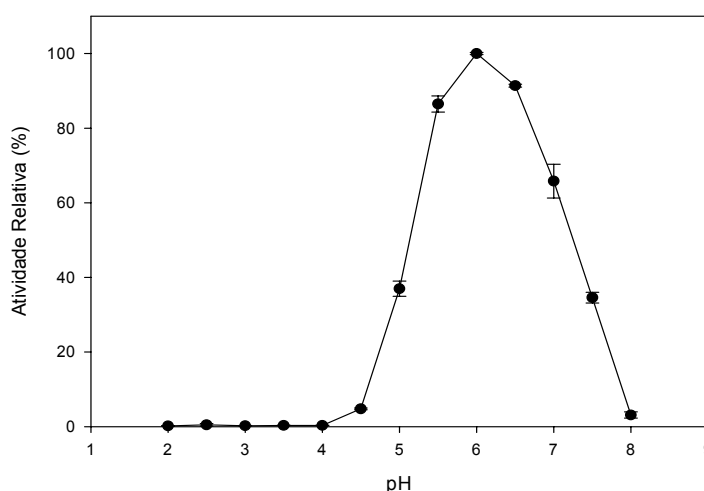


Figura 18: Efeito do pH na atividade da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 na temperatura de 45 °C.

Valores próximos foram obtidos para as β -glicosidases intracelulares do fungo *Sporotrichum thermophile* (Meyer e Canevascini, 1981). Estes autores purificaram duas β -glicosidases (aril- β -glicosidase e celobiase) que apresentaram pHs ótimos de 6,2 e 6,3, respectivamente. Gueguen *et al.* (1995) encontraram um valor de 6,5 para o pH ótimo de uma β -glicosidase intracelular de *Botrytis cinerea* (utilizando tampão fosfato de sódio, 0,1 M). Belancic *et al.*, (2003) encontraram para a β -glicosidase extracelular de *D. vanriijae* um pH

ótimo de 5,0. Segundo os autores, as atividades se mantiveram consideráveis entre os valores 4,0 e 5,5 (maiores do que 89 %). De acordo com Rosi *et al.* (1994), o pH ótimo para a β -glicosidase de *D. hansenii* foi de 4,0 a 5,0, a 40 °C. Um trabalho publicado por Riccio *et al.* (1999), revelou que duas β -glicosidasas secretadas por *D. hansenii* apresentaram pH ótimo em torno de 5,0 e que as enzimas mantiveram suas atividades elevadas (acima de 80 %) para os valores de pH entre 4,0 e 6,0. Um estudo conduzido por Villena *et al.* (2006) revelou que a β -glicosidase extracelular de *D. pseudopolymorphus* exibiu alta atividade em valores de pH mais ácidos. De acordo com os autores, a enzima exibiu um pH ótimo em torno de 4,0 e as atividades nos pHs 3,0, 6,0 e 7,0 foram 80, 94 e 82 % da atividade máxima exibida, respectivamente. A β -glicosidase intracelular do fungo *Termitomyces clypeatus* exibiu máxima atividade em pH 5,0, a 45 °C (Pal *et al.*, 2010).

Após incubação da β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 em valores de pH entre 2,0 e 8,0, no gelo, por 30 minutos, a enzima conseguiu manter a atividade relativamente alta, acima de 85 %, em pH 4,5 e acima de 90 % entre os valores de pH de 5,5 a 8,0 (Figura 19). Para os valores de pH abaixo de 3,5 a atividade enzimática foi nula e para o pH 4,0 a atividade ficou em torno de 64 %.

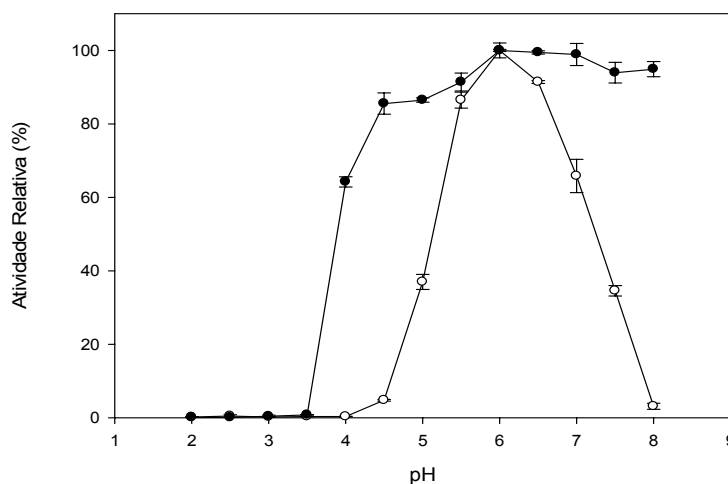


Figura 19: Efeito do pH sobre a estabilidade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1. Curva de pH (○) e curva de estabilidade (●).

Belancic *et al.* (2003) determinaram que a β -glicosidase de *D. vanrijae* foi sensível a baixos valores de pH; após 24 h de incubação em pH 3,15, a 25 °C, a enzima perdeu 80 % da sua atividade inicial. Segundo os mesmos

autores, a β -glicosidase se manteve mais estável em valores de pH entre 5,6 e 7,0, conservando 42 a 52 % da sua atividade inicial. De acordo Pal *et al.* (2010), a β -glicosidase intracelular do fungo *Termitomyces clypeatus* manteve 95 % de sua atividade nos valores de pH 6,0 a 7,0 após incubação por 1 h, à temperatura ambiente, em valores de pH 3,0 a 10,0.

5.2.3.2. Efeito da temperatura

Maiores atividades (acima de 70 %) foram detectadas entre as temperaturas de 30 e 50 °C, entretanto, a temperatura ótima foi de 45 °C. Em valores abaixo de 30 °C a atividade enzimática foi bastante diminuída (55 % a 25 °C, chegando a 20 % a 10 °C) e, a 55 °C, a atividade foi de 21 % (Figura 20).

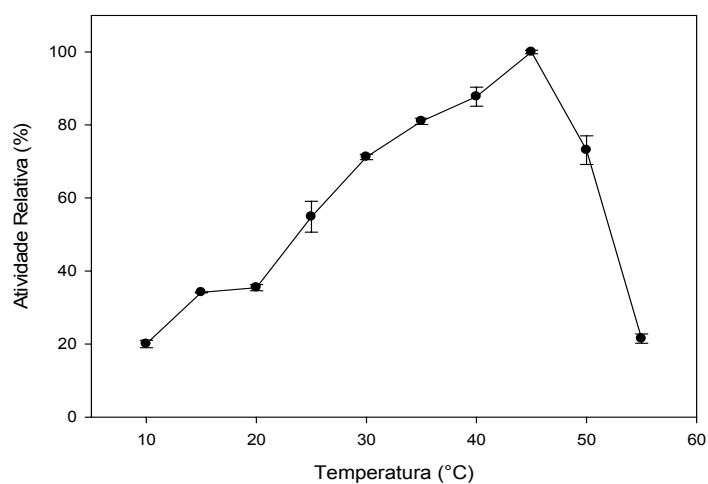


Figura 20: Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 em pH 6,0.

Valor próximo foi obtido para a β -glicosidase extracelular de *D. pseudopolymorphus* que, de acordo com Villena *et al.* (2006), teve sua temperatura ótima a 40 °C. Além disso, a enzima manteve 60 e 80 % da atividade a 20 e 30 °C, respectivamente. Ainda segundo os autores, a enzima foi praticamente inativada acima de 40 °C, mantendo apenas 20 e 10 % da atividade a 50 e 70 °C, respectivamente. A β -glicosidase de *D. varrijiae* apresentou temperatura ótima de 40 °C (Belancic *et al.*, 2003) mantendo 38 % da sua atividade a 20 °C e sendo totalmente inativada a 70 °C. Para a β -glicosidase intracelular de *Botrytis cinerea*, a temperatura ótima foi de 50 °C

(Gueguen *et al.*, 1995) e, de acordo com Pal *et al.* (2010), a β -glicosidase intracelular do fungo *Termitomyces clypeatus* apresentou temperatura ótima de 45 °C e manteve 95, 80 e 46 % da atividade nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C, respectivamente.

5.2.3.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, as amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C, por vários tempos. A β -glicosidase intracelular purificada manteve 92 % de sua atividade original quando pré-incubada a 40 °C, por um período de 60 minutos, perdendo 70 % de sua atividade após 10 h. No entanto, a 45 °C, a enzima manteve 83 % de sua atividade original por 15 minutos e, a 50 °C, a enzima perdeu 70 % da sua atividade em 1 h de pré-incubação. A 55 °C, a β -glicosidase manteve apenas 28 % de sua atividade original por 10 minutos, sendo praticamente inativada após 15 minutos (Figura 21).

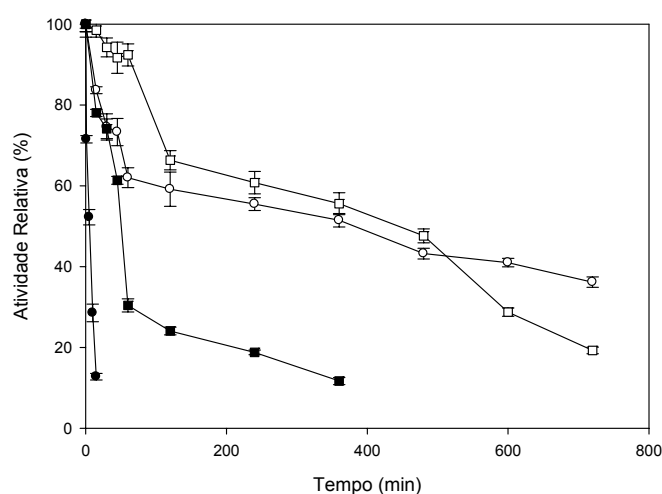


Figura 21: Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 40 °C (□); 45 °C (○), 50 °C (■) e 55 °C (●). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que a enzima intracelular foi razoavelmente termoestável em temperaturas mais elevadas (50 e 55 °C). Porém, a β -glicosidase apresentou maior estabilidade térmica a 40 e a 45 °C.

Observa-se também que entre 8 e 10 h, a enzima se torna mais estável na temperatura de 45 °C, comparada a 40 °C. Sendo as duas temperaturas muito próximas, para elucidar este fato seria necessário um estudo mais aprofundado da estrutura da enzima intracelular. Além disso, a levedura possivelmente pode ter se adaptado a temperaturas mais altas, o que favoreceu a estabilidade enzimática na temperatura de 45°C.

Villena *et al.* (2006) relataram que a β -glicosidase extracelular de *D. pseudopolymorphus* manteve uma atividade residual de 30 % após 3 h de incubação a 40 °C. De acordo com Pal *et al.* (2010), a β -glicosidase intracelular de *Termitomyces clypeatus* manteve 64 % da sua atividade após incubação por 1 h a 70 °C, sendo considerada bastante termoestável.

A atividade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 também foi avaliada na temperatura de 4 °C, durante 3 meses, e na temperatura ambiente durante 15 dias. A enzima manteve 97 % de sua atividade original nos primeiros 30 dias, 75 % com 60 dias e 62 % com 90 dias de pré-incubação a 4 °C. Já à temperatura ambiente, a β -glicosidase manteve 87 % de sua atividade com 1 dia, 61 % com 5 dias e 47 % com 15 dias, incubada à 23 °C.

De acordo com Riccio *et al.* (1999), a β -glicosidase de *D. hansenii* manteve 90 % de sua atividade após 55 dias de estocagem, em pH 5,0, a 4 °C. Entretanto, de acordo com Riou *et al.* (1998), a β -glicosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* manteve a totalidade da sua atividade após 6 meses de estocagem a 4 °C.

5.2.3.4. Meia-vida da β -glicosidase intracelular

Para determinação dos valores de meia-vida da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1, os ensaios foram conduzidos nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C. Na temperatura de 40 °C, o tempo estimado para a meia-vida da β -glicosidase intracelular foi de 356 minutos e a 45 °C, a meia-vida foi de 312 minutos. Porém, a 50 °C, a meia-vida foi de 73 minutos e, a 55 °C, a meia-vida foi de somente 5 minutos (Figura 22).

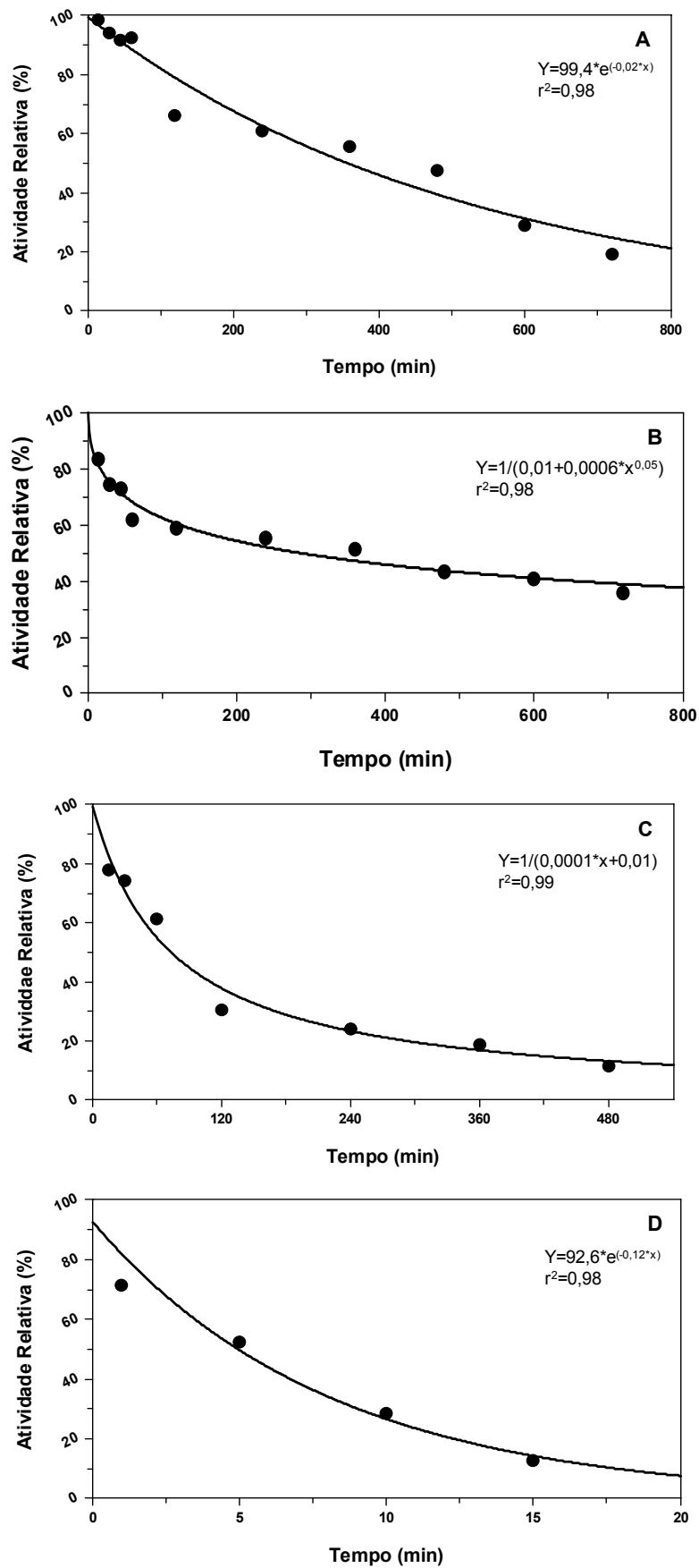


Figura 22: Valores de meia-vida estimados para a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 em diferentes temperaturas. **(A)** 40 °C, **(B)** 45 °C, **(C)** 50 °C e **(D)** 55 °C.

Analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que a β -glicosidase poderia ser utilizada em processos biotecnológicos que são realizados a temperaturas mais brandas, como 40 ou 45 °C, por um tempo relativamente elevado, uma vez que o tempo necessário para a enzima perder metade da sua atividade a 40 e a 45 °C foi de aproximadamente 6 e 5 h, respectivamente.

A meia-vida a 40 °C foi superior ao valor encontrado para 45 °C (Figura 22), embora em tempos mais prolongados de incubação da enzima a 45 °C sua estabilidade tenha sido ligeiramente superior do que a 40 °C (Figura 21).

Souza (2009) determinou a meia-vida para duas β -glicosidases intracelulares do fungo *Humicola insolens* (BGH I e BGH II). Para BGH I, a meia-vida foi 47 minutos a 60 °C e superior a 2 h a 55 °C, enquanto que BGH II apresentou meia-vida de 40 minutos a 55 °C.

5.2.3.5. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})

O efeito da concentração do substrato ρ NP β Glc na velocidade da reação catalisada pela β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten e pelo gráfico de Lineweaver-Burk.

Os parâmetros cinéticos, calculados a partir da curva de Michaelis-Menten, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de K_M , V_{max} , $V_{max\ esp}$, V_{max}/K_M , K_{cat} e K_{cat}/K_M com o substrato sintético ρ NP β Glc.

Substrato	K_M (mM)	V_{max} (mM/min)	$V_{max\ esp}$ (U/mg proteína)	V_{max}/K_M (min ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
ρ NP β Glc	0,43	0,02	10,5	0,05	32,9	75,8 x 10 ³

Os valores de K_M e V_{max} para a β -glicosidase intracelular de *D.hansenii* UFV-1, calculados pela curva de Michaelis-Menten, são 0,43 mM e 0,02 mM/min. A constante catalítica desta enzima (K_{cat}) é 32,9 s⁻¹ e a constante de especificidade (K_{cat}/K_M) é 75,8x10³ M⁻¹s⁻¹. Pelo gráfico duplo-recíproco, os valores de K_M e V_{max} são 0,53 mM e 0,02 mM/min, respectivamente.

Belancic *et al.* (2003) determinaram os parâmetros cinéticos para a β -glicosidase de *D. vanriijae* utilizando como substratos celobiose e ρ NP β Glc.

Para a celobiose, os valores encontrados para K_M e V_{max} foram 57,9 mM e 84,3 U/mg de proteína, respectivamente. Para o substrato sintético ρ NP β Glc, os valores de K_M e V_{max} foram 0,77 mM e 668 U/mg proteína, respectivamente. A β -glicosidase intracelular do fungo *Termitomyces clypeatus* apresentou um valor de K_M de 0,148 mM e V_{max} igual a 0,077 U/mg proteína, valores determinados com a utilização do substrato ρ NP β Glc (Pal *et al.*, 2010). Kaur *et al.* (2007) determinaram que a β -glicosidase do fungo termofílico *Melanocarpus sp.* apresentou valores de K_M e V_{max} , 3,3 mM e 43,68 U/mg proteína, respectivamente, ambos determinados com o substrato ρ NP β Glc.

Pode-se perceber que as β -glicosidases de diferentes fontes possuem diferentes afinidades pelo substrato sintético ρ NP β Glc. A β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 apresentou menores valores de K_M e V_{max} esp do que a mesma enzima de *D. vanriijae* (Belancic *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que a β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 apresenta maior afinidade pelo ρ NP β Glc e, provavelmente, a formação do complexo ES não é a etapa limitante da reação.

5.2.3.6. Especificidade da β -glicosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A enzima β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar diferentes substratos, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 com substratos sintéticos, naturais e o polímero celulose.

Substrato	Concentração final	Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) \pm DP
$\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$	0,5 Mm	0,102 \pm 0,00200
$\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Man}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Man}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Xyl}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$	0,5 mM	0
$m\text{NP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$o\text{NP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$o\text{NP}\beta\text{Glc}$	0,5 mM	0,030 \pm 0,00080
Celobiose	2,5 mM	0,002 \pm 0,00002
Lactose	2,5 mM	0
Maltose	2,5 mM	0
Melibiose	2,5 mM	0
Gentiobiose	2,5 mM	0
Sacarose	2,5 mM	0
Celulose	0,25 %	0,013 \pm 0,00009
Celulose	0,025 %	0,018 \pm 0,00050

De acordo com os resultados relativos aos substratos sintéticos apresentados na Tabela 4, a enzima β -glicosidase demonstrou ser altamente seletiva, apresentando especificidade absoluta para a glicose em posição β , uma vez que hidrolisou apenas os substratos $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$ e $o\text{NP}\beta\text{Glc}$, este último em menor escala. A enzima não hidrolisou os outros substratos sintéticos com resíduos de açúcar diferentes da glicose ou unidos por ligação α .

Contrariamente, em um estudo conduzido por Riccio *et al.* (1999), a β -glicosidase de *D. hansenii* foi capaz de hidrolisar diferentes substratos sintéticos com configurações α e β , em concentrações de 15 mM. Segundo os autores, a enzima foi capaz de hidrolisar $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$ (100 % de atividade enzimática) e ρ -nitofenil- β -D-fucopiranosídeo (15 %). Ainda, a β -glicosidase

apresentou baixa atividade contra ρ NP β Gal (1,5 %), ρ NP α Glc (2 %), ρ NP β Xyl (1,5 %) e ρ -nitrofenil- β -D-celobiosídeo (1,5 %). A enzima não foi capaz de hidrolisar outros substratos sintéticos testados pelos autores.

A β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolisar ρ NP β Glc (100 % de atividade enzimática), ρ NP β Xyl (50 %) e ρ NP β Gal (8,2 %), todos estes substratos na concentração de 5 mM (Riou *et al.*, 1998).

De acordo com os resultados relativos aos substratos naturais apresentados na Tabela 4, a enzima β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 foi altamente específica para a ligação β -(1,4) entre resíduos de glicose visto que a enzima só foi capaz de hidrolisar o açúcar celobiose.

Villena *et al.* (2006) conduziram um estudo da especificidade da β -glicosidase de *D. pseudopolymorphus* com diferentes substratos naturais na concentração de 10 mM. Segundo os autores, a enzima apresentou maior atividade quando o substrato foi a celobiose (100 % de atividade enzimática). Quando foi utilizado maltose, a atividade caiu à metade (52 %) e, com a lactose, a enzima não apresentou atividade enzimática.

Pal *et al.* (2010) determinaram que a β -glicosidase intracelular de *Termitomyces clypeatus* apresentou máxima atividade com celobiose (0,15 U/mg) mas sua atividade foi nula com melibiose, ambos os substratos na concentração de 4 mM.

Riou *et al.* (1998) relataram que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolisar gentiobiose (100 % de atividade enzimática), celobiose (88 %), lactose (73 %) e maltose (68 %), todos estes substratos na concentração de 2 mg/mL. Porém, segundo os autores, para o substrato sacarose na concentração de 2 mg/mL, nenhuma atividade foi detectada.

Por fim, de acordo com os dados relativos à hidrólise da celulose da Tabela 4, observa-se que a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 foi capaz de hidrolisar a celulose, nas duas concentrações testadas.

A β -glicosidase intracelular de *Termitomyces clypeatus* não apresentou atividade quando o polímero celulose foi utilizado como substrato (Pal *et al.*, 2010) e segundo Riou *et al.* (1998), a celulose se mostrou um substrato muito pobre para a atividade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*.

5.2.3.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase intracelular purificada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, soluções com concentrações definidas desses compostos foram pré-incubadas com a enzima purificada de acordo com o item 4.14.8 (Tabela 5). A atividade relativa foi calculada considerando-se a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100 % (controle).

Tabela 5: Atividade relativa da β -glicosidase intracelular purificada de *D. hansenii* submetida aos diferentes efetores.

Efedor	Concentração	Atividade Relativa (%) \pm DP	Concentração	Atividade Relativa (%) \pm DP
Na ₂ SO ₄	0,2 mM	117,92 \pm 2,13	2 mM	127,96 \pm 3,27
NaCl	0,2 mM	122,73 \pm 0,40	2 mM	126,78 \pm 1,33
NaF	0,2 mM	124,57 \pm 0,20	2 mM	117,40 \pm 0,20
KI	0,2 mM	130,68 \pm 1,23	2 mM	112,25 \pm 1,34
KCl	0,2 mM	124,24 \pm 0,27	2 mM	0
CaCl ₂	0,2 mM	116,31 \pm 0,80	2 mM	124,8 \pm 1,80
CaCO ₃	0,2 mM	120,46 \pm 1,87	2 mM	122,02 \pm 0,73
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 mM	111,60 \pm 2,29	2 mM	120,412 \pm 2,07
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mM	115,40 \pm 1,63	2 mM	127,22 \pm 3,78
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mM	120,84 \pm 0,67	2 mM	125,89 \pm 2,20
ZnCl ₂	0,2 mM	120,79 \pm 1,80	2 mM	57,64 \pm 1,07
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,2 mM	117,44 \pm 2,13	2 mM	126,69 \pm 0,27
MnSO ₄ .H ₂ O	0,2 mM	127,25 \pm 3,2	2 mM	119,66 \pm 0,07
AlCl ₃ .6H ₂ O	0,2 mM	118,58 \pm 0,40	2 mM	134,85 \pm 0,07
FeCl ₃	0,2 mM	0	2 mM	0
AgNO ₃	0,2 mM	0	2 mM	0
SDS	0,2 mM	0	2 mM	0
Uréia	0,2 mM	129,61 \pm 0,53	2 mM	134,80 \pm 0,53
Glicose	0,2 mM	121,69 \pm 2,07	2 mM	136,64 \pm 2,07
EDTA	0,2 mM	123,39 \pm 0,94	2 mM	109,80 \pm 1,39
Maltose	0,2 mM	93,28 \pm 1,81	2 mM	131,52 \pm 0,48
Celobiose	0,2 mM	97,63 \pm 1,65	2 mM	93,19 \pm 2,41
Celulose	0,02%	105,50 \pm 1,72	0,20%	94,68 \pm 0,96
Glicerol	0,2 mM	102,60 \pm 1,30	2 mM	90,21 \pm 1,65
Etanol	0,2 mM	92,05 \pm 3,05	2 mM	100,80 \pm 2,06
Ácido acético	0,2 mM	100,85 \pm 0,67	2 mM	96,36 \pm 0,24
Triton X-100	0,02%	95,46 \pm 2,33	0,20%	89,87 \pm 1,99
β -mercaptoetanol	0,2 mM	132,85 \pm 2,73	2 mM	170,26 \pm 0,34
Controle	0,2 mM	100 \pm 1,05	2 mM	100 \pm 1,80

Íons monovalentes e divalentes, agentes redutores e açúcares promoveram efeitos diversos sobre a atividade da β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 (Tabela 5). A atividade da enzima foi completamente inibida por cloreto de ferro, nitrato de prata e pelo detergente dodecilsulfato de sódio (SDS), todos nas concentrações finais de 0,2 e 2 mM, e por cloreto de potássio na concentração final de 2 mM. A atividade da β -glicosidase foi consideravelmente diminuída pelo cloreto de zinco na concentração final de 2 mM, a enzima perdeu 53% de sua atividade.

Pelo fato da atividade enzimática da β -glicosidase ser inibida por SDS, pode-se deduzir que nas condições do ensaio, a integridade da estrutura tridimensional da enzima, fundamental para a atividade catalítica, foi perdida em função da ação desnaturante desse detergente.

A β -glicosidase intracelular foi muito pouco ou não foi afetada por maltose, na concentração final de 0,2 mM, e também por celobiose, glicerol, etanol e ácido acético, todos nas concentrações finais de 0,2 e 2 mM, e por celulose e pelo detergente Triton X-100, ambos nas concentrações finais de 0,02 e 0,2 %.

Porém, a atividade da β -glicosidase foi aumentada por sulfato de sódio, cloreto de sódio, fluoreto de sódio, iodeto de potássio, cloreto de cálcio, carbonato de cálcio, cloreto de cobalto, sulfato de magnésio, sulfato de zinco, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de alumínio, ureia, glicose e ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), todos nas concentrações finais de 0,2 e 2 mM. O cloreto de potássio e o cloreto de zinco, nas concentrações finais de 0,2 mM, também aumentaram a atividade enzimática enquanto que a maltose só foi capaz de ativar a enzima na concentração final de 2 mM. β -mercaptoetanol foi o agente que mais promoveu ativação enzimática, tanto na concentração final de 0,2 mM como em 2 mM, sendo que a atividade aumentou 70 % quando a concentração do referido efector foi de 2 mM.

Como a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1 teve sua atividade aumentada por EDTA, que é um agente quelante, pressupõe-se que esta não é uma metaloenzima. Curiosamente, vale ressaltar que os íons cálcio aumentaram a atividade enzimática. Isso é bastante interessante pelo fato de que as células da levedura *D. hansenii* UFV-1, contendo a β -glicosidase intracelular, podem ser utilizadas de forma imobilizada em solução se alginato de cálcio (item 5.3). Por fim, o β -mercaptoetanol, um agente redutor, contribuiu

para ativação da enzima. Isso poderia ser explicado pelo fato de que algumas ligações químicas que fazem parte da estrutura da enzima, na forma reduzida, são favoráveis à atividade catalítica.

Villena *et al.* (2006) estudaram o efeito de diferentes efetores na atividade de β -glicosidase de *D. pseudopolymorphus*, todos em concentrações de 1 e 10 mM. A enzima foi moderadamente inibida por 10 mM de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , apresentando 69, 81 e 53 % da atividade máxima, respectivamente. Para a mesma concentração de 10 mM, os íons Co^{2+} , K^+ e Na^+ não inibiram a atividade enzimática. A β -glicosidase foi ativada por Co^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ nas concentração de 1 mM. Além disso, a enzima foi moderadamente ativada por ácido acético e etanol, em concentração de 1 mM, mas foi inibida pelos mesmos compostos na concentração de 10 mM, apresentando 47 e 63 % da atividade máxima, respectivamente. A enzima apresentou 70 % de sua atividade máxima com 1 mM de glicose e foi moderadamente ativada por este mesmo açúcar na concentração de 10 mM. Finalmente, a enzima foi ativada por glicerol na concentração de 1 mM (119 % da atividade máxima), não foi afetada por glicerol na concentração de 10 mM e foi inibida por SDS na concentração de 1 mM, perdendo 70 % de sua atividade máxima.

De acordo com Belancic *et al.* (2003), a atividade de β -glicosidase de *D. vanriijae* foi totalmente inibida na presença de SDS 0,4 %.

Riou *et al.* (1998) também testaram o efeito de diferentes efetores sobre a atividade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* (os cátions foram utilizados na concentração de 5 mM e os reagentes na concentração de 10 mM). Segundo os autores, a β -glicosidase sofreu uma significativa inativação na presença de Ag^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+} e SDS. A atividade enzimática não foi afetada por EDTA e a enzima não requereu Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Co^{2+} para sua atividade mas foi significativamente ativada por Mn^{2+} .

De acordo com Pal *et al.* (2010), a β -glicosidase de *Termitomyces clypeatus* perdeu 34 % de sua atividade na presença de uréia (4mM). O detergente Triton X-100 (1 % v/v) não afetou a atividade da enzima enquanto o β -mercaptoetanol (1 % v/v) aumentou a atividade em 54 %.

5.3. IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1 EM ALGINATO DE CÁLCIO

5.3.1. Efeito do tempo de permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 na atividade de β -glicosidase

Foi avaliado o efeito do tempo de permeabilização na atividade da β -glicosidase presente nas células de *D. hansenii* UFV-1. A permeabilização foi realizada com etanol 50 % (v/v), uma vez que, este reagente foi o que promoveu melhores condições de permeabilização das células de *D. hansenii* UFV-1, sem que houvesse perda da atividade enzimática (Junior *et al.*, 2009). As atividades da enzima contida nas células permeabilizadas com etanol 50 % (v/v), pelos tempos 5, 10 e 15 minutos, estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Atividade da β -glicosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1 permeabilizadas com etanol 50 % (v/v), por diferentes tempos.

Tempo (min)	Atividade enzimática (U/g célula) ¹
5	0,19 a
10	0,14 b
15	0,09 c

¹ médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os valores de atividade de β -glicosidase determinados nos tempos testados (Tabela 5) demonstram que a maior atividade foi obtida quando as células da levedura foram permeabilizadas pelo menor tempo, 5 minutos. Nos tempos de 10 e 15 minutos a enzima apresentou, respectivamente, 74 e 52 % da atividade determinada com 5 minutos de permeabilização. Como o aumento do tempo de permeabilização resultou em maior período de exposição da enzima a condições adversas, como contato com o solvente, temperatura ambiente e agitação, provavelmente esses efeitos promoveram maior desestabilização da estrutura da enzima, com conseqüente diminuição da atividade.

Vale ressaltar que a obtenção da condição ideal de permeabilização das células é muito importante para que haja o aumento da taxa de difusão sem haver perdas do conteúdo protéico. Assim, a permeabilização branda, realizada neste experimento, facilitou o transporte de substrato e de produto mas os poros formados não permitiram a saída da enzima de interesse.

5.3.2. Estudo das condições de imobilização das células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Para a determinação das melhores condições de imobilização das células de *D. hansenii* UFV-1, alguns parâmetros que pudessem afetar a atividade da β -glicosidase intracelular foram testados: efeito da relação célula:alginate, efeito do tempo de reticulação das esferas de alginate, efeito do número de esferas ensaiadas e efeito da agitação durante o ensaio de atividade.

5.3.2.1. Efeito da relação célula:alginate na atividade da β -glicosidase

As células de *D. hansenii* UFV-1 permeabilizadas foram imobilizadas em gel de alginate de cálcio, conforme descrito no item 4.13, testando a relação entre a concentração de células e de alginate, visando a uma maior atividade enzimática. Para isso, foram testadas as proporções de 4 e 8 g de célula para cada 1 g de alginate (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito da relação célula:alginate na atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1

Relação célula:alginate (g:g)	Atividade enzimática (U/g célula) ¹
4:1	0,13
8:1	0,14

¹ não houve diferença significativa entre as médias, pelo teste F de Snedecor, a 5% de significância.

Como apresentado na Tabela 6, o aumento da relação célula:alginate não promoveu aumento significativo na atividade da β -glicosidase intracelular.

Uma das grandes vantagens da imobilização de células em alginate é a possibilidade de uso de grandes concentrações de células imobilizadas por volume de gel. Porém, existe um limite entre o aumento da concentração de células e de atividade enzimática presente nas células imobilizadas. Isso porque, quanto maiores as concentrações de células por esfera de alginate, maior será a dificuldade de difusão, tanto do substrato como do produto, diminuindo assim a atividade enzimática (Junior *et al.*, 2009).

Junior *et al.* (2009) perceberam um efeito diferente ao obtido neste trabalho quando testaram o efeito da relação célula:alginate na atividade da α -galactosidase contidas nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. Segundo os autores, a atividade de α -galactosidase foi maior quando se utilizou a proporção de 4 g de célula para 1 g de alginate (0,9 U/g célula).

5.3.2.2. Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginate na atividade da β -glicosidase

Após a formação das esferas de alginate, estas foram mantidas em solução de cloreto de cálcio 0,1 M, por 12 e 24 h, para formação da rede tridimensional do gel de alginate de cálcio, visando ao aumento da atividade enzimática (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito do tempo de reticulação na atividade de β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1

Tempo de reticulação (h)	Atividade enzimática (U/g célula) ¹
12	0,55 a
24	0,42 b

¹ as médias diferiram significativamente, pelo teste F de Snedecor, a 5% de significância.

Como observado na Tabela 7, a atividade enzimática foi significativamente maior quando as esferas de alginate foram submetidas ao tempo de reticulação de 12 h, quando comparadas àquelas submetidas ao tempo de 24 h (perda de 25 % da atividade enzimática).

Porém, quando as atividades foram mensuradas um mês após o armazenamento das esferas de alginate em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0, a 4 °C, os resultados foram diferentes (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito do tempo de reticulação na atividade de β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 após 1 mês de armazenamento das esferas de alginato em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6,0, a 4 °C

Tempo de reticulação (h)	Atividade enzimática (U/g célula) ¹
12	0,39 b
24	0,86 a

¹ as médias diferiram significativamente, pelo teste F de Snedecor, a 5% de significância.

Pela análise da Tabela 9, percebe-se que, um mês após a formação das esferas de alginato, aquelas que foram submetidas ao tempo de reticulação de 24 h apresentaram um aumento na atividade de β -glicosidase, 2,2 vezes maior do que a atividade enzimática das esferas relativas ao tempo de 12 h. As esferas submetidas a 12 h de reticulação tiveram sua atividade reduzida após um mês de armazenamento. Sendo assim, para o presente trabalho, adotou-se o tempo de reticulação de 24 h das esferas de alginato.

Uma possível explicação para este resultado é que, provavelmente, com o tempo de armazenamento, a rede tridimensional do gel de alginato se estabilizou. Com isso, as esferas de alginato sofreram um inchaço (efeito *swelling*) causado pela absorção de água. Provavelmente o equilíbrio de *swelling* tenha sido atingido diferentemente para as esferas reticuladas por 12 e 24 h. Segundo Junior *et al.* (2009), quanto maior o tempo de maturação em cloreto de cálcio, maior a estabilidade das esferas de alginato, devido ao fortalecimento da rede tridimensional do gel de alginato formado. Sendo assim, as esferas submetidas ao tempo de reticulação de 24 h, por serem mais estáveis, promoveram maior proteção da molécula da enzima durante o *swelling*, o que explica os resultados observados.

5.3.2.3. Efeito do número de esferas de alginato ensaiadas na atividade da β -glicosidase

Para melhor quantificação da atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas, foram testados para o ensaio de atividade enzimática, 3,4 e 12 esferas de alginato (Tabela 10).

Tabela 10: Efeito do número de esferas de alginato ensaiadas na atividade de β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1

Número de esferas	Atividade enzimática	
	U \pm DP	(U/esfera) ¹
3	0,06 \pm 0,02	0,18 b
4	0,10 \pm 0,04	0,26 a
12	0,23 \pm 0,05	0,19 ab

¹ médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Como pode ser observado na Tabela 9, quando se aumenta o número de esferas de alginato por ensaio, a atividade, em U, aumenta. Porém, se analisarmos as atividades em U/esfera, os resultados indicam que a proporção que promove maior atividade é de 4 esferas por ensaio. Assim, adotou-se 4 esferas como sendo o número ideal para a realização dos ensaios de atividade de β -glicosidase porque este número proporciona valores de atividade enzimática satisfatórios e economia de material.

Junior *et al.* (2009) também utilizaram em seu trabalho 4 esferas de alginato de cálcio contendo células de *D. hansenii* UFV-1 para a quantificação da atividade de α -galactosidase da levedura.

5.3.2.4. Efeito da agitação durante o ensaio de determinação da atividade enzimática na atividade de β -glicosidase

Quando foi realizado o ensaio para o estudo do efeito da imobilização em alginato de cálcio na atividade da β -glicosidase das células permeabilizadas de *D. hansenii* UFV-1, percebeu-se que o valor de atividade da β -glicosidase contida nas células permeabilizadas livres foi 10 vezes maior do que o valor de atividade para as células imobilizadas (Tabela 11).

Tabela 11: Efeito da imobilização das células de *D. hansenii* UFV-1 na atividade da β -glicosidase

Células	Atividade enzimática (U/g célula) \pm DP
Permeabilizadas Livres	1,42 \pm 0,015
Permeabilizadas Imobilizadas	0,10 \pm 0,039

Jordão *et al.* (2001), trabalhando com células de *Kluyveromyces lactis* contendo β -galactosidase, relataram a diminuição de 4,5 vezes na atividade de β -galactosidase após a imobilização em alginato. Junior *et al.* (2009) relataram uma diminuição de 20,5 vezes na atividade de α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 após imobilização das células permeabilizadas em alginato de cálcio.

A baixa capacidade de difusão é uma característica exibida por sistemas de imobilização em alginato devido ao alto grau de ligações cruzadas da rede tridimensional deste gel, o que acaba por limitar a taxa de difusão tanto do substrato como do produto (Florido *et al.*, 2001). Entretanto, a baixa atividade enzimática dos sistemas de imobilização em alginato pode ser compensada pela capacidade de reutilização, que leva a um aumento da produtividade final destes sistemas e, conseqüentemente, da economia do processo (Junior *et al.*, 2006).

Sendo assim, os resultados exibidos na Tabela 10 já eram esperados. Então, numa tentativa de minimizar esta perda de atividade enzimática ocorrida com a imobilização das células, testou-se o efeito da agitação sobre a atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. Logo, o ensaio para a determinação da atividade da β -glicosidase foi realizado sob agitação lenta, utilizando-se um agitador de bancada e um banho termostático. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Efeito da agitação lenta sobre a atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1.

Condição do ensaio	Atividade enzimática (U/g célula) ¹
Sem agitação	0,98 b
Com agitação	1,78 a

¹ as médias diferiram significativamente, pelo teste F de Snedecor, a 5% de significância.

De acordo com a Tabela 12, a atividade da β -glicosidase aumentou e praticamente dobrou com o ensaio realizado sob agitação lenta. Assim, observa-se que a agitação favoreceu a entrada do substrato e a saída do produto das células imobilizadas. Conclui-se, então, que a perda de atividade que ocorre com a imobilização das células pode ser compensada com a agitação durante a realização do ensaio de determinação da atividade enzimática. Também é necessário enfatizar que para uma aplicação

biotecnológica das esferas de alginato contendo a β -glicosidase intracelular de *D. hansenii* UFV-1, a agitação seria fundamental para maiores rendimento e eficiência do processo.

5.3.3. Caracterização da β -glicosidase contida em células imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

5.3.3.1. Efeito do pH

A influência do pH na atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 foi estudada na faixa compreendida entre 2,0 e 8,0 (Figura 23).

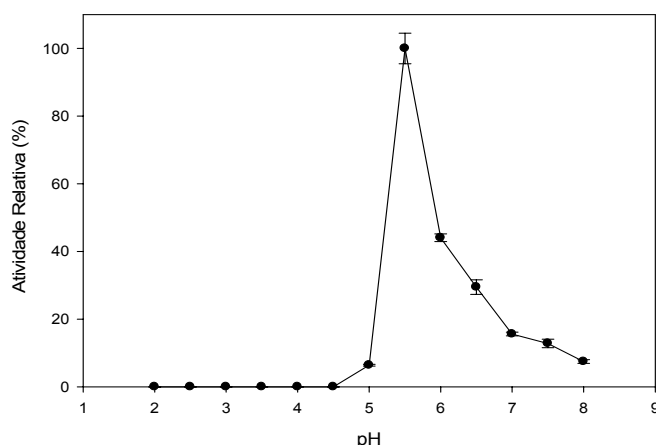


Figura 23: Efeito do pH na atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1.

Observa-se que a enzima contida nas células imobilizadas da levedura apresentou valor de pH ótimo de 5,5, ligeiramente mais ácido do que o valor de 6,0 apresentado para a atividade máxima da enzima livre. Esta mudança do valor de pH ótimo para um valor mais baixo, após a imobilização em alginato de cálcio, pode ser explicada, em parte, pelo efeito do micro ambiente na matriz do gel de alginato de cálcio, particularmente devido à presença de cargas positivas dos íons Ca^{+2} no suporte (Adami *et al.*, 1998).

Além disso, os grupos hidrofílicos carregados presentes na estrutura polimérica do gel de alginato levam ao efeito de *swelling*, pela absorção de água. O equilíbrio de *swelling* é afetado pelo pH do meio e, certamente, no

valor de pH 5,5, a capacidade de difusão de substrato e produto dentro da rede tridimensional do gel é maior.

Junior *et al.* (2009) obtiveram um resultado muito semelhante ao determinar o pH ótimo para a α -galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. Segundo os autores, o pH ótimo igual a 4,0 para a enzima contida nas células imobilizadas da levedura foi ligeiramente mais ácido do que o valor de 4,5 apresentado para atividade máxima da enzima contida nas células permeabilizadas livres da levedura. Wang *et al.* (2010) também relataram que a imobilização da celobiase comercial em gel composto de alginato de sódio e quitosana levou a um decaimento no valor de pH ótimo de uma unidade em relação à enzima livre. Para a celobiase livre, o pH ótimo foi 5,0 enquanto que para a enzima imobilizada, o pH ótimo foi 4,0. Assim, os autores concluíram que a matriz do gel se comporta como um polication.

Após incubação das células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 contendo a β -glicosidase em valores de pH entre 2,0 e 8,0, no gelo, por 30 minutos, percebeu-se que a enzima manteve a atividade relativamente alta, acima de 90 %, entre os valores de pH 6,0 e 8,0. Além disso, a β -glicosidase manteve 83 e 70 % da sua atividade nos valores de pH de 5,5 e 5,0, respectivamente. Para os valores de pH abaixo de 3,0 a atividade enzimática foi nula e para os pHs 3,5, 4,0 e 4,5 a atividade ficou em torno de 6, 14 e 23 %, respectivamente (Figura 24).

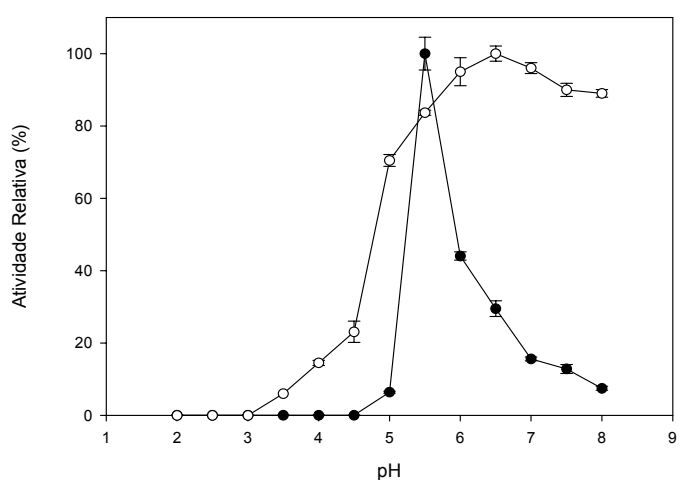


Figura 24: Efeito do pH sobre a estabilidade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. Curva de pH (●) e curva de estabilidade (o).

Um fato interessante é que a imobilização em alginato de cálcio provavelmente protegeu a β -glicosidase contida nas células, de forma que a enzima incubada em valores mais extremos de pH apresentou atividade enzimática quando o pH voltou a ser o ótimo.

5.3.3.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 foi testado na faixa de 10 a 60 °C (Figura 25).

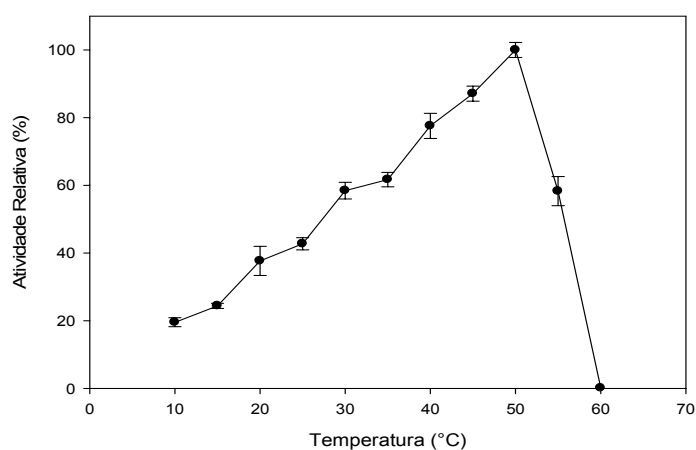


Figura 25: Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, em pH 5,5.

Como pode ser observado na Figura 26, a temperatura ótima para a enzima contida nas células imobilizadas foi 50 °C, valor superior àquele obtido para a temperatura ótima da enzima livre (45 °C). Na temperatura ótima da β -glicosidase contida nas células imobilizadas, a enzima livre apresentou apenas 73 % da sua atividade máxima. Além disso, a β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 manteve 58 % da sua atividade à 55 °C, enquanto que nesta temperatura a enzima livre só manteve 21 % da sua atividade máxima. O deslocamento da temperatura ótima de atividade de β -glicosidase para 50 °C, observado nas células imobilizadas, provavelmente favoreceu o equilíbrio de *swelling*, levando a uma maior taxa de difusão de substrato e de produto através da rede tridimensional do gel.

Junior *et al.* (2009) obtiveram um resultado semelhante para a α -galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 que apresentou temperatura ótima de 70 °C enquanto que, a enzima contida nas células livres, teve sua temperatura ótima no valor de 60 °C, ou seja, uma mudança de 10 unidades na temperatura ótima.

Esses resultados também sugerem que a imobilização em alginato de cálcio, tanto de enzimas como de células contendo enzimas, protege a enzima contra os efeitos deletérios de altas temperaturas, conferindo maior estabilidade a essas moléculas.

5.3.3.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, as esferas de alginato contendo a β -glicosidase imobilizada foram pré-incubadas nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C, por vários tempos (Figura 26).

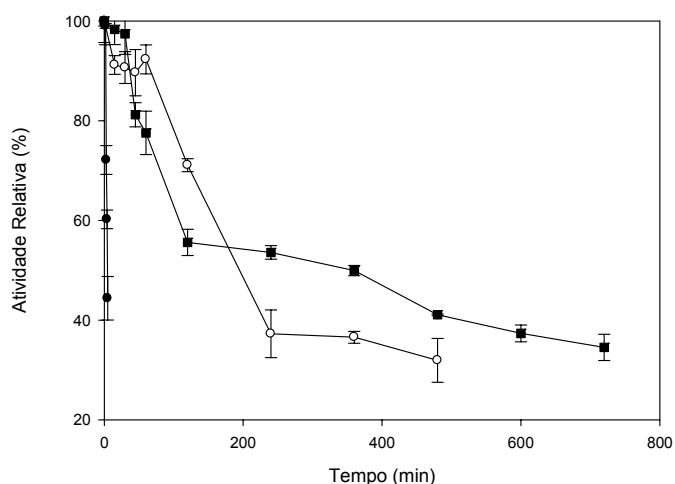


Figura 26: Efeito da temperatura na estabilidade térmica da β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. As amostras foram pré-incubadas nas temperaturas: 45 (■), 50 (○) e 55 °C (●). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

De acordo com a Figura 27, observa-se que a estabilidade térmica, a 45 e 50 °C, para a enzima contida nas células imobilizadas foi superior a da enzima livre. A 45 e a 50 °C, a enzima imobilizada ainda manteve acima de 90 % da sua atividade máxima com 60 minutos de pré-incubação, enquanto a enzima livre a 45 e a 50 °C reteve aproximadamente 60 % da sua atividade nesse período.

Segundo Wang *et al.* (2010), o processo de imobilização leva a um aumento da rigidez enzimática, comumente refletido por um aumento na estabilidade térmica. Além disso, segundo os mesmos autores, a imobilização preserva a estrutura terciária da proteína e previne mudanças conformacionais na enzima em diferentes ambientes.

Zhou *et al.* (2010) imobilizaram a enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de alginato-quitosana. Os autores relataram que a imobilização enzimática resultou em um aumento da estabilidade térmica sendo que, após a incubação por 1 h a 65 °C, a enzima livre reteve 22,05 % da atividade máxima enquanto que, a enzima imobilizada, reteve 64,73 %. Os autores concluíram que o aumento na estabilidade térmica das enzimas imobilizadas é devido ao gel de alginato-quitosana que absorve uma quantidade considerável de calor e protege a enzima, retardando seu processo de desnaturação. Assim, o processo de imobilização torna as enzimas mais úteis em aplicações biotecnológicas.

A estabilidade térmica apresentada para a β -glicosidase livre de *D. hansenii* UFV-1, a 55 °C, foi maior do que a obtida para a enzima contida nas células imobilizadas em alginato de cálcio. Isso pode ser explicado pelo fato de a temperatura 55 °C afetar a estrutura da esfera de alginato e, assim, o processo de imobilização não seria capaz de suportar essa temperatura.

5.3.3.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

O efeito da concentração do substrato ρ NP β Glc na velocidade da reação catalisada pela β -glicosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1 foi determinado pela curva de Michaelis-Menten (Tabela 13) e pelo gráfico de Lineweaver-Burk.

Tabela 13: Valores de K_M e V_{max} com o substrato sintético ρ NP β Glc.

Substrato	K_M app. (mM)	V_{max} app (mM/min)
ρ NP β Glc	4,35	3,63

Os valores de $K_{M \text{ app.}}$ e de $V_{\text{max app.}}$ para o substrato $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$ foram 4,35 mM e 3,63 U/g célula, respectivamente, calculados pela curva de Michaelis-Menten. Pelo gráfico duplo-recíproco, os valores de $K_{M \text{ app.}}$ e $V_{\text{max app.}}$ foram 3,95 mM e 3,28 U/g célula, respectivamente.

A β -glicosidase contida nas células imobilizadas apresentou um valor de $K_{M \text{ app.}}$ dez vezes maior do que aquele apresentado para o K_M da enzima livre (0,43 mM). Isso porque a enzima contida nas células imobilizadas provavelmente apresentou menor acessibilidade ao substrato $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$. Zhou *et al.* (2010) relataram que o valor de K_M para a álcool desidrogenase de *S. cerevisiae* foi de 24,45 mM com o substrato ácido fenilglioxílico enquanto que o K_M para a enzima imobilizada foi de 37,33 mM. Segundo os autores, o aumento no valor de K_M para a enzima imobilizada se deve à resistência difusional imposta pelo gel de alginato-quitosana.

6. CONCLUSÕES

- A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 produziu, em meio contendo celobiose, uma β -glicosidase intracelular de massa molecular aproximada de 198 kDa, estimada por SDS-PAGE, e de 178 kDa, estimada por cromatografia de filtração em gel, sendo provavelmente um trímero.
- A β -glicosidase livre apresentou atividade máxima em pH 6,0 e a 45 °C enquanto que o processo de imobilização das células em alginato de cálcio deslocou a atividade máxima para um valor mais ácido de pH, 5,5, e aumentou a temperatura ótima para 50 °C.
- A β -glicosidase contida nas células imobilizadas apresentou maior termoestabilidade do que a enzima livre a 45 e a 50 °C.
- Para a β -glicosidase contida nas células imobilizadas, o valor de $K_{M\ app}$ com o substrato $pNP\beta Glc$ foi 10 vezes superior ao valor de K_M obtido para a enzima livre.
- A β -glicosidase intracelular purificada foi altamente seletiva, apresentando especificidade absoluta para a glicose em posição β .
- A β -glicosidase intracelular purificada foi totalmente inibida por cloreto de ferro, nitrato de prata e SDS, todos nas concentrações finais de 0,2 e 2 mM, e por cloreto de potássio na concentração final de 2 mM.
- A agitação do meio reacional foi fundamental para maiores rendimento e eficiência de hidrólise para a β -glicosidase contida nas células imobilizadas.

7. PERSPECTIVAS

A β -glicosidase de *D. hansenii* UFV-1 pode ser indicada para diversas aplicações na indústria de alimentos. Por exemplo, a enzima poderia ser indicada para uso na hidrólise de isoflavonas glicosídicas em suas formas aglicona em produtos de soja, visto que a enzima apresenta termoestabilidade razoável para este tipo de aplicação. Poderia também ser indicada para o processamento de frutas, visando a melhorar a qualidade do sabor, aroma, coloração, clarificação e viscosidade de sucos.

Por se tratar de uma levedura não patogênica e encontrada em diversos tipos de alimentos, a utilização das células deste microrganismo imobilizadas em alginato de cálcio não acarretaria problemas para a saúde humana. Assim, a aplicação da enzima imobilizada seria ainda mais interessante para os processos industriais descritos acima. Neste caso, a enzima é mais estável e o processo é mais econômico por não haver gastos com purificação enzimática e ainda pela possibilidade de reutilização das esferas de alginato contendo a enzima β -glicosidase. A aplicação dessa enzima e das células imobilizadas será testada nos processos descritos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adami, A.; Cavazzomi, V.; Trezzi, M.; Craveri, R. (1998). Cellobiose hydrolysis by *Trichosporon pullulans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnology Bioengineering*, 32, 391-395.

Adlercreutz, H. (2002). Phytoestrogens and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 113–118

Andrade, M.J.; Córdoba, J.J.; Casado, E.M.; Córdoba, M.G.; Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichón”. *Meat Science* 85, 256–264.

Azevedo, J.L. (1985). Genética de microrganismos em biotecnologia de engenharia genética/Coordenação de João Lúcio de Azevedo [et al.]. Piracicaba: FEALQ 1985. II 20, p.155-157.

Barbagallo, R.N.; Spagna, G.; Palmeri, R.; Torriani, S. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 292-296.

Barbosa, A.M.; Giese, E.C.; Dekker, R.F.H.; Borsato, D.; Pérez, A.I.B.; Iranzo, J.F.U. (2010). Extracellular β -glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *New Biotechnology*, 27, 374-381.

Belancic, A.; Gunata, Z.; Vallier, M.J.; Agosin, E. (2003). β -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1453-1459.

Bhatia, Y.; Misha, S.; Bisaria, V.S. (2002). Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 375-407.

Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A. and Galzy, P. (1983) Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia* Van der Walt. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 1–6.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.

Bolumar, T.; Sanz, Y.; Aristoy, M-C.; Toldrá, F. (2003 a). Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 227-232.

Bolumar, T.; Sanz, Y.; Aristoy, M-C.; Toldrá, F. (2003 b). Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 141-151.

Bolumar, T.; Sanz, Y.; Aristoy, M-C.; Toldrá, F. (2008). Purification and characterisation of proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 135–141.

Branca F., Lorenzetti S. (2005). Health effects of phytoestrogens. *Forum of Nutrition*, 57, 100–111.

Brown, K.D.; Brown, N.M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W.T.; Wolfe, B.E.; Kirschner, A.S.; Heubi, J.E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76,447–453.

Cairns, J.R.K.; Esen, A. (2010). β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 3389–3405.

Cashman K.D. (2007). Diet, nutrition, and bone health. *Journal of Nutrition*, 137, 2507–2512.

Cassidy A., de Pascual T.S., Rimbach G. (2003) Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5, 1–15.

Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. and Todd, B.E.N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 2–8.

Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.

Daenen, L.; Sterckx, F.; Delvaux, F.R.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*, 8, 1103–1114.

Darriet, P. H., Boidron, J.N.; Dubourdieu, D. (1988). L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du muscat a petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisie*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22, 189–195.

Decker, C.; Visser, J.; Scheier, P. (2000). β -Glucosidases from Five Black *Aspergillus* Species: Estudy of Their Physico-Chemical and Biocatalytic Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4929-4936.

Del Bove, M.; Lattanzi, M.; Rellini, P.; Pelliccia, C.; Fatichenti, F.; Cardinali, G. (2009). Comparison of molecular and metabolomic methods as characterization tools of *Debaryomyces hansenii* cheese isolates. *Food Microbiology*, 26, 453–459.

Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M. and Baynove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 291–296.

Dhake, A.B., Patil, M.B. (2005). Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 170–176.

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. (2002). Screening of various glycosidases for the synthesis of octyl glucoside. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 752–757.

Duffy C., Perez K., Partridge A. (2007). Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *Cancer Journal of Clinicians*, 57, 260–277.

Durá, A.; Flores, M.; Toldrá, F. (2002). Purification and characterization of a glutaminase from *Debaryomyces hansenii* sp. *International Journal Food Microbiology*, 76, 117-126.

Encinas, J.P.; Lopes-Díaz, T.M.; Garcia-Lopez, A.O.; Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54, 203-208.

Estruch, J.J.; Chriqui, D.; Grossman, K.; Schell, J.; Spena, A. (1991). The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO Journal*, 10, 2889-2895.

Florido, E.B.; Garibay, M.C.; Ruiz, L.G.; Azaola, A. (2001). Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for for inulin hydrolysis. *Process Biochemistry*, 37, 513-519.

Geerlings A., Ibañez M.M.L., Memelinks J., Heijden R.V.D., Verpoorte R. (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine β -D-glucosidase, an enzyme in terpenol indole alkaloid biosynthesis in *Cantharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 3051–3056.

González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, 1469–1475.

Gueguen, Y.; Chemardin, A.A.; Galzy, P. (1995). Purification and Characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 900-906

Gueguen, Y., Chemardin, P., Labrot, P., Arnaud, A., Galzy, P. (1997). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 469–476.

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Arnaud, A., Galzy, P. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida*

wickerhamii β -glucosidases. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 50, 499-506.

Hashimoto, W.; Miki, H.; Nankai, H.; Sato, N.; Kawai, S.; Murata, K. (1998). Molecular Cloning of Two Genes for β -D-glicosidase in *Bacillus* sp. GL1 and Identification of One as a Gellan-Degrading Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360, 1-9.

Hays W.S., Jenison S.A., Yamada T., Pastuszyn A., Glew R.H. (1996). Primary structure of the β -glucosidase of guinea pig liver. *Biochemistry Journal*, 319, 829-37.

Hernández, L.F.; Fernández-González, M.; Briones, A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 171-176.

Howard, R.L.; Abotsi, E.; Van Rensburg, J.E.L.; Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619.

Izumi, T.; Piskula, M.K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota Y.; Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, 130, 1695-1699.

Jin, Y.L.; Speers, R.A. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 31, 421-440.

Jordão, R.B.; Brandi, I.V.; Passos, F.M.L. (2001). Stabilization of the activity of β -galactosidase in permeabilized immobilized cells for hydrolysis of lactose in Milk. *Journal of Food Biochemistry*, 25, 257-266.

Junior, W.C.S. (2006). Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 67 p., Dissertação, Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola.

Junior, W.C.S.; Rezende, S.T., Viana, P.A.; Falkoski, D.L.; Reis, A.P., Machado, S.M.; Barros, E.G.; Guimarães, V.M. (2009). Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilised in alginate. *Food Chemistry*, 114, 589-593.

Kaur, J.; Chadha, B.S.; Bhupinder, S.; Kumar, B.A.; Kaur, G.S.; Saini, H.S. (2007). Purification and characterization of beta-glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 260-270.

Kawakami, Y.; Tsurugasaki, W.; Nakamura, S.; Osada, K. (2005). Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 205-212.

Kaya, M.; Ito, J.; Kotaka, A.; Matsumura, K.; Bando, H.; Sahara, H.; Ogino, C.; Shibasaki, S.; Kuroda, K.; Ueda, M.; Kondo, A.; Hata, Y. (2008). Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 51-60.

Khan, I.; Akhtar, M.W. (2010). The biotechnological perspective of Beta-Glucosidases. *Nature Precedings*: doi: 10.1038/npre.2010.4945.1.

Kondo, A.; Liu, Y., Furuta, M.; Fujita, Y.; Matsumoto, T., Fukuda, H. (2000). Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 806-811.

Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Marchant, R.; Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21, 377-397.

Kubal, B.S.; D'Souza, S.F. (2004). Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59, 61-64.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.

Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology*, 66, 506-577.

Manzanares, P., Rojas, V., Genove's, S. and Valle's, S. (2000). A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 95-103.

Marazza, J.A., Garro M.S., de Giori, G.S. (2009). Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiology*, 26, 333-339.

Masoud, W.; Jakobsen, M. (2005). The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *International Dairy Journal*, 15, 69-77.

Mateo, J.J. and Di Stefano, R. (1997). Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology*, 14, 583-591.

McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Biochemistry*, 49, 183-186.

McMahon, H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K. and Jasinski, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 198-203.

Menon,V.; Prakash,G.; Rao,M. (2010). Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: Galactoxyloglucan predominant hemicelluloses. *Journal of Biotechnology*, 148, 233-239.

Meyer,H.P.; Canevascini, G. (1981). Separation and some properties of two intracellular β -glucosidases of *Sporotrichum (Cryosporium) thermophile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 924-931.

Miller, G.L. (1956). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Miralles, G., Baudoin, R.; Dumas, D.; Baptiste, D.; Hubert, P.; Stoltz, J.F.; Dellacherie, E.; Mainard, D.; Nette, P., Payan, E.J. (2001). Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: *In vitro* engineering of cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 268-278.

Nursevin, O.H.; Yasemin, O.A.; Erdener, K., Yasemin, I.; Dursun, S. (2003). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 114-119.

Olensen, P.T.; Stahnke, L. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, 56, 357-368.

Omoni, A.O., Aluko, R.E. (2005). Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63, 272–283.

Pal S., Banik S.P., Ghorai S., Chowdhury S., Khowala, S. (2010). Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, 101, 2412–2420.

Pan, L.H.; Luo, J.P.; Jiang, S.T. (2007). Study on isoflavone active aglycone preparation by immobilized beta-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 23, 1060-1064.

Park, Y.P.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M.; Scamparini, A.R.P. (2001). Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 20, 12-14.

Park D., Huang T., Frishman W.H. (2005). Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiology in Review*, 13,13-17.

Parry, N.J.; Beever, D.E.; Owen, E.; Vandenberghe, I.; Van Beeumen, J.; Bhat, M.K. (2001). Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journal*, 353, 117-127.

Petersen, K.M.; Westall, S.; Jespersen, L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses. *Journal Dairy Science*, 85, 478-486.

Pikington, P.H.; Margaritis, A.; Mensour, N.A.; Russel, I. (1998). Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, 19-31.

Politzer, K.; Bon, E.P.S.; Alves, F.C.; Ferrara, M.A.; Freitas, S.P.; Leitão, V.F.; Costa, R.B.; Silva, M.V.A. (2006). *Enzimas Industriais e Especiais*. Documento elaborado no âmbito do convênio 143/2005 CGEE – IQ/UFRJ-FUJB, relativo ao Termo de Referência Fórum de Biotecnologia 03, Rio de Janeiro, RJ.

Prakash, G.; Varma, A.J.; Prabhune, A.; Shouche, Y.; Rao, M. (2010). Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicelluloses using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, 102, 3304-3308.

Rakin, M.; Mojovik, L.; Nikolic, S.; Vukasinovic, M.; Nedovic, V. (2009). Bioethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells. *African Journal of Biotechnology*, 8, 464-471.

Ribani, M. (2008). Obtenção e aplicação de padrões de isoflavonas de soja. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 114 p., Tese de doutorado, Instituto de Química.

Riccio, P., Rossano, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., D'Elia, A.; Rosi, I. (1999). Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microbial Technology*, 24, 123–129.

Riou, C.; Salmon, J.M.; Vallier, M.J.; Gunata, Z.; Barre, P. (1998). Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3607–3614.

Rosi, I.; Vinella, M., Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 519–527.

Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P. (1996). Optimization of growth conditions on biosynthesis of extracellular β -glucosidase by *Debaryomyces hansenii*. *Abstract from 9th International Symposium on Yeasts*, Sydney, Australia, 49.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

Saraydin, D.; Oztop, H.N.; Karadag, E.; Oztopo, a.Y.; Isikver, Y.; Guven, O. (2002). The use of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on radiation crosslinked acrylamide-maleic acid hydrogel carriers for production of ethyl alcohol. *Process Biochemistry*, 37, 1351-1357.

Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W.T., Wolfe, B.E., Kirschner, A.S., Heubi, J.E. (2002). Evidence of lack of absorption of soy isoflavones in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 447–453.

Setchell K.D., Cole S.J. (2003). Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4146–4155.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M, D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N, M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.

Song W.O., Chun O.K., Hwang I., Shin H.S., Kim B.G., Kim K.S., Lee S.Y., Shin D., Lee S.G. (2007). Soy isoflavones as safe functional ingredients. *Journal of Medicinal Food*, 10, 571-580.

Sorensen, B.B.; Samuelsen, H. (1996). The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat of meat starter culture organism, *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal Food Microbiology*, 32, 59-71.

Souza, F.H.M. (2009). Caracterização da atividade β -glicosidásica de *Humicola insolens*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 84 p., Dissertação, Programa de Pós Graduação em Química.

Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C. and Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 1036–1041.

Stano, J.; Tokhtaeva, E.; Micieta, K., Fulmekova, M.; Varadinova, M.; Foltan, V.; Duricek, M. (2005). Melibiase in immobilized cells of watermelon. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 65-68.

Strauss, M.L.; Jolly, N.P.; Lambrechts, M.G.; Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeast. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 182-190.

Syed D.N., Khan N., Afaq F., Mukhtar H. (2007). Chemoprevention of prostate cancer through dietary agents: progress and promise. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16, 2193-2203.

Tate, D.; Reynolds, A.G. (2006). Validation of a rapid method for measuring β -glucosidase activity in fermenting Muscat grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 60–68.

Terra W.R., Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109, 1–62.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2005). *Microbiologia*, 8ª edição, p.804.

Tsangalis D., Wilcox G., Shah N.P., Stojanovska L. (2005). Bioavailability of isoflavone phytoestrogens in postmenopausal women consuming soya milk fermented with probiotic bifidobacteria. *British Journal of Nutrition*, 93, 867–877.

Tsangalis D., Wilcox G., Shah N.P., McGill A.E., Stojanovska L. (2007). Urinary excretion of equol by postmenopausal women consuming soymilk fermented by probiotic bifidobacteria. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 438–441.

Van der Sluis, C.; Stoffelen, C.J.; Castelein, S.J.; Engbers, G.H.; Ter Schure, E.G.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. (2001). Immobilized salt-tolerant yeasts: application of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for flavor production. *Journal of Biotechnology*, 88, 129-139.

Vasserot, Y., Christiaens, H., Chemardin, P., Arnaud, A. and Galzy, P. (1989). Purification and properties of a β -glucosidase of *Hanseniaspora uvarum* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 271–279.

Vasserot, Y., Chemardin, P., Arnaud, A. and Galzy, P. (1990). Evidence for the β -glucosidase activity and cellobiose fermentation by various *Kloeckera* strains. *Acta Biotechnologica* 5, 439–445.

Viana, P.A.; Rezende, S.T.; Marques, V.M.; Trevizano, L.M., Passos, F.M.L.; Oliveira, M.G.A.; Bemquerer, M.P.; Oliveira, J.S.; Guimarães, V.M. (2006). Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2385-2391.

Viana, P.A.; Rezende, S.T.; Falkoski, D.L.; Leite, T.A.; José, I.N.; Moreira, M.A.; Guimarães, V.M. (2007). Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. *Food Chemistry*, 103, 331-337.

Villena, M.A.; Iranzo, J.F.U.; Gundllapalli, S.B.; Otero, R.R.C.; Pérez, A.I.B. (2006). Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 229–234.

Wang, F.; Su, R.; Qi, W.; Zhang, M.; He, Z. (2010). Preparation and activity of bubbling-immobilized cellobiase within chitosan-alginate composite. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40, 57-64.

Wu W.H., Kang Y.P., Wang N.H., Jou H.J., Wang T.A. (2006). Sesame ingestion affects sex hormones, antioxidant status, and blood lipids in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 136, 1270–1275.

Xue, Y.; Yu, J.; Song, X. (2009). Hydrolysis of soy isoflavone glycosides by recombinant β -glucosidase from hyperthermophile *Thermotoga maritime*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1401–1408.

Yanai, T.; Sato, M. (1999). Isolation and properties of β -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 231-235.

Zhang, Y.H.P; Himmel, M.E.; Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, 452-481.

Zhou, Z.; Li, G.; Li, Y. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. (2010). *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 21-26.