



JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA ANGELOTTI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA β -
GLICOSIDASE DE *ASPERGILLUS sp.***

CAMPINAS

2013

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA ANGELOTTI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA β -
GLICOSIDASE DE *ASPERGILLUS sp.***

Orientadora: Profa. Dra. Helia Harumi Sato

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós -
graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA ANGELOTTI E ORIENTADA PELA PROFESSORA DRA. HÉLIA
HARUMI SATO.

Assinatura do Orientador

Campinas, SP

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

An43e Angelotti, Joelise de Alencar Figueira.
Estudo da produção, imobilização e aplicação da β -glicosidase de *Aspergillus sp* / Joelise de Alencar Figueira Angelotti -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Hélia Harumi Sato.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Beta-glicosidase. 2. Imobilização. 3. *Aspergillus sp*.
4. Isoflavonas. 5. Enzimas I. Sato, Hélia Harumi, 1952-
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: : Study of production, immobilization and application of β -glucosidase from *Aspergillus sp*

Palavras-chave em inglês:

Beta-glicosidase

Immobilization

Aspergillus sp

Isoflavones

Enzymes

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helia Harumi Sato [Orientador]

Gabriela Alves Macedo

Haroldo Yukio Kawaguti

Luciana Ferracini dos Santos

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 08-03-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Membro Titular (FEA - DCA – UNICAMP)

Dr. Haroldo Yukio Kawaguti

Membro Titular (QUANTAS)

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos

Membro Titular (UNI ARARAS)

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar

Membro Titular (ESALQ)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Membro Suplente (FEA - DEA – UNICAMP)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Membro Suplente (FEA - DCA – UNICAMP)

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri

Membro Suplente (UNESP – Botucatu)

À Deus, pois creio que nada é possível sem Ele.
À minha família: Figueira e Angelotti, fonte de força.
Aos amigos, indispensáveis em qualquer jornada.
Aos professores, Hélia Harumi Sato e Pedro Fernandes, por serem
exemplos de sabedoria e dedicação.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus por ter me conduzido para a realização dessa conquista, não permitindo que desanimasse diante dos obstáculos e colocando em meu caminho pessoas generosas, amigas e competentes. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pela generosidade, sabedoria, e carinho que me foram oferecidos durante essa jornada.

Ao Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST) e ao programa Erasmus Mundus Start up por me concederem a oportunidade de realizar parte do meu trabalho em Portugal. Em especial ao Prof. Pedro Carlos de Barros Fernandes por me receber e orientar meu trabalho no IST e pela maneira tão simples de partilhar seus conhecimentos. Aos colegas do IST, Dragana, Jaqueline, Vanessa, Carla, Rymenis, Margarida, Catarina, Teresa, Ruzzica.

A minha fantástica amiga Rosa Delgado que cuidou de mim como uma filha no período em Portugal. E aos meus queridos Sandra, João e Gonçalo pela amizade.

A professora Gabriela Alves Macedo pelo consentimento da utilização do HPLC para determinação das isoflavonas.

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Giselle Arruda, Patrícia Schons, Daniele Branta, Eloísa Serrano, Márcio de Barros, Fabiano Jares, Paula Speranza, Isabela Martins, Viviane Toreti, Gilberto Coradi, Camilo Teixeira, Fabíola Lima, Ricardo Melo, Carolina Bedani, Bruna Sampaio, Lívia Dias, Giulia Milan, André Ohara, Leonardo Zanovello, Evandro Lima, Priscila Becker, Juliana Macedo, Beatriz Melo, Valzinha, Tatiana Porto, pelo apoio e em especial à Fernanda Gonçalves, Haroldo Kawaguti, Ruann Janser, José Madeira, Lívia Rosas e Marcela Bagagli por além do companheirismo terem contribuído também com seus conhecimentos enriquecendo o meu trabalho.

Ao meu marido Ricardo Crepani Angelotti e ao nosso bebê que me motivam a viver a vida e me transmitem perseverança, sensatez, amor, tranquilidade, sempre na busca de ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Ivalney e Rosária, por me apoiarem sempre e expressarem o orgulho que sentem por minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Thiago e Rodrigo, pelo apoio e amor.

À família Angelotti, especialmente Osvaldo e Édina, pelo carinho.

Aos amigos de longa data Magna, Cinthia Vitorino, Patrícia, Marlene, Bel, Anne, Gu, Débora, Bruno, Henrique, Flávia, Bernardo, Cris, Thaís, Gabi por sempre torcerem pelo meu sucesso pessoal e profissional.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento do meu trabalho

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudo concedida.

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	1
GENERAL SUMMARY	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO I – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE.....	7
RESUMO.....	7
SUMMARY	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Características das β -glicosidases.....	11
2.2 Produção de β -glicosidase	16
2.3 Fermentação semissólida	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Micro-organismo produtor de β -glicosidase	22
3.1.1 Identificação do micro-organismo	22
3.1.2 Manutenção da cultura	22
3.1.3 Pré-inóculo e fermentação da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> LBA 02 em meio semissólido de farelo de trigo para a produção de β -glicosidase.....	23
3.1.4 Extração da β -glicosidase.....	23

3.1.5	Determinação da atividade de β -glicosidase	24
3.1.6	Determinação qualitativa de algumas enzimas produzidas pela linhagem de <i>A. niger</i> LBA 02.....	24
3.2	Estudo da produção de β -glicosidase pela linhagem de <i>A. niger</i> LBA 02 por planejamento experimental.....	26
3.2.1	Estudo dos efeitos da temperatura e da quantidade de inóculo, água destilada, casca de maracujá, extrato de levedura e sais no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β -glicosidase, por planejamento fatorial fracionado $2^{(8-4)}$	26
3.2.1.1	Determinação do tempo de fermentação da linhagem de <i>A. niger</i> LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá, sais e extrato de levedura para a produção de β -glicosidase....	28
3.2.2	Estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e da água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2	28
3.2.3	Estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2	29
3.2.3.1	Determinação do tempo de fermentação da linhagem de <i>A. niger</i> LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a produção de β -glicosidase.....	29

3.2.4	Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² do meio semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá ou bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1	Identificação do micro-organismo	32
4.2	Determinação qualitativa de algumas enzimas produzidas pela linhagem de <i>A. niger</i> LBA 02.....	33
4.3	Estudo dos efeitos da temperatura e da quantidade de inóculo, água, casca de maracujá, extrato de levedura e sais no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase, por planejamento fatorial fracionado 2 ⁽⁸⁻⁴⁾	35
4.3.1	Determinação do tempo de fermentação da linhagem <i>A.niger</i> LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá, sais e extrato de levedura para a produção de β-glicosidase.....	35
4.4	Estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e da água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ²	40
4.4.1	Determinação do tempo de fermentação da linhagem <i>A.niger</i> LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a maior produção de β-glicosidase	42
4.5	Estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e de água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de <i>A. niger</i>	

LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ²	43
4.6 Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² do meio semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá ou bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a fermentação de <i>A. niger</i> LBA 02 e produção de β -glicosidase.....	48
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO II ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE <i>A. niger</i> LBA 02 EM DIFERENTES SUPORTES.....	61
RESUMO	61
SUMMARY	63
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	66
3 MATERIAL E MÉTODOS	78
3.1 Produção e obtenção do extrato enzimático	78
3.2 Determinação da atividade de β -glicosidase.....	79
3.2.1 Determinação da atividade de β -glicosidase utilizando-se o substrato <i>p</i> -nitrofenil- β -glicosídeo (<i>p</i> -NPG).....	79
3.2.2 Determinação da atividade de β -glicosidase utilizando-se o substrato celobiose	79
3.3 Concentração da enzima por precipitação com sulfato de amônio	80

3.4 Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02.....	80
3.4.1 Imobilização de β -glicosidase em álcool polivinílico (PVA) – lentes de Lentikats®	80
3.4.2 Imobilização de β -glicosidase em álcool polivinílico (PVA) – esferas de Lentikats®	81
3.4.3 Imobilização de β -glicosidase em alginato de cálcio	82
3.4.4 Imobilização de β -glicosidase em gelatina	82
3.4.5 Imobilização de β -glicosidase em Amberlite IRC50 e IRC 86.....	83
3.4.6 Imobilização de β -glicosidase em Eupergit C e Eupergit 250L.....	84
3.4.7 Imobilização de β -glicosidase em sol-gel	85
3.5 Avaliação do efeito da velocidade de agitação na atividade das amostras de β -glicosidase imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats®	86
3.6 Teste de reutilização da β -glicosidase imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats® e sol-gel utilizando-se substrato p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG)	86
3.7 Teste de reutilização da β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel utilizando-se substrato celbiose	87
3.8 Determinação da eficiência de encapsulação da enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel	88

3.9	Caracterização da enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	88
3.9.1	Estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel	88
3.9.2	Efeito da concentração de substrato na atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	89
3.9.3	Determinação da temperatura e do pH de estabilidade da β -glicosidase livre e imobilizada lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	89
3.9.4	Efeito da concentração de glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	90
3.9.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats [®]	91
3.10	Cinética da hidrólise de celobiose em mini reator utilizando-se β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel	91
3.11	Hidrólise de celobiose por processo contínuo utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	92
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1	Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02.....	93
4.2	Avaliação do efeito da velocidade de agitação na atividade das amostras de β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats [®]	95

4.3	Teste de reutilização da enzima β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel utilizando substrato p-nitrofenil- β -glicosídeo (p-NPG)	96
4.4	Teste de reutilização da enzima β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel utilizando substrato celobiose.....	98
4.5	Eficiência de encapsulação da β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats [®]	100
4.6	Caracterização da enzima β -glicosidase livre de <i>A. niger</i> LBA 02 e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel	101
4.6.1	Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes - PVA Lentikats [®] e sol-gel	101
4.6.2	Efeito da concentração de substrato na atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	104
4.6.3	Efeito da concentração de glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	107
4.6.4	Determinação do pH e da temperatura de estabilidade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel.....	109
4.6.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats [®]	113
4.7	Cinética da hidrólise de celobiose em mini reator utilizando enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] e sol-gel	115

4.8	Hidrólise de celobiose por processo contínuo utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	116
5	CONCLUSÃO	118
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	CAPÍTULO III - APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE <i>A. niger</i> LBA 02	129
	RESUMO	129
	SUMMARY	130
1	INTRODUÇÃO.....	131
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	132
2.1	Aplicações da β -glicosidase	132
2.2	Hidrólise de isoflavona de soja por β -glicosidase.....	135
2.3	Efeitos benéficos das isoflavonas de soja.....	139
3	MATERIAL E MÉTODOS	142
3.1	Extração das isoflavonas glicosiladas de soja	142
3.2	Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats [®] e sol-gel.....	142
3.3	Análise das isoflavonas de soja por cromatografia em camada delgada.....	143
3.4	Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	143

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
4.1	Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre e imobilizada.....	145
5	CONCLUSÃO	158
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I - 1: Exemplos de substratos hidrolisados pela β -glicosidase	14
Figura I - 2: Hidrólise da celobiose em glicose	15
Figura I - 3: Fungo <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio Ágar Czapeck Extrato de Levedura.	32
Figura I - 4: Detecção qualitativa das enzimas CM-celulase, protease, amilase, poligalacturonase e pectinase no extrato enzimático produzido pela linhagem <i>A. niger</i> LBA 02 pelo método “cup plate”.	34
Figura I - 5: Cinética da produção de β -glicosidase por <i>Aspergillus niger</i> LBA 02 em meio semissólido contendo farelo de trigo, casca de maracujá, água destilada, extrato de levedura, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 e MgSO_4 nas condições do ponto central do planejamento experimental fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾	36
Figura I - 6: Cinética da produção de β -glicosidase por <i>A. niger</i> LBA 02 em meio semissólido composto de 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de bagaço de cana-de-açúcar e 7,5 mL de água destilada, a 30°C.	43
Figura I - 7: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β -glicosidase (U/g) em função da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (g) e quantidade de água destilada (mL) no meio semissólido de farelo de trigo	47
Figura II - 1: Estrutura da Eupergit e imobilização covalente com a enzima *.	72
Figura II - 2: Ilustração do sistema de imobilização pelo método de Lentikats [®]	74
Figura II - 3: Técnica de imobilização de enzimas por sol-gel *	76

Figura II - 4: Porcentagem de atividade relativa das amostras de β -glicosidase imobilizadas em diferentes suportes	93
Figura II - 5: Efeito da velocidade de agitação na atividade de β -glicosidase imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats®	95
Figura II - 6: Estudo da reutilização de β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats® e gelatina, utilizando-se substrato ρ -NPG, em processo de batelada.	97
Figura II - 7: Estudo da reutilização de β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats®, utilizando-se substrato celobiose, em processo de batelada.	99
Figura II - 8: Efeito da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada em sol - gel e lentes PVA - Lentikats®	102
Figura II - 9: Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada pelo método de sol-gel e lentes - PVA Lentikats®	103
Figura II - 10: Efeito inibitório da glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats® e sol-gel, utilizando-se substrato ρ -NPG	107
Figura II - 11: Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada em sol-gel	109
Figura II - 12: Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats®	110

Figura II - 13: pH de estabilidade da β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats [®] e em sol-gel, a 55°C (SG: sol-gel; LK: Lentikats; EL: Enzima livre)	113
Figura II - 14: β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®] com aumento 700x (a) e aumento 3000x (b); β -glicosidase imobilizada com sol-gel com aumento 100x (c) e aumento 500x (d).	114
Figura II - 15: Hidrólise de celobiose pela β -glicosidase de <i>A. niger</i> LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats [®] e sol-gel	115
Figura II - 16: Taxa de conversão relativa de celobiose em glicose por β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	116
Figura III - 1: Hidrólise da naringina pela ação sucessiva de α -ramnosidase e β -glicosidase	133
Figura III - 2: Hidrólise da linamarina (mandioca brava) por β -glicosidase	134
Figura III - 3: Hidrólise da amigdalina e prunasina (maracujá) pela β -glicosidase	134
Figura III - 4: Transformação enzimática de isoflavonas glicosiladas em agliconas	136
Figura III - 5: Mecanismo geral da ação de β -glicosidases	137
Figura III - 6: Perfil cromatográfico em camada delgada do extrato de isoflavonas de soja sem aplicação de enzima (0) e após aplicação de enzima β -glicosidase nos tempos de 0,5; 2; 4 e 24 h.	145

Figura III - 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase livre durante os tempos 0,5; 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente. 146

Figura III - 8: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] nos tempos 0,5, 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente. 147

Figura III - 9: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase imobilizada em sol-gel nos tempos 0,5, 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente. 148

Figura III - 10: Cromatogramas obtidos por CLAE – DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja na amostra controle, tempo zero de reação com destaque para o pico de absorção da daidzina (A) e padrão daidzina (Sigma) (B). Cromatograma obtido por CLAE – DAD a 254 nm da mistura de padrões HPLC (Sigma) com destaque para o pico de absorção da genistina amostra (C) e padrão genistina (Sigma) (D). Espectro de absorção ampliado da daidzina presente na amostra (a), daidzina padrão (Sigma) (b), genistina presente na amostra (c) e genistina padrão (Sigma). 150

Figura III - 11: Cromatogramas obtidos por CLAE – DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja na amostra controle, tempo zero de reação com destaque para o pico de absorção da daidzeína (A) padrão daidzeína (B) genisteína presente na amostra(C) e genisteína padrão (Sigma) (D). 152

Figura III - 12: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase livre após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C. 153

Figura III - 13: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C. 154

Figura III - 14: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C. 155

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - 1: Enzimas produzidas por linhagens de <i>Aspergillus niger</i>	21
Tabela I - 2: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾	27
Tabela I - 3: Planejamento fatorial fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾ codificado para estudo dos efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃ , MgSO ₄ .7H ₂ O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase.....	37
Tabela I - 4: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾ codificado no estudo dos efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃ , MgSO ₄ .7H ₂ O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase.....	38
Tabela I - 5: Efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃ , MgSO ₄ .7H ₂ O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para fermentação da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase, do planejamento fatorial fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾	39
Tabela I - 6: Planejamento composto central rotacional 2 ² codificado para o estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de <i>A.niger</i> LBA 02 e produção de β-glicosidase	40

Tabela I - 7: Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase..... 41

Tabela I - 8: Coeficiente de regressão e desvio padrão no estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase..... 41

Tabela I - 9: Planejamento composto central rotacional 2^2 codificado para estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase. 44

Tabela I - 10: Valores codificados e reais utilizados no composto central rotacional 2^2 para o estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase..... 44

Tabela I - 11: Coeficiente de regressão e desvio padrão no estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase..... 45

Tabela I - 12: ANOVA para a regressão do modelo para a produção de β -glicosidase (U/g)..... 46

Tabela I - 13: Validação do planejamento experimental DCCR 2^2 para o estudo dos efeitos da adição de casca de maracujá e água destilada em meio de cultura

semissólido composto por farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase 49

Tabela I - 14: Validação do planejamento experimental DCCR 2² para o estudo dos efeitos da adição de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada em meio de cultura semissólido composto por farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase 50

Tabela II - 1: Parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) da enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel determinados com o substrato sintético p -NPG 104

Tabela II - 2: Parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) da enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel determinados com o substrato celobiose... 105

Tabela II - 3: Valores de F-test resultantes da análise dos dados obtidos pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver 106

Tabela II - 4- Efeito da imobilização na inibição da β -glicosidase pela glicose, expresso por valor IC'_{50} 108

Tabela II - 5: Tempo de meia-vida da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel 112

RESUMO GERAL

O presente trabalho visou o estudo da produção da β -glicosidase pela linhagem de *Aspergillus sp.* utilizando-se resíduos agrícolas como o farelo de trigo, casca de maracujá e bagaço de cana-de-açúcar, a imobilização da enzima em diferentes suportes como lentes PVA - Lentikats[®], sol-gel, Eupergit, Amberlite, gelatina e alginato de cálcio, e a aplicação da enzima livre e imobilizada na conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas.

O fungo foi identificado como *Aspergillus niger* LBA 02. O extrato enzimático bruto obtido de *A. niger* LBA 02 apresentou atividade de β -glicosidase, CM - celulase, amilase, poligalacturonase e pectinase. Foi obtida maior atividade de β -glicosidase (44,81 U/g) na fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02 em meio semissólido composto por 25 g de farelo de trigo e 5,7 mL de água destilada, após 240 h de fermentação a 30°C. Os efeitos da adição do extrato de levedura e dos sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, no meio de farelo de trigo, para a produção de β -glicosidase por *A. niger* LBA 02 não foram significativos nos níveis estudados. Os resíduos casca de maracujá e bagaço de cana-de-açúcar adicionados no meio de farelo de trigo não atuaram como indutores da produção de β -glicosidase, nos níveis estudados.

Dentre os 7 métodos de imobilização testados, as técnicas de sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] apresentaram melhores resultados para a imobilização da enzima β -glicosidase. A enzima livre apresentou atividade ótima a 65°C e pH 4,5, enquanto a enzima imobilizada em sol-gel mostrou atividade ótima na faixa de 60 – 65°C. A temperatura de 50°C foi fixada como temperatura ótima de trabalho para a enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®], pois acima da temperatura de 60°C ocorreu a fusão das lentes. A imobilização da β -glicosidase não alterou o pH ótimo de atividade da enzima, permanecendo em 4,5. A imobilização resultou em um pequeno aumento da estabilidade térmica da β -glicosidase. A β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] apresentou-se mais estável do que a enzima livre, após 3 h de tratamento na

faixa de 45 a 55°C. O tempo de meia vida da β -glicosidase imobilizada em sol-gel a 70°C foi 0,88 h. A β -glicosidase imobilizada em sol-gel apresentou cerca de 10% de atividade residual após 3 h a 70°C, enquanto que a enzima livre foi inativada após 1 hora a 70°C.

A β -glicosidase imobilizada em sol-gel apresentou valores de K_M na faixa de 1,0 a 1,25 mM de celobiose, a 60°C, estimados pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver, enquanto que a enzima livre apresentou valores de 0,92 a 1,69 mM de celobiose, sugerindo que não houve alteração da afinidade da enzima pelo substrato celobiose com a imobilização.

A imobilização da enzima em lentes PVA - Lentikats[®] resultou em um aumento dos valores de K_M estimados em 3,61; 2,7 e 3,03 mM de celobiose, a 50°C, respectivamente, pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver indicando que a imobilização resultou em diminuição da afinidade da enzima imobilizada pelo substrato.

A taxa de conversão relativa da solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,5 M pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] em processo contínuo foi de 100% após 5 h, entretanto a porcentagem de conversão diminuiu para 40% após 148 h.

A β -glicosidase livre e imobilizada produzida pelo micro-organismo *A. niger* LBA 02 foi capaz de hidrolisar as isoflavonas glicosiladas de soja em suas formas agliconas.

O teor da isoflavonas agliconas aumentou no extrato de isoflavonas de soja tratadas com β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel, sendo que a daidzeína aumentou aproximadamente 2,6; 10,8 e 12,2 vezes e o teor de genisteína aumentou 11,7; 11,4 e 11,4 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel, respectivamente, ao final de 24 h.

GENERAL SUMMARY

This work aimed to study the production of β -glucosidase by *Aspergillus sp.* strain using agricultural residues such as wheat bran, passion fruit peel and sugarcane bagasse, the immobilization of the enzyme in different support such as lens - shaped PVA - Lentikats[®], sol-gel, Eupergit, Amberlite, gelatin and calcium alginate and the application of free and immobilized enzyme in the conversion of isoflavone glucosides in soy isoflavone aglycones.

The fungus was identified as *Aspergillus niger* LBA 02. The crude enzyme extract obtained from *A. niger* LBA 02 showed activity of β -glucosidase, CM-cellulase, amylase, polygalacturonase and pectinase. It was obtained higher β -glucosidase activity (44.81 U / g) in the fermentation of strain *A. niger* LBA 02 in semisolid media composed of 25 g of wheat bran and 5.7 mL of distilled water, after 240 h of fermentation at 30 °C. The effects of the addition of yeast extract and salts KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in wheat bran medium for production of β -glucosidase by *A. niger* LBA 02 were not significant in the levels studied. The passion fruit peel waste and sugarcane bagasse added in the culture media of wheat bran did not act as inducers of the production of β -glucosidase levels studied.

Among the methods of immobilization tested, the sol-gel technique and lens - shaped PVA - Lentikats[®] showed better results for β -glucosidase immobilization. The free enzyme showed optimum activity at 65 °C and pH 4.5, while the enzyme immobilized in sol-gel showed optimum activity in the range of 60 - 65 °C. A temperature of 50 °C was set as the working optimum temperature for the enzyme immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] because above 60 °C occurred melting of the lenses. Immobilization of β -glucosidase did not alter the optimum pH of the enzyme activity, remaining at pH 4.5. Immobilization resulted in a small increase in the thermal stability of β -glucosidase. The β -glucosidase immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®]

showed to be more stable than the free enzyme after 3 h of treatment in the range of 45 to 55 °C. The half-life of the β -glucosidase immobilized in sol-gel at 70 °C was 0.88 h. The β -glucosidase immobilized in sol-gel showed about 10% residual activity after 3 h at 70 °C while free enzyme was inactivated after 1 h at 70 °C.

The β -glucosidase immobilized in sol-gel showed K_M in the range of 1.0 to 1.25 mM of cellobiose at 60 °C, estimated by the method of Lineweaver - Burk, Hanes - Woolf and Solver while free enzyme showed K_M values in the range of 0.92 to 1.69 mM of cellobiose, suggesting no change in the affinity of the enzyme for the substrate cellobiose after immobilization.

The immobilized enzyme in lens - shaped PVA - Lentikats[®] resulted in an increase in the K_M values estimated 3.61, 2.7 and 3.03 mM of cellobiose at 50 °C, respectively, by methods Lineweaver - Burk, Hanes - Woolf and Solver indicating that immobilization resulted in decreasing affinity of the immobilized enzyme to the substrate.

Relative conversion rate of 1.5 mM cellobiose solution in acetate buffer 0.5 M pH 5.0 at 50 °C, using β -glucosidase immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] in continuous process was 100% after 5 h, but the conversion decreased to 40% after 148 h.

The β -glucosidase produced by the micro-organism *A. niger* LBA 02, free and immobilized was able to hydrolyze isoflavone glycosides from soy in their aglycone forms.

The content of isoflavone aglycones increased in soy isoflavones extract treated with β -glucosidase free and immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] and sol-gel, and the daidzein increased approximately 2.6, 10.8 and 12.2 times, and genistein increased content of 11.7, 11.4 and 11.4 fold when applied to β -glucosidase enzyme free and immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] and sol-gel, respectively, at the end of 24 h.

INTRODUÇÃO GERAL

A β -glicosidase hidrolisa a ligação β -1,4 glicosídica da celobiose e de alquil-glicosídeos. A β -glicosidase pode ser produzida por micro-organismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, ou pode ser extraída de frutas e plantas (Cairns e Esen, 2010).

As β -glicosidases representam um importante grupo de enzimas devido ao seu uso potencial em vários processos biotecnológicos (Karnchanatat et al. 2007). Faz parte do complexo de enzimas celulolíticas com atuação importante na degradação de biomassa, atuando na prevenção do acúmulo de celobiose, desempenhando um papel crucial na hidrólise enzimática da celulose em glicose. Inúmeros esforços tem sido realizados para a hidrólise de resíduos agrícolas celulósicos em glicose e produção eficiente de etanol (Kang, 1999).

A enzima pode ser usada na síntese de β -glicosídeos de interesse como os alquil glicosídeos com potenciais aplicações na indústria de alimentos, de detergentes e produtos farmacêuticos (Coughlan 1985, Makropoulou et al., 1998; Yan e Liao, 1998).

A β -glicosidase têm participação em reações de liberação enzimática de compostos de aroma a partir de precursores glicosídicos presentes em frutas e produtos de fermentação, fator importante na indústria de alimentos e bebidas, a fim de melhorar as características sensoriais dos produtos (Gueguen et al., 1996; Riou, et al., 1998). Também atuam na formação de moléculas bioativas, hidrolisando compostos glicosilados, como as isoflavonas, liberando as suas formas agliconas (Riou, et al., 1998; Park et al., 2001; Chang e Juang, 2007).

Tendo em vista as várias possibilidades de aplicação, este trabalho visou o estudo da produção de β -glicosidase de *Aspergillus sp.* utilizando diferentes resíduos agrícolas (farelo de trigo, casca de maracujá e bagaço de cana-de-açúcar), a imobilização de β -glicosidase em diferentes suportes, sua

caracterização e a aplicação da enzima livre e imobilizada na conversão de celobiose em glicose e na conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas.

CAPÍTULO I – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE

RESUMO

As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas em aril, amino ou alquil - β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, oligo e dissacarídeos. Apresentam diversas funções, como a hidrólise de substratos utilizados para o crescimento de micro-organismos, hidrólise de glicolípídeos e glicosídeos exógenos em animais, reações de lignificação, catabolismo da parede celular de celo-oligossacarídeos, mecanismo de defesa, ativação de fito-hormônios conjugados, liberação de compostos de aroma em plantas, entre outras. A β -glicosidase apresenta papel importante na hidrólise de celobiose em glicose, promovendo aumento da conversão de resíduos lignocelulósicos em carboidratos em combinação com outras enzimas celulolíticas. A enzima tem sido também utilizada na conversão dos fito-hormônios isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas. Neste trabalho verificou-se que os resíduos agroindustriais bagaço de cana-de-açúcar e casca de maracujá, em meio contendo farelo de trigo, não atuaram como indutores na produção de β -glicosidase pela linhagem *A. niger* LBA 02. A adição de extrato de levedura e dos sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio semissólido de farelo de trigo, não tiveram efeitos significativos no aumento da produção de β -glicosidase, nos níveis estudados, por planejamento experimental. Verificou-se que os parâmetros temperatura e quantidade de inóculo não apresentaram efeito significativo na produção de β -glicosidase. Foi obtida maior produção de β -glicosidase (44,81 U/g) na fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02, em meio de cultura composto de 25 g de farelo de trigo e 5,7 mL de água destilada, após 240 h de fermentação a 30°C.

SUMMARY

The β -glucosidases are enzymes that hydrolyze β -glycosidic linkages in aryl, amino or alkyl- β -D-glycosides, cyanogenic glycosides, oligo- and disaccharides. These enzymes have several functions, such as hydrolysis of substrates used for the growth of microorganisms, hydrolysis of exogenous glycolipids and glycosides in animals reactions of lignification, cell wall catabolism of cello-oligosaccharides, defense mechanism, activation of phyto hormones conjugated, release of aroma compounds in plants, among others. The β -glucosidase plays an important role in the hydrolysis of cellobiose to glucose, increasing the conversion of lignocellulosic wastes in carbohydrates in combination with other cellulosic enzymes. The enzyme has also been used in the conversion of phyto-hormones isoflavone glycosides to isoflavone aglycones. In this study it was found that the agroindustrial waste sugarcane bagasse and passion fruit peel in the media of wheat bran, did not act as inducers for the production of β -glucosidase by strain *A. niger* LBA 02. The addition of yeast extract and salts KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in semisolid media of wheat bran, had no significant effects on increasing of the production of β -glucosidase levels studied by experimental design. It was found that there were no significant differences in fermentation of the fungus at 25, 30 and 35 °C and the amount of inoculum in the production of β -glucosidase. It was obtained higher production of β -glucosidase (44.81 U/g) fermenting strain of *A. niger* LBA 02 in culture media composed of 25 g of wheat bran and 5.7 mL of distilled water, after 240 h of fermentation at 30 °C.

1 INTRODUÇÃO

Biomassa é todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem animal, vegetal ou microbiana) que pode ser utilizada na produção de bioenergia. A biomassa pode ser classificada de acordo com a sua origem, como: florestal (madeira, principalmente), agrícola (soja, arroz, cana-de-açúcar, trigo, entre outras), rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como o lixo), animal (lipídeos) e microbiana (massa celular de levedura de fermentação alcoólica, cervejaria, etc). A geração de resíduos agroindustriais produzidos por ano no Brasil, apesar de ser de difícil contabilização devido à reduzida quantidade comercializada, é estimado em bilhões de toneladas. No Brasil, a imensa superfície do território nacional, quase toda localizada em regiões tropicais e chuvosas, oferece excelentes condições para a produção e o uso energético da biomassa em larga escala. Além da produção de álcool, queima em fornos, caldeiras e outros usos não-comerciais, a biomassa apresenta grande potencial no setor de geração de energia elétrica (Aneel, 2011).

Segundo a Companhia Nacional do Abastecimento (Conab, 2011) a produção de cana-de-açúcar ainda é uma cultura em expansão, principalmente nos Estados de São Paulo (79.520 ha), Minas Gerais (99.660 ha), Mato Grosso do Sul (84.700 ha), Goiás (73.120 ha) e Mato Grosso (12.010 ha), onde além do aumento da área cultivada também houve a implantação de novas usinas. O maior percentual de aumento está na região Sudeste, responsável por 33,3% do total da área nova agregada, sendo que o Estado de São Paulo apresentou o maior aumento, acrescentando 203.834 ha a área existente. A safra 2010/11 foi de 623,905 milhões de toneladas, sendo 288,287 milhões de toneladas destinadas a produção de açúcar e 300,628 milhões de toneladas destinadas para a produção de etanol, gerando cerca de 175 milhões de toneladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

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

A celulose é a fonte natural renovável mais abundante do planeta, baseado neste dado a produção de energia através da matriz lignocelulósica é uma rota alternativa que vem sendo estudada e debatida mundialmente. Existem já algumas tecnologias que vêm sendo estudadas, como por exemplo, a rota enzimática. Entretanto, ainda existem alguns entraves financeiros ou tecnológicos a serem ultrapassados. A hidrólise da celulose para a produção do etanol celulósico através da rota enzimática oferece uma alternativa de menor impacto ambiental, mas ainda requer o desenvolvimento de tecnologias que possam minimizar os custos de produção das enzimas. Alguns especialistas asseguram que através da obtenção de enzimas com custos mais acessíveis para a produção de etanol celulósico, será possível alcançar o sucesso do mercado mundial de biocombustíveis nos próximos anos (Tengerdy e Szakacs, 2003).

A β -glicosidase faz parte do complexo de enzimas celulolíticas com atuação importante na degradação de biomassa, atuando na prevenção do acúmulo de celobiose, sendo responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise da celulose (Oh et al., 1999).

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características das β -glicosidases

As enzimas responsáveis pela clivagem e transferência de grupos glicosídicos são conhecidas, respectivamente, como glicosidases e glicosiltransferases. São vitais para o crescimento e desenvolvimento das células e são amplamente distribuídas em mamíferos, plantas e micro-organismos (Ganem, 1996).

As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas em aril, amino ou alquil - β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, e oligo e dissacarídeos, liberando o terminal não redutor. Desempenham diversas funções como hidrólise de biomassa utilizada em meio de cultivo para o crescimento de micro-organismos, hidrólise de glicolipídeos e glicosídeos exógenos em animais, reações de lignificação, catabolismo da parede celular de celo-oligossacarídeos, mecanismos de defesa, ativação de fito-hormônios conjugados e liberação de compostos de aroma em plantas (Cairns e Esen, 2010).

Existem na natureza diversos compostos que possuem glicose(s) unida(s) por ligação β -glicosídica na estrutura (Figura 1 - 1). As β -glicosidases são comumente classificadas de acordo com a natureza do substrato. É atribuído um número diferente à enzima β -glicosidase que hidrolisa a ligação glicosídica, sendo que uma mesma enzima pode hidrolisar vários substratos similares (Cairns e Esen, 2010). Esta nomenclatura é realizada de acordo com a metodologia tradicional definida pela União Internacional de Bioquímica, ou seja, é atribuído um número E.C (Enzyme Commission number) para cada enzima de acordo com a reação que ela catalisa. Dentre estas enzimas estão as glicosil ceramidases ou glicocerebrosidases (E.C 3.2.1.45), esteril- β -

glicosidase (E.C 3.2.1.104), amigdalina hidrolase (E.C 3.2.1.117) e coniferina β -glicosidase (E.C 3.2.1.116).

Henrissat (1991) desenvolveu outro sistema de classificação para glicosil hidrolases baseado na sequência de aminoácidos e semelhança estrutural. As glicosidades que possuíam a maior parte da sequência de aminoácidos semelhantes foram agrupadas na mesma família. O autor mapeou a sequência de aminoácidos de 301 glicosil hidrolases, sendo 291 glicosil hidrolases pertencentes a 39 diferentes números de classificação E.C. e nesse modelo proposto pelo autor foram classificadas em 35 famílias. Somente 5% das glicosil hidrolases não puderam ser agrupadas em nenhuma família. O autor ainda verificou que 18 famílias eram mono específicas (continham somente um número de E.C.) e 17 famílias eram poli específicas (continham no mínimo 2 números de E.C.).

Até o momento 115 famílias de glicosil hidrolases já foram relatadas na literatura. Os dados são frequentemente atualizados (www.cazy.org). As β -glicosidases mais estudadas são pertencentes às famílias GH1, GH3, GH5, GH9 e GH30 (Cantarel et al., 2009).

A β -glicosidase ácida humana é conhecida como glucocerebrosidase e é responsável pela degradação da glucosilceramida no lisossomo. A deficiência dessa enzima leva ao desenvolvimento da doença de Gaucher que consiste no acúmulo de glucoceramidas nos lisossomos dos leucócitos levando ao ingurgitamento e acúmulo nos tecidos (Butters, 2007).

Nas plantas, a produção de β -glicosidase está relacionada a várias funções biológicas incluindo mecanismos de defesa, simbiose, catabolismo e lignificação da parede celular, sinalização e metabolismo secundário (Lipka et al., 2005).

As β -glicosidases apresentam atividade ótima na faixa de pH 5,0-6,0 e a 50-70°C (Nagamoto et al., 2005; Tu et al., 2006; Wolosowska e Synowiecki, 2004; Barrera-Islas et al., 2007; Kaur et al., 2007; Karnchanatat et al., 2007).

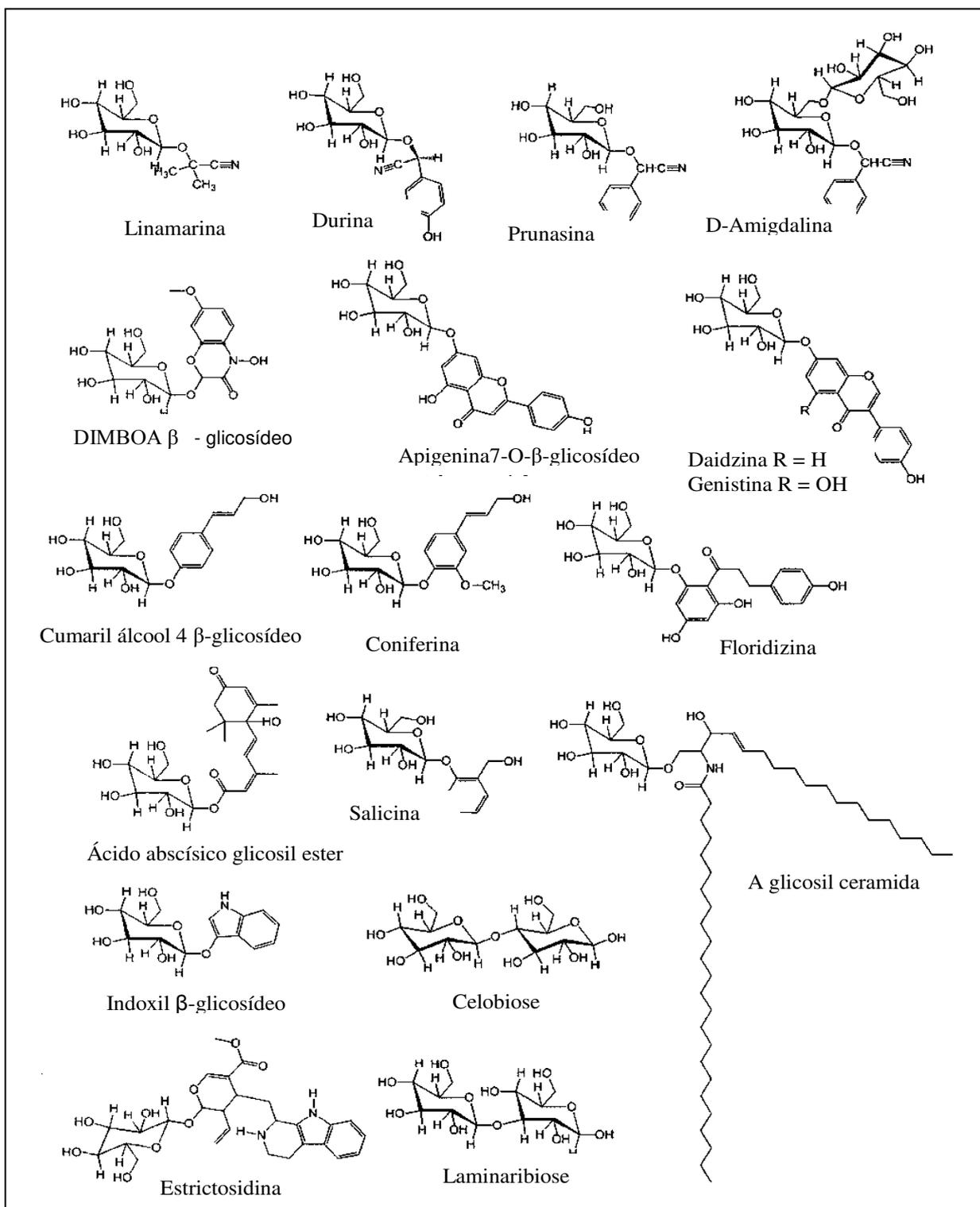


Figura I - 1: Exemplos de substratos hidrolisados pela β -glicosidase

* Adaptado de Cairns e Esen, 2010.

A β -glicosidase (β -D-glicosídeo glucohidrolase, EC3.2.1.21) que hidrolisa o dissacarídeo celbiose em glicose faz parte do complexo de enzimas que hidrolisam materiais celulósicos (Figura 1 – 2). Estas enzimas incluem: a) β -1,4-endo-glucanase (β -1,4-D-glucana 4-glucanohidrolase; EC 3.2.1.4), que clivam ligações β -1,4-glicosídicas internas; celbiohidrolase (β -1,4-D-glucana celbiohidrolase, EC 3.2.1.91), uma enzima que hidrolisa a celulose a partir das extremidades redutoras e não-redutoras liberando celbiose (Kaur et al., 2007; Yun et al., 2001; Iwashita et al., 1998).

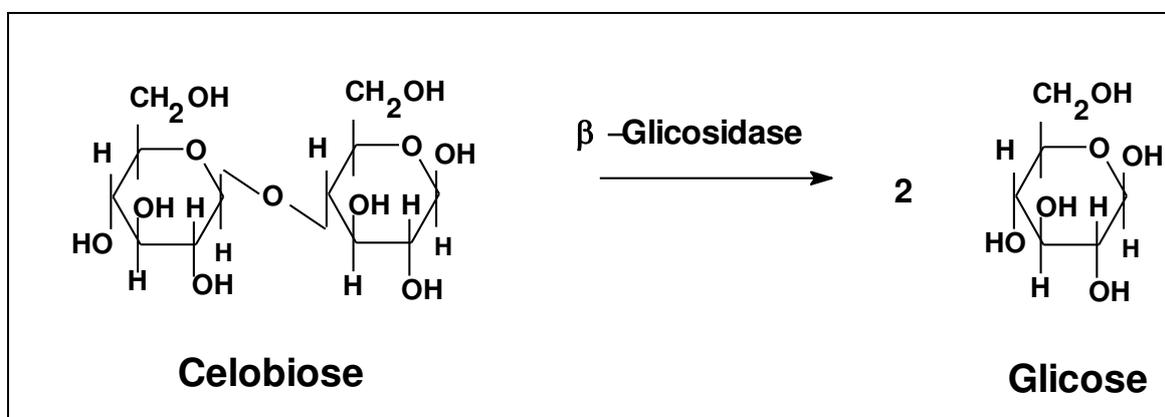


Figura 1 - 2: Hidrólise da celbiose em glicose

A enzima β -glicosidase tem participação na regulação da velocidade global das reações de hidrólise da celulose porque as enzimas endo-glucanases e exo-glucanases são freqüentemente inibidas pela celbiose. Assim, a β -glicosidase não só produz glicose a partir de celbiose, mas também reduz a inibição pela celbiose, levando as enzimas endo-glucanase e exo-glucanase a atuarem mais eficientemente (Oh et al., 1999).

A inibição pelo produto é particularmente problemática quando altas concentrações de substrato são usadas com o objetivo de produzir xarope com alta concentração de glicose para fermentação. Conseqüentemente, preparações de celulasas são tipicamente suplementadas com quantidade

adicional de β -glicosidases (Coughlan, 1991; Saha e Bothast, 1996; Kang, 1999; Ortega, 2001; Lynd et al., 2002).

2.2 Produção de β -glicosidase

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

A produção de uma enzima β -glicosidase com características como insensibilidade a inibição pelo produto e alta estabilidade térmica pode aumentar a conversão de celobiose em glicose e tornar o processo de sacarificação de materiais lignocelulósicos mais eficiente (Zanoelo et al., 2004).

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos em glicose envolve a ação sinérgica de no mínimo 3 diferentes enzimas: endo-glucanase ou endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-glucanase ou exo-celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glicosidase ou celobiase (EC 3.2.1.21). Como as duas primeiras são inibidas pela celobiose, a β -glicosidase tem uma função muito importante no processo, pois ela hidrolisa a celobiose e outras celodextrinas em glicose, reduzindo o efeito de inibição por celobiose em celulasas (Jecu, 2000; Palma-Fernandez et al., 2002).

Trichoderma reesei e outras espécies apesar de serem os mais conhecidos como melhores fontes de celulasas, produzem uma quantidade de β -glicosidase relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação da biomassa (Kim et al., 1997). Porém espécies de *Aspergillus* têm demonstrado serem boas produtoras de β -glicosidase (Desrochers et al., 1981).

Leite et al., (2008) estudaram a produção e compararam as características de β -glicosidase produzida pelos micro-organismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* em diferentes resíduos agroindustriais. Os micro-organismos foram cultivados durante 96 h em diferentes substratos: farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja, sabugo de milho e palha de milho para produção da enzima β -glicosidase. O cultivo em fermentação em estado sólido foi realizada a 50°C para o fungo *T. aurantiacus* e a 28°C para a levedura *A. pullulans* e umidade de 60% e 75%, respectivamente. Após 96 h a enzima foi extraída, centrifugada, e o sobrenadante foi utilizado para medir a atividade das enzimas. Os autores constataram que o farelo de trigo foi o substrato mais eficiente para a produção de β -glicosidase para ambos os micro-organismos. Este resultado foi atribuído a complexidade do substrato rico em proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gorduras (6%) e vitaminas do complexo B, favorecendo o crescimento e produção da enzima pelos micro-organismos. O fungo *T. aurantiacus* apresentou maior produção de β -glicosidase (7,0 U/mL) no período entre 48 – 72 h e a levedura *A. pullulans* apresentou maior produção de β -glicosidase (1,3 U/mL) após 120 h.

Farinas et al. (2008) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para produção de celulasas em meio de fermentação semissólida contendo os resíduos agrícolas bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e farelo de soja. O micro-organismo conservado sob congelamento foi reativado em meio gelose inclinado com meio básico. A quantidade de 1 mL da suspensão de conídios ativados foram utilizados para produção do inóculo de fermentação em meio contendo sabugo de milho, que foram incubados a 30°C durante 5

dias. O meio de fermentação semissólida foi composto de 10 g de um dos resíduos agrícolas moídos e meio Czapek Dox modificado. Os frascos Erlenmeyers foram incubados a 32°C durante 72 h e a extração foi realizada adicionando-se tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,5. Os resíduos agroindustriais que mostraram ser melhores para a produção de β -glicosidase foi o farelo de soja (5,25 UI/g) e o farelo de trigo (3,0 UI/g). Os autores concluíram que a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas é muito promissor, porém devem ser estudados a inclusão de pré-tratamentos para diminuir a recalcitrância de alguns resíduos agrícolas e suplementação do meio de cultivo com intuito de serem obtidas maiores valores de atividade.

Dhake e Patil (2005) estudaram a produção de β -glicosidase intracelular por *Penicillium purpurogenum*. Os autores estudaram o tempo de incubação, composição do meio de cultura, efeitos de diferentes concentrações de sacarose e NaCl e efeito do pH e temperatura na produção de β -glicosidase. A produção máxima de β -glicosidase foi obtida após 96 h de incubação à 30°C. Foram obtidas melhores atividades de β -glicosidase em meio de cultivo Czapek- Dox contendo NaCl (0,6%), sacarose (1%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05%); KH_2PO_4 (0,15%), $NaNO_3$ (2,5%), ajustado a pH 5,5. A suplementação com aminoácidos como serina, prolina, norvalina, triptofano, cistina, leucina, alanina e glutamina não estimularam a produção da enzima. A adição de detergente como SDS, Tween 20 e Tween 80 inibiram completamente o crescimento do *P. purpurogenum* e a produção da enzima. Os autores também observaram que a adição de glicose no meio de cultivo causou a inibição da produção de β -glicosidase.

2.3 Fermentação semissólida

O uso da fermentação semissólida tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o

habitat natural destes micro-organismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela fermentação semissólida são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem maior estabilidade a variações de temperatura e pH (Holker et al., 2004).

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

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

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

Bactérias, leveduras e fungos são capazes de crescer em estado semissólido. Porém os fungos filamentosos se adaptam melhor a estas condições, pois são capazes de crescer em baixa atividade de água e altos

teores de sólidos. Além disso, seu crescimento por meio de hifas auxilia na colonização do meio (Durand, 2003).

Os fungos possuem diversas formas e tamanho. Estima-se que existam mais de 1,5 milhão de espécies de fungos, embora somente 72 mil tenham sido descritas na literatura. Estão amplamente distribuídos em todos ambientes, com maior ocorrência naqueles onde há abundância de matéria orgânica (Oki e Fernandes, 2008).

Segundo Rosa et al. (2002) o gênero *Aspergillus* é o mais comum entre os fungos filamentosos, sendo bem caracterizado. Estão presentes no solo, ar e água, e são encontrados tanto em organismos vegetais quanto em animais, sendo associados a deterioração de materiais vegetais e de alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical.

As colônias geralmente crescem rápido e de forma exuberante, inicialmente possuem coloração branca, amarela, passando para marrom ou para o negro. São compostas por micélio aéreo, com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídeos. A classificação das espécies é realizada com base nas características morfológicas das colônias e dentre elas a estrutura mais importante observada é a haste. Na haste nascem as células conideogênicas (filíades e métulas) que são responsáveis por produzir conídeos de diferentes pigmentações e ornamentações, e estas são divididas em uniseriadas, quando possui uma cabeça aspergilar formada por uma vesícula parcial ou totalmente coberta por filíades e biseriadas quando antes das filíades existem as métulas (Santos, 2007).

Segundo Raper e Fennel (1965), a espécie *Aspergillus niger* é um membro do gênero *Aspergillus* que é definida como fungo saprofítico assexual, embora possuam todas as formas de reprodução sexuada, podendo ser encontrado pelo mundo inteiro devido a sua habilidade de crescer em vários substratos, como por exemplo, produtos de padaria e confeitaria, frutas, vegetais, grãos

estocados, algodão cru, folhas mortas, adubos e vegetação em deterioração. Produzem esporos e estes são freqüentemente encontrados em materiais orgânicos e no solo (Lima, 2003).

Na literatura estão descritos muitos trabalhos sobre a produção e caracterização de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* (Tabela 1 - 1).

Tabela 1 - 1: Enzimas produzidas por linhagens de *Aspergillus niger*

Classe da enzima	Aplicação	Referência
α -amilase	Hidrólise de amido, melhoramento da qualidade de produtos de panificação, remoção de manchas em tecidos e produção de bebidas	Toledo et al., 2007 Mitidieri et al., 2006
Celulase	Produção de papel, amaciamento de tecido	Bansal et al. 2012
Glicoamilase	Produção de xarope de glicose	Nahid et al., 2012
β -glicosidase	Hidrólise de celobiose	Yan e Liao, 1998
Fitase	Melhoramento nutricional de ração animal	Bhavsar et al., 2012
Invertase	Produção de açúcar invertido	Gonzalez et al., 2004
Lactase	Obtenção de produtos lácteos com baixo teor lactose	Manzanares et al., 1998
Lipase	Emulsificantes, remoção de manchas, tratamento de efluentes, esterificação de óleos	Pera et al., 2006
Pectinase	Clarificação de sucos e degomagem de fibras	Debing et al., 2006
Poligalacturonase	Indústria de sucos	Bai et al., 2004 Kant et al., 2012
Protease	Tratamento de couro, produção de queijo, remoção de manchas em tecidos	Zhou et al. 2011 Paranthaman et al., 2009

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo produtor de β -glicosidase

3.1.1 Identificação do micro-organismo

A identificação do fungo foi realizada no Laboratório de Micologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas, São Paulo. O fungo foi incubado em meio de Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) a 25°C, 37°C e 42°C por 7 dias. A identificação foi realizada de acordo com a chave de classificação de Klich e Pitt (1988).

3.1.2 Manutenção da cultura

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

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

A cultura da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 cultivada em meio inclinado conforme descrito no item 3.1.2, foi espalhada em placas de petri contendo Ágar Batata Dextrose com auxílio de um cotonete de algodão esterilizado, e incubado durante 3 dias a 30°C. Após o crescimento satisfatório do fungo nas placas de petri, foram obtidos discos de 10 mm de diâmetro do meio recobertos com a cultura do micro-organismo que foram utilizados como inóculo.

Para a fermentação, 15 discos de 10 mm de diâmetro recobertos com cultura de *A. niger* LBA 02 foram transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de meio de cultivo composto por 25 g de farelo de trigo, 25 g de casca de maracujá e 20 mL de água destilada, previamente esterilizado durante 20 minutos a 121°C. Os frascos foram incubados a 30°C durante 5 dias. O meio fermentado foi utilizado para a produção da β -glicosidase extracelular.

3.1.4 Extração da β -glicosidase

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

3.1.5 Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura et al. (1995) com modificações. Alíquotas de 300 μ L de solução 5mM de p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG) em tampão acetato 0,05M pH 5,0 foram pré-incubadas a 50°C por 5 minutos. Após a adição de 300 μ L de solução enzimática, a mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de solução 0,5 M de carbonato de sódio. A hidrólise de p -NPG foi estimada pela medida da absorbância a 410 nm (Espectrofotômetro Beckman Coulter DU-640). A quantidade de p -nitrofenol liberada foi determinada usando curva padrão de p -nitrofenol na faixa de 5 a 300 μ mol, nas condições de ensaio. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p -nitrofenol por minuto nas condições do ensaio por grama de meio de cultivo semissólido.

3.1.6 Determinação qualitativa de algumas enzimas produzidas pela linhagem de *A. niger* LBA 02

Foram realizados ensaios para determinação qualitativa da atividade enzimática de CM - celulase, protease, amilase, poligalacturonase e pectinase em placas de Petri contendo meio sólido e substratos específicos pelo Método "Cup Plate" com modificações (Dingle et al., 1953; Rose e Miller, 1939).

Os meios sólidos para a detecção das enzimas hidrolíticas secretadas pela linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 foram compostos de ágar bacteriológico 1,5- 2,0% (m/v) e substrato específico [1,0% (m/v) de caseína e 1,0% (m/v) de gelatina para proteases, pH 7,0; ou 1,0% (m/v) de pectina cítrica para pectinases, pH 6,0; ou 0,5% (m/v) de ácido poligalacturônico para

poligalacturonase, pH 6,0; ou 1,0% (m/v) de carboximetilcelulose para CM - celulase, pH 7,0] em placas de Petri.

Alíquotas de 100 μ L do extrato enzimático bruto, obtidas do meio de cultura fermentado composto por farelo de trigo, casca de maracujá e água destilada como descrito no item 3.1.3, foram aplicadas nos orifícios de 5 mm de diâmetro nas placas de Petri em meio sólido, contendo o substrato específico. As placas foram incubadas a 30°C (\pm 2°C) por 24 h, com posterior revelação e observação de halo de degradação dos substratos.

A hidrólise de caseína e gelatina por protease foi testada adicionando-se 5 mL de solução de ácido acético 5,0% (v/v) e verificando-se a formação de halo de hidrólise.

A hidrólise de ácido poligalacturônico ou pectina cítrica por pectinases foi revelada pela adição de 5 mL de solução de lugol (0,15% I₂ e 1,5% KI) e descarte do revelador após 15 segundos de contato.

A hidrólise de CM-celulose por CM-celulase foi revelada pela adição de 5 mL de solução de lugol (0,15% I₂ e 1,5% KI) e descarte do revelador após 15 segundos de contato.

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

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

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

O preparo do meio de cultivo foi realizado pesando-se 25 g de farelo de trigo em um béquer e adicionando-se os componentes estudados nos níveis do planejamento experimental (Tabela 1 – 2).

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

Variável	Unidade	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura	°C	25	30	35
Casca de maracujá	g	12,5	25	37,5
Quantidade de água adicionada	mL	10	20	30
Quantidade de inóculo	Nº discos*	10	15	20
KH ₂ PO ₄	%	0	0,1	0,2
NH ₄ NO ₃	%	0	0,1	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	%	0	0,05	0,1
Extrato de levedura	%	0	0,05	0,1

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

O meio de cultura foi homogeneizado com bastão de vidro e amostras de 10 g foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL sendo os frascos esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. Os discos de PDA recobertos com o fungo foram adicionados assepticamente aos frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura e em seguida foram incubados na temperatura estabelecida pelo planejamento por 9 dias. A atividade de β -glicosidase foi determinada usando-se o substrato p-NPG como descrito no item 3.1.5.

3.2.1.1 Determinação do tempo de fermentação da linhagem *A.niger* LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá, sais e extrato de levedura para a produção de β -glicosidase

Foi realizada a cinética da fermentação do micro-organismo nas condições do ponto central do planejamento fatorial fracionado $2^{(8-4)}$ para estimar o tempo de fermentação para obtenção de maior produção de β -glicosidase. O meio de cultura contendo 50 g de farelo de trigo, 50 g de casca de maracujá, 40 mL de água destilada, KH_2PO_4 (0,1%), NH_4NO_3 (0,1%), MgSO_4 (0,05%) e extrato de levedura (0,05%), sendo a concentração desses quatro últimos componentes considerados em relação a massa de sólidos, foi homogeneizado com auxílio do bastão de vidro e amostras de 10 g de meio de cultivo foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C . Foram adicionados assepticamente aos frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura, 15 discos de PDA recobertos com o fungo e em seguida incubados a 30°C durante 10 dias. Amostras de extrato enzimático foram extraídas a cada 24 horas conforme descrito no item 3.1.4 e a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.1.5.

3.2.2 Estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e da água destilada no meio semissólido de farelo de trigo para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase, por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2

Após a seleção das variáveis significativas de acordo com o item 3.2.1, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com combinação entre as variáveis independentes (quantidade de casca de maracujá e água destilada) e seus níveis de concentração conforme Tabela 1.7.

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

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

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², para avaliação dos efeitos das variáveis independentes: quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada (Tabela 1_ 10).

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

3.2.3.1 Determinação do tempo de fermentação da linhagem *A.niger* LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a maior produção de β -glicosidase

Foi realizada uma cinética da fermentação do micro-organismo nas condições do ponto central do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² para estimar o tempo de fermentação para maior produção de β -glicosidase conforme descrito no item 3.2.3. O meio de cultura contendo 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de bagaço de cana-de-açúcar e 7,5 mL de água

destilada, foi homogeneizado com auxílio do bastão de vidro e amostras de 10 g de meio de cultivo foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250mL e foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. Foram adicionados assepticamente aos frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura 10 discos de PDA recobertos com o fungo e em seguida foram incubados a 30°C durante 11 dias. Amostras de extrato enzimático foram extraídas, a cada 24 horas conforme descrito no item 3.1.4 e a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.1.5.

3.2.4 Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá ou bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Após a realização do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio de cultura contendo farelo de trigo, casca de maracujá e água destilada, foi realizada a validação do ensaio onde houve a maior produção de β -glicosidase, através de 5 repetições da fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 em meio de cultura denominado n^o 1 composto por 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de casca de maracujá e 5 mL de água destilada e 5 repetições do meio de cultura denominado n^o 2 composto por 25 g de farelo de trigo e 5 mL de água destilada para comparação.

O mesmo procedimento foi realizado para validação do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio de cultura contendo farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada, através de 5 repetições da fermentação com o meio de cultura identificado como n^o 3 composto por 25 g de farelo de trigo, 1,8 g de bagaço de cana-de-açúcar e 5,7 mL de água destilada e 5 repetições do meio de cultura identificado como n^o 4 composto por 25 g de farelo de trigo e 5,7 mL de água destilada para comparação.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, realizado com auxílio do software Minitab® 16.1.1 de Minitab Inc. (EUA). Os valores foram expressos como média aritmética e considerados estatisticamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação do micro-organismo

O fungo utilizado neste trabalho foi identificado como *Aspergillus niger* pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). A linhagem apresentou crescimento em Ágar Czapeck Extrato de Levedura formando colônias pretas devido aos seus conídios na temperatura mínima de 6–8°C, e máxima de 45-47°C, com o ótimo a 35-37°C. É um fungo xerofílico e pode crescer em pH de até 2,0. Apresentou conídios menores que 5 µm.



Figura I - 3: Fungo *Aspergillus niger* cultivado em meio Ágar Czapeck Extrato de Levedura.

4.2 Determinação qualitativa de algumas enzimas produzidas pela linhagem de *A. niger* LBA 02

As enzimas microbianas são aplicadas em diversos processos biotecnológicos e sua importância tem aumentado nas últimas décadas pela possibilidade de reaproveitamento de subprodutos industriais. Os fungos são conhecidos por serem bons produtores de uma ampla variedade de enzimas (Bhanja et al., 2009).

Várias espécies de *Aspergillus* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. A taxonomia reconhece aproximadamente 150 espécies do gênero *Aspergillus*, porém somente 30 destas são bem definidas e caracterizadas (Rosa et al., 2002).

Após a revelação das placas, foi observado que o extrato enzimático bruto de *Aspergillus niger* LBA 02 apresentou atividade de CM-celulase, amilase, poligalacturonase e pectinase (Figura 1 - 4). Não foi detectada atividade de protease no extrato bruto.

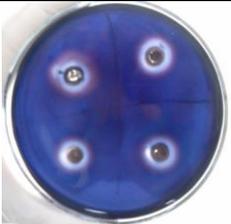
<p>CM-celulase</p>	
<p>Protease</p>	
<p>Amilase</p>	
<p>Poligalacturonase</p>	
<p>Pectinase</p>	

Figura 1 - 4: Detecção qualitativa das enzimas CM-celulase, protease, amilase, poligalacturonase e pectinase no extrato enzimático produzido pela linhagem *A. niger* LBA 02 pelo método “cup plate”.

Linhagens de *A. niger* são utilizadas para a produção de enzimas comerciais como pectinases, glicoamilases, asparaginases, β -glicosidasases, etc.

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

O planejamento fatorial $2^{(8-4)}$ foi utilizado para avaliar os efeitos das variáveis independentes: temperatura, quantidade de inóculo, volume de água adicionado, casca de maracujá triturada, adição dos sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura para fermentação semissólida de *A. niger* LBA 02 em meio de cultivo contendo farelo de trigo e produção da enzima β -glicosidase. O planejamento fatorial $2^{(8-4)}$ está apresentado na Tabela 1 - 3, e os níveis estudados, com os valores decodificados na Tabela 1 - 4. Cada variável independente foi avaliada no nível máximo (+1) e mínimo (-1). Foram realizados 3 ensaios correspondendo ao ponto central (0).

4.3.1 Determinação do tempo de fermentação da linhagem *A.niger* LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá, sais e extrato de levedura para a produção de β -glicosidase

O tempo de fermentação para maior produção de β -glicosidase pela linhagem *A. niger* LBA 02, em meio semissólido composto de farelo de trigo, casca de maracujá, água destilada, sais KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura, foi determinado nas condições do ponto central do planejamento experimental fracionário $2^{(8-4)}$. A Figura 1 - 5 ilustra que foi obtida maior produção de β -glicosidase após 216 h de fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02, a 30°C. Os ensaios subsequentes foram realizados com fermentações conduzidas durante 216 h.

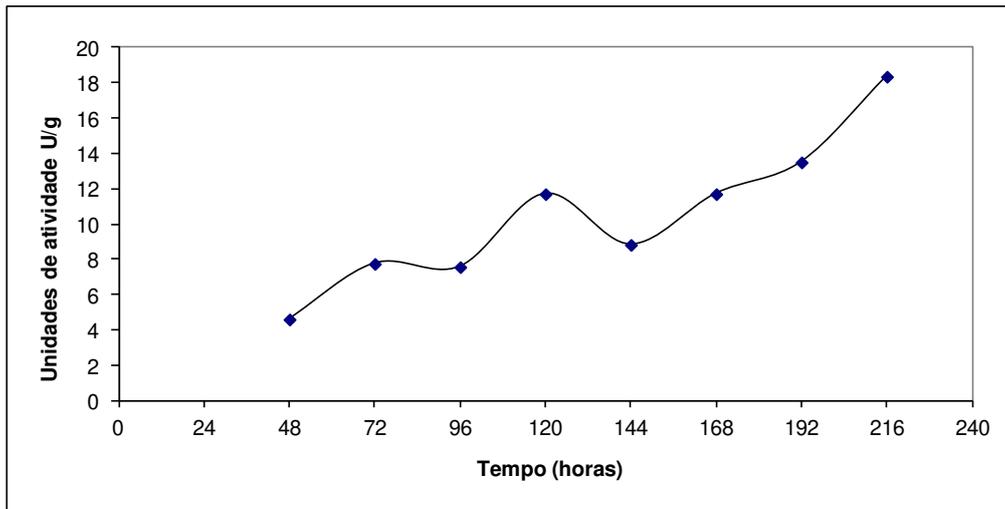


Figura I - 5: Cinética da produção de β -glicosidase por *Aspergillus niger* LBA 02 em meio semissólido contendo farelo de trigo, casca de maracujá, água destilada, extrato de levedura, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 e MgSO_4 nas condições do ponto central do planejamento experimental fracionário 2 ⁽⁸⁻⁴⁾

Tabela I - 3: Planejamento fatorial fracionário 2⁽⁸⁻⁴⁾ codificado para estudo dos efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH₂PO₄, NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 e produção de β-glicosidase.

Ensaio	Variáveis								Atividade U/g
	Temp.	Casca de maracujá	Quant. de água adicionada	Quant. de inóculo	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	MgSO ₄ .7H ₂ O	Ex. de levedura	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	42,75
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	17,85
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	26,4
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	27,6
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	17,35
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	28,25
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	8,9
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	9,45
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	49,15
10	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	14
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	14,4
12	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	24,6
13	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	18,3
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	40,35
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	12,4
16	1	1	1	1	1	1	1	1	17,05
17	0	0	0	0	0	0	0	0	19,5
18	0	0	0	0	0	0	0	0	22,25
19	0	0	0	0	0	0	0	0	26,55

Tabela I - 4: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial fracionário 2⁽⁸⁻⁴⁾ codificado no estudo dos efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH₂PO₄, NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 e produção de β-glicosidase.

Variável	Código	Unidade	Nível		
			-1	0	+1
Temperatura	x1	°C	25	30	35
Casca de maracujá	x2	gramas	12,5	25	37,5
Quant. de água adicionada	x3	mL	10	20	30
Quant. de inóculo	x4	nº de discos*	10	15	20
KH ₂ PO ₄	x5	%	0	0,1	0,2
NH ₄ NO ₃	x6	%	0	0,1	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	x7	%	0	0,05	0,1
Extrato de levedura	x8	%	0	0,05	0,1

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

A Tabela I - 5 ilustra os efeitos das variáveis independentes na atividade de β-glicosidase. De acordo com a análise dos efeitos, pode-se observar que as variáveis quantidade de casca de maracujá e MgSO₄.7H₂O apresentaram efeitos negativos e significativos na faixa estudada a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Entretanto, a variável independente quantidade de água adicionada foi incluída para um novo planejamento, pois o p -valor estava muito próximo ao limite (considerando confiança de 90%, $p < 0,1$) e a variável MgSO₄.7H₂O não foi incluída, pois já havia sido estudada na concentração zero. A variável independente temperatura apresentou efeito negativo sobre a atividade da β-glicosidase, mas não significativo, sendo fixada no nível (0), na temperatura de 30°C. A variável independente quantidade de inóculo apresentou efeito positivo, mas não significativo, sendo fixada no nível (-1), com inóculo de 10 discos de meio recobertos com o fungo. E os sais (KH₂PO₄,

NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O) e extrato de levedura foram fixados no nível (-1), pois não foram significativos.

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

Tabela I - 5: Efeitos da temperatura, quantidade de água, inóculo, casca de maracujá, KH₂PO₄, NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O e extrato de levedura no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para fermentação da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 e produção de β-glicosidase, do planejamento fatorial fracionário 2⁽⁸⁻⁴⁾.

	Efeito	Erro padrão	t(10)	P
Média	23,00	2,08	11,08	0,000001
Temperatura	-1,31	4,53	-0,29	0,778
Casca de maracujá*	-10,90	4,53	-2,41	0,0368
Quant. de água adicionada	-8,08	4,53	-1,78	0,104
Quant. de inóculo	1,46	4,53	0,32	0,753
KH₂PO₄	1,95	4,53	0,430	0,676
NH₄NO₃	2,06	4,53	0,45	0,658
MgSO₄.7H₂O*	-12,40	4,53	-2,74	0,021
Extrato de levedura	1,52	4,53	0,34	0,743

*Parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança

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

O planejamento composto central rotacional (DCCR 2²) foi utilizado para verificar os efeitos das variáveis quantidade de casca de maracujá e quantidade de água adicionada ao meio de cultivo semissólido de farelo de trigo para a produção de β -glicosidase, previamente selecionadas a partir do planejamento fatorial fracionário. O DCCR 2² contendo 11 ensaios incluindo 4 ensaios referentes ao fatorial completo, 4 ensaios referentes aos pontos axiais ($\alpha=1,41$) e 3 ensaios no ponto central e a variável dependente atividade de β -glicosidase apresenta-se na Tabela I - 6, e os níveis estudados, com valores codificados e reais, encontram-se na Tabela I - 7.

Tabela I - 6: Planejamento composto central rotacional 2² codificado para o estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A.niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Ensaio	Variáveis		Atividade (Unidade de β -glicosidase/g)
	Casca de maracujá	Quant. de água	
1	-1	-1	47,28
2	-1	1	51,47
3	1	-1	46,64
4	1	1	44,04
5	-1,41	0	46,76
6	1,41	0	51,73
7	0	-1,41	60,50
8	0	1,41	42,18
9	0	0	47,44
10	0	0	44,94
11	0	0	41,04

Tabela I - 7: Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional 2² para o estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

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

A Tabela I -8 apresenta os valores de t, p e coeficientes de regressão. Os valores de p são utilizados para conferir a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta do modelo. Quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p, maior será a significância do coeficiente, como pode-se observar na tabela I -8, nenhuma das variáveis foi significativa.

Tabela I - 8: Coeficiente de regressão e desvio padrão no estudo dos efeitos da quantidade de casca de maracujá e água no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(5)	P
Média*	44,470	3,28	13,56	0,000039
(1) Casca de maracujá (L)	-0,13	2,01	-0,06	0,951
Casca de maracujá (Q)	1,65	2,39	0,69	0,520
(2) Quantidade de água(L)	-3,04	2,01	-1,51	0,190
Quantidade de água (Q)	2,70	2,39	1,13	0,309
1L x 2L	-1,70	2,84	-0,60	0,576

*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

L: parâmetro linear; Q: parâmetro quadrático.

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

Farinas et al. (2008) estudaram a produção de celulases por linhagem de *A. niger* em meio de fermentação semissólida. Os autores testaram os resíduos agrícolas bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e farelo de soja e verificaram que os resíduos agroindustriais que permitiram maior produção de β -glicosidase foram o farelo de soja (5,25 UI/g) e o farelo de trigo (3,0 UI/g).

Segundo Haque et al. (2002) o farelo de trigo é um sub-produto rico em proteína, possui baixo custo e é fácil de ser encontrado. Sendo um substrato complexo composto por proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), lipídeos (6%) e vitaminas do complexo B, o que favorece o crescimento e produção de enzimas por micro-organismos (Leite, 2008).

4.4.1 Determinação do tempo de fermentação da linhagem *A.niger* LBA 02 no meio de cultura semissólido de farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a maior produção de β -glicosidase

O tempo de fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02, em meio de cultivo semissólido composto de 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de bagaço de cana-de-açúcar e 7,5 mL de água destilada, para a produção de β -glicosidase foi determinado nas condições do ponto central do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². A Figura 1 - 6 mostra que foi obtida maior atividade de β -

glicosidase (74,7 U/g) após de 240 h de fermentação a 30°C. Para os ensaios subsequentes, as fermentações foram conduzidas durante 240 h.

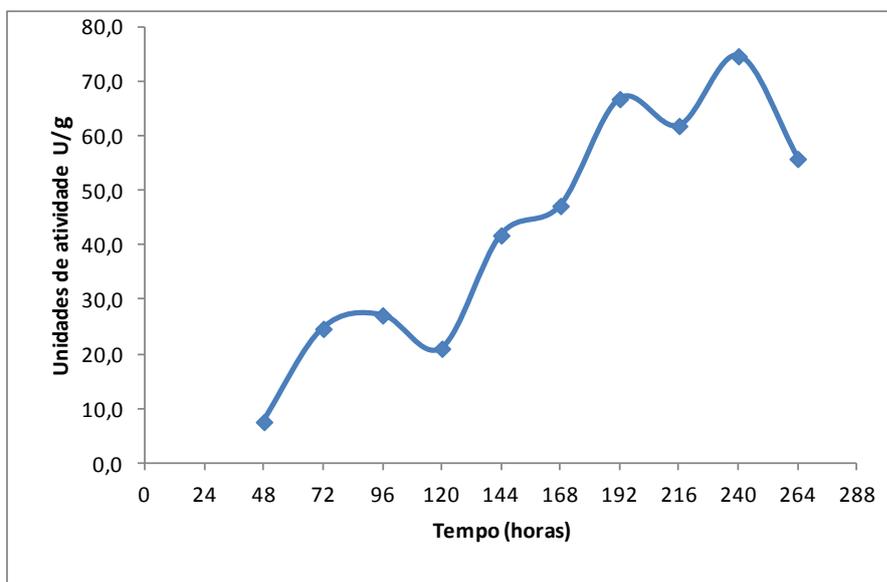


Figura I - 6: Cinética da produção de β -glicosidase por *A. niger* LBA 02 em meio semissólido composto de 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de bagaço de cana-de-açúcar e 7,5 mL de água destilada, a 30°C.

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

O planejamento composto central rotacional (DCCR 2²) foi realizado para verificar os efeitos das variáveis quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água adicionada ao meio de cultivo semissólido de farelo de trigo para produção de β -glicosidase. O DCCR 2² contendo 11 ensaios incluindo 4 ensaios referentes ao fatorial completo, 4 ensaios referentes aos pontos axiais ($\alpha=1,41$), 3 ensaios no ponto central e a variável dependente atividade de β -

glicosidase apresenta-se na Tabela I - 9, e os níveis estudados, com valores codificados e reais, encontram-se na Tabela I -10.

Tabela I - 9: Planejamento composto central rotacional 2² codificado para estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase.

Ensaio	Variáveis		Atividade (U /g)
	Bagaço de cana-de-açúcar	Água destilada	
1	-1	-1	36,18
2	-1	1	32,14
3	1	-1	19,39
4	1	1	22,20
5	-1,41	0	37,60
6	1,41	0	22,63
7	0	-1,41	28,21
8	0	1,41	16,72
9	0	0	29,01
10	0	0	26,12
11	0	0	26,41

Tabela I - 10: Valores codificados e reais utilizados no composto central rotacional 2² para o estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase.

Variáveis	Unidades	Nível				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Bagaço de cana-de-açúcar	G	0	1,8	6,25	10,7	12,5
Água destilada	mL	5	5,7	7,5	9,3	10

A Tabela 1 - 11 apresenta os valores de t, p e coeficientes de regressão utilizados para a construção do modelo representativo da atividade de β -glicosidase a partir das variáveis estudadas.

Tabela 1 - 11: Coeficiente de regressão e desvio padrão no estudo dos efeitos da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada no meio de cultura semissólido de farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	T(5)	p
Média*	27,18	1,64	16,66	0,000014
(1) Bagaço de cana-de-açúcar (L)*	-5,99	0,99	-5,99	0,002
Bagaço de cana-de-açúcar (Q)	1,76	1,19	1,48	0,198
(2) Água destilada(L)*	-2,18	0,99	-2,18	0,080
Água destilada (Q)	-2,06	1,19	-1,73	0,143
1L x 2L	1,71	1,41	1,22	0,279

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança.

L: parâmetro linear; Q: parâmetro quadrático.

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

A análise de variância (ANOVA) mostrou que 75% da variação observada nos ensaios foi explicada pelo modelo. O F-valor calculado (11,76) para a

regressão foi maior que o F – tabelado (3,11) (p = 0,004) refletindo a significância estatística do modelo. A falta de ajuste não foi significativa.

Tabela I - 12: ANOVA para a regressão do modelo para a produção de β-glicosidase (U/g)

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrrado médio	F _{calc}
Regressão	325,14	2	162,56	11,76
Resíduos	110,31	8	13,78	
Falta de ajuste	105,27	6	17,54	7,02
Erro Puro	5,01	2	2,50	
Total	435,4573			

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

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

Onde:

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

x_1 = bagaço de cana-de-açúcar (g)

x_2 = água destilada (mL)

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

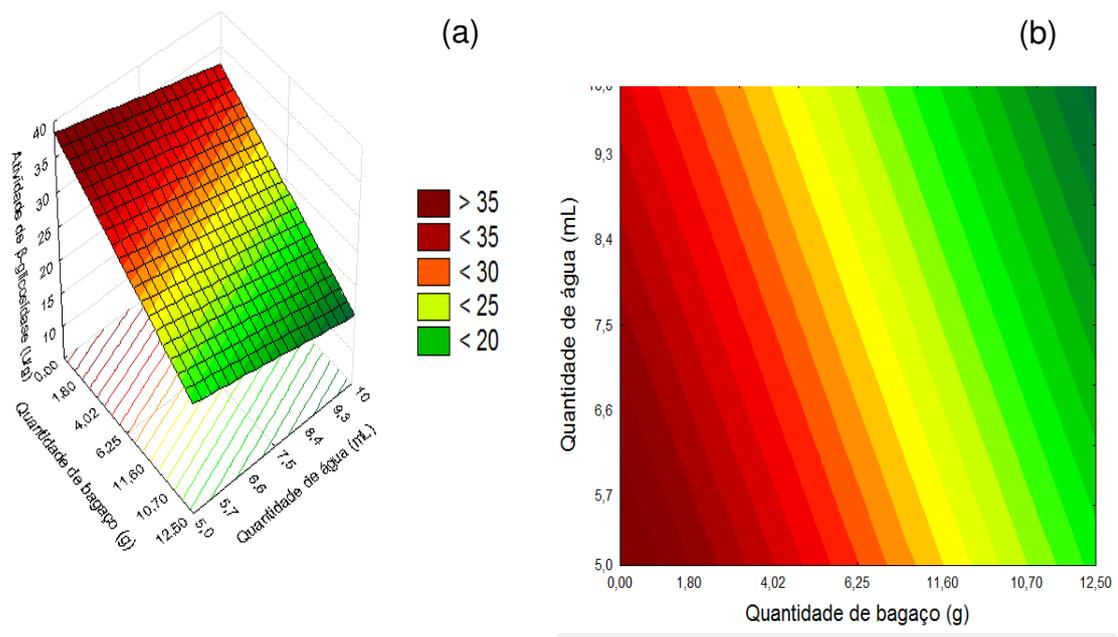


Figura 1 - 7: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β -glicosidase (U/g) em função da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (g) e quantidade de água destilada (mL) no meio semissólido de farelo de trigo

Kang et al. (1999) estudaram a produção de β -glicosidase por uma linhagem de *A. niger* mutante por fermentação submersa. O meio de cultivo continha materiais lignocelulósicos (2%), farelo de trigo (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,05%), KH_2PO_4 (0,05%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%). Os autores testaram palha de arroz, madeira e jornal como materiais lignocelulósicos para a produção de β -glicosidase. Após sete dias de incubação a 28°C , a atividade de β -glicosidase foi 11,4 U/mL, 6,4 U/mL e 6,7U/mL para os meios de cultivo contendo palha de arroz, madeira e papel, respectivamente.

4.6 Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio semissólido de farelo de trigo, casca de maracujá ou bagaço de cana-de-açúcar e água destilada para a fermentação de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Após a realização do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio de cultura contendo farelo de trigo, casca de maracujá e água destilada, foi estudada a validação do ensaio 7 como descrito no item 3.2.4, onde foi obtido o maior valor de atividade de β -glicosidase 60,5 U/g.

Foram realizados 5 repetições do ensaio 7 de fermentação de *A. niger* LBA 02 em meio de cultura nº 1 composto por 25 g de farelo de trigo, 6,25 g de casca de maracujá e 5 mL de água destilada. Para comparação foram realizados 5 repetições da fermentação de *A. niger* LBA 02 em meio de cultura nº 2 sem a adição de casca de maracujá.

A Tabela 1 - 13 ilustra que a produção de β -glicosidase pela fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02 em meio de cultivo nº 1 e em meio de cultivo nº 2, foram similares indicando que a adição da casca de maracujá no meio de farelo de trigo não resultou em aumento da produção da enzima, nos níveis estudados.

Verificou-se que os resultados analisados pelo teste de Tukey, não diferem estatisticamente com 95% de confiança.

Tabela I - 13: Validação do planejamento experimental DCCR 2² para o estudo dos efeitos da adição de casca de maracujá e água destilada em meio de cultura semissólido composto por farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Meio de cultivo nº 1		Meio de cultivo nº 2	
Ensaio	Unidades de β -glicosidase (U/g)	Ensaio	Unidades de β -glicosidase (U/g)
1	22,96 ^a	1	25,75 ^a
2	29,95 ^a	2	33,27 ^a
3	33,33 ^a	3	31,81 ^a
4	29,26 ^a	4	30,80 ^a
5	25,86 ^a	5	32,63 ^a

*As letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os valores ($p < 0,05$).

Após a realização do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² do meio de cultura contendo farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e água destilada, foi realizada a validação do ensaio 1 como descrito no item 3.2.4 onde foi obtido o maior valor de atividade de β -glicosidase (36,18 U/g).

Foram realizados 5 repetições do ensaio 1 com o meio de cultura nº 3 composto por 25 g de farelo de trigo, 1,8 g de bagaço de cana-de-açúcar e 5,7 mL de água destilada. Para comparação foram realizados 5 repetições do meio de cultura nº 4 sem a adição de bagaço de cana-de-açúcar.

A Tabela I - 14 ilustra que a produção de β -glicosidase pela fermentação da linhagem *A. niger* LBA 02 em meio de cultivo nº 3 e em meio de cultivo nº 4 não diferiram estatisticamente com 95% de confiança. Pelo teste de Tukey, foi observado que a adição de bagaço de cana-de-açúcar no meio de farelo de trigo não atuou como indutor da β -glicosidase, nos níveis estudados.

Tabela I - 14: Validação do planejamento experimental DCCR 2² para o estudo dos efeitos da adição de bagaço de cana-de-açúcar e água destilada em meio de cultura semissólido composto por farelo de trigo para a fermentação da linhagem de *A. niger* LBA 02 e produção de β -glicosidase

Meio de cultivo nº 3		Meio de cultivo nº 4	
Ensaio	Unidades de β -glicosidase (U/g)	Ensaio	Unidades de β -glicosidase (U/g)
1	30,35 ^a	1	47,02 ^a
2	42,81 ^a	2	39,66 ^a
3	42,77 ^a	3	44,81 ^a
4	40,72 ^a	4	37,46 ^a
5	43,69 ^a	5	40,29 ^a

5 CONCLUSÃO

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

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

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), disponível em http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas_par2_cap4.pdf, acesso em 17/11/2011.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI; S. K. - Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n.7, p.1341–1346, 2012.

BAI, Z.H; ZHANG, H.X; QI, H.Y; PENG, X.W; LI, B.J - Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 1, p. 49-52, 2004.

BARRERA-ISLAS, G.A.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; SALGADO, L.M.; PONCE-NOYOLA, T. - Characterization of a beta-glucosidase produced by a high-specific growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 266-270, 2007.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. - Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v.100, p. 2861–2866, 2009.

BHAVSAR, K.; KUMAR, R.V.; KHIRE, M.J. – Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification. **Process Biochemistry**, v.47, p.1066 – 1072, 2012.

BUTTERS, T.D. - Gaucher disease, **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p.412– 418, 2007.

CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A. – β – glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p. 3389 – 3405, 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova** [online], v.33, n.1, p. 181-188, 2010.

CONAB, 2011 disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_30_13_41_19_bol_etim_cana_portugues_-_agosto_2011_2o_lev..pdf, acesso 17/11/2011.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; NETO, G.K.; FREITAS, R.J.S. - Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtida por secagem. **Boletim CEPPA**, v.23, n.2, p.221-230, 2005.

COUGHLAN, M.P. Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.32, p.77-100, 1991.

DHAKE, A.B.; PATIL.M.B.; Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 170-176, 2005.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, n. 2 ,p. 244-250, 2006.

DESROCHERS, M; JURASEK, L; PAICE, G – High production of β -glucosidase in *Schizophillum commune*. Isolation of the enzymes and effect of culture filtrate on cellulose hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 221-228, 1981.

DINGLE, J.; REID, W.W.; SOLOMONS, G.L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II Application of the “cup-plate” assay to the

estimation of enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.4, p.149-155, 1953.

DURAND, A. – Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n:2, p.113-125, 2003.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, F.U.; NETO, V.B.; COURI, S. - Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semissólida, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, p.1-17, 2008.

GANEM, B. - Inhibitors of carbohydrate-processing enzymes: Design and synthesis of sugar-shaped heterocycles. **Accounts of Chemical Research**, v. 29 p. 340-347, 1996

GRABNITZ, F.; STAUDENBAUER, W.L. - Characterization of two β -glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. **Biotechnology Letters**, v.10, p. 73-78, 1988.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; JANBON, G.; ARNAUD, A.; GALZY, P. - A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44: p.2336–2340, 1996.

HAQUE, M.A.; SHAMS-UD-DIN, M., HAQUE, A. - The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science and Technology**; v.37, p.453–62, 2002.

HENRISSAT, B. - A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequency similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280, p. 309-318, 1991.

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

IWASHITA, K.; TODOROKI, K.; KIMURA, H.; SHIMOI, H.; ITO, K. - Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 10, p. 1938-1946, 1998.

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

KANG, S. W.; KO, E.H.; LEE, J. S.; KIM, .S. W. - Over-production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 647–650, 1999.

KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. - Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. **Protein Expression and Purification**, v.87, n. 1, p. 11-16, 2012.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. - Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 74-81, 2007.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPHUKIEW, J.; WHALLEY, A.J.; REYNOLDS, C.D.; SIHANONTH, P. - Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 162-170, 2007.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. - Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 63-67, 1997.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. - A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 115p, 1988.

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

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

LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT,R.; WIERMER, M.STEIN,M.; LANDTAG,J.; BRANDT, W.; ROSAHL, S.; SCHEEL,D.; LIONRENTE, F.; MOLINA,A.; SOMERVILLE,S. SCHULZE-LEFERT, P. – Pre and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. **Science**, v. 310, p. 1180-1183, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIOUS, I.S. - Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ. G.; BHAT, M.K. – Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MANASFIELD, A.K.; ZAECKLEIN, B.W.; WHITON, R.S. - Quantification of glucosidase activities in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.53, p.303-307, 2001.

MAKROPOULOU, M., CHRISTAKOPOULOS,P., TSITSIMPIKOU,C., KEKOS,D., KOLISIS,F.N. AND MACRIS,B.J. - Factors affecting the specificity of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-

beta-D-glucosides. **International Journal of Biology and Macromolecules**, v. 22, p. 97–101, 1998.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. - Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*. Purification of a novel α -galactosidase activity, **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, n. 5, 998, p. 383-390, 1998.

MATSUURA M, SASAKI J, MURAO S. - Studies on β -glucosidase that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p.1623–1627, 1995.

MITIDIERI, S.; MARTINELL, A. H. S. ; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. - Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1217–1224, 2006.

MONTIEL-GONZÁLEZ A. M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FERNÁNDEZ, F. J.; LOERA, O. - Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.39, n. 12, p. 2085-2090, 2004.

NAGAMOTO,H.; MATSUSHITA,Y.; SUGAMOTO, KL.; MATSUI,T. – Preparation and properties of gelatin immobilized β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p.128-136, 2005.

NAHID, P.; VOSSOUGH, M.; ROOSTAAZAD, R.; AHMADI, M.; ZARRABI, A.; HOSSEINI, S.M. - Production of glucoamylase by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **International Journal of Engineering**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2012.

OH, K.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H.; MATSUOKA, H.- Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus,

Cladosporium resinae, isolated from kerosene, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1999, v. 63, n. 2, p. 281-287.

OKI, Y; FERNANDES, G.W. – Fungos: amigos ou inimigos?. **Ciência Hoje**, v.42, n.252, p. 64-66, 2008.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.D; GOMES, E; DA-SILVA,R. - Purification and characterization of two β -glucosidases from thermophilic fungus *Thermonascus aurantiacus* Miede. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 685 – 690, 2002.

PANDEY, A. – Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PANDEY, M.; MISHRA, S. - Expression and characterization of *Pichia etchellsii* β -glucosidase in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 45-51, 1997.

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. - Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Science**, v. 5 n.3, p.308-312, 2009.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; PACHECO, T.A.R.C.- Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food and Science Industry**, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001.

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

PERA, L.M.; ROMERO, C.M.; BAIGORI, M.D.; CASTRO, G.R. - Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.2, p. 247-252, 2006.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. - The Genus *Aspergillus*. p. 686, Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1965.

RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, I.Z.; GUNATA, Z.; BARRE, P. - Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p. 3607–3614, 1998.

ROSA, C.A.R.; CAMPOS, S.G.; BARONI, F.A. – Práticas de micologia veterinária, UFRRJ, Instituto de Veterinária, Departamento de Micologia e Veterinária, 2002.

ROSE, S.B.; MILLER, R.E. - Studies with the agar cup-plate method a standardized agar cup-plate technique. **Journal of Bacteriology**, v. 38, p.525-537, 1939.

RUTZ, F.; TORERO,A.; FILER, K. - Fermentação em estado sólido: a evolução na produção das enzimas, **Revista Aveworld**, v.29, 2008.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. - Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**.v.62, n.9, p.3165–3170, 1996.

SANTOS, S.F.M. - Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado semissólido utilizando pedúnculo de caju como substrato, Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. - Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p.169-179, 2003.

TOLEDO, A. L.; SEVERO, J.B.; SOUZA, R.R.; CAMPOS, E.S.; SANTANA, J.C.; TAMBOURGI, E.B. - Purification by expanded bed adsorption and

characterization of an α -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1, p. 51-56, 2007.

TU M, ZHANG X, KURABI A, GILKES N, MABEE W, SADDLER J. - Immobilization of beta-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v.28, n. 3, p.151-6, 2006.

VAN RENSBURG, P.; ZYL, W.H.V.; PRETORIOUS, I.S. – Engineering yeast for efficient cellulose degradation. **Yeast**, v.14, p. 67-76, 1998.

YAN, T.R.; LIAU, J.C: - Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.965-970, 1998.

YUN, S.; JEONG, C.; CHUNG, D. CHOI, H. - Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

WOLOSOWSKA, S.; SYNOWIECKI, J. -Thermostable beta-glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. **Food Chemistry**, v.85: p.181-187, 2004.

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

ZHOU, J. M.; GE, X.-Y.; ZHANG, W. G. - Improvement of polygalacturonase production at high temperature by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.21, ,p. 10085-10088, 2011.

CAPÍTULO II ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE *A. niger* LBA 02 EM DIFERENTES SUPORTES

RESUMO

As β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) hidrolisam as ligações β -1,4 glicosídicas da celobiose, aril e alquil glicosídeos. O interesse na enzima β -glicosidase tem aumentado devido a sua participação nos mais variados processos biotecnológicos incluindo a aplicação da enzima para formação de compostos aromáticos e estabilização de sucos e bebidas, sendo de potencial interesse para a indústria de alimentos e bebidas, por melhorar as propriedades sensoriais dos produtos. A enzima também pode ser usada na síntese de β -glicosídeos de interesse como os alquil glicosídeos com potenciais aplicações nas indústrias de alimentos, de detergente e farmacêutica. Também atuam na formação de moléculas bioativas, hidrolisando compostos glicosilados, como as isoflavonas liberando as suas formas agliconas. A β -glicosidase desempenha um papel crucial na degradação enzimática da celulose para a produção de etanol a partir de resíduos agrícolas celulósicos. A imobilização da enzima β -glicosidase em suporte inerte oferece uma perspectiva de economia de custos significativa pela facilidade em reciclar a enzima através de diversos ciclos de hidrólise em batelada. Dentre os métodos avaliados para imobilização da β -glicosidase, a imobilização em lentes PVA - Lentikats[®] baseado na secagem controlada do hidrogel de PVA e o método de sol-gel baseado na formação de xerogel de sílica armazenado em atmosfera com atividade de água controlada, mostraram-se mais adequados. Os valores de K_M para o substrato celobiose foram de 1,69; 1,01; 3,61 mM para a enzima livre, enzima imobilizada em sol-gel e enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®], respectivamente. A enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] foi estável por mais de 19 ciclos de 24 h na hidrólise de celobiose sem perda significativa de atividade. O processo contínuo utilizando β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] foi realizado alimentando-se o reator com uma solução de celobiose

1,5 mM em tampão acetato 0,5 M pH 5,0, com um fluxo de 0,3 mL/min, e a 50°C. A taxa de conversão relativa da solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,5 M pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] em coluna de 1,0 cm³ e fluxo de 0,3 mL/min foi de 100% após cinco horas, entretanto a porcentagem de conversão diminuiu para 40% após 148 h.

SUMMARY

The β -glucosidase hydrolyze β -1, 4 glycosidic linkages of cellobiose, aryl and alkyl glycosides. The interest in the enzyme β -glucosidase has been increasing due to their participation in various biotechnological processes including application of the enzyme for formation of aromatic compounds and stabilization of juices and beverages, being of potential interest to the food and beverage industry by improving sensorial properties of these products. The enzyme can also be used in the synthesis of β -glycosides of interest as alkyl glycosides with potential applications in the food, detergent and pharmaceutical industries. Also act in the formation of bioactive molecules, hydrolyzing glycosylated compounds, such as isoflavones releasing their aglycones forms. The β -glucosidase plays a crucial role in the enzymatic degradation of cellulose and production of ethanol from cellulosic agricultural residues. The immobilization of β -glucosidase in inert support offers the prospect of significant cost savings due to facility of recycling the enzyme through multiple batch hydrolysis cycles. Among the methods evaluated for immobilization of β -glucosidase, immobilization in lens - shaped PVA - Lentikats[®] based on the controlled drying of the hydrogel of PVA and the sol-gel method based on the formation of silica xerogel stored in an atmosphere with controlled water activity showed more suitable. The K_M values (mM) to cellobiose substrate were 1.69, 1.01, 3.61 for free enzyme and immobilized enzyme in sol-gel immobilized and in lenses PVA - Lentikats[®], respectively. The enzyme immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] was stable for over 19 cycles of 24 h in the cellobiose hydrolysis without significant loss of activity. The continuous process using immobilized β -glucosidase in lens - shaped PVA - Lentikats[®] was carried out feeding the reactor with a 1.5 mM cellobiose solution in acetate buffer 0.5 M pH 5.0, at a flow rate of 0.3 mL / min at 50 °C. Relative conversion rate of 1.5 mM cellobiose solution in acetate buffer 0.5 M pH 5.0 at 50 °C, using β -glucosidase immobilized in lens - shaped PVA - Lentikats[®] using column 1.0 cm³ and flow 0.3 mL / min was 100% after five hours, but the conversion decreased to 40% after 148 h.

1 INTRODUÇÃO

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

As β -glicosidases representam um importante grupo de enzimas devido ao seu uso potencial em vários processos biotecnológicos (Karnchanatat et al., 2007). A enzima β -glicosidase hidrolisa a celobiose em glicose e tem participação na regulação da velocidade global das reações de hidrólise da celulose porque as enzimas endoglucanases e exoglucanases são frequentemente inibidas pela celobiose. Assim, a β -glicosidase não só produz glicose a partir de celobiose, mas também reduz a inibição pela celobiose, levando as enzimas endoglucanase e exoglucanase a atuarem mais eficientemente (Oh et al., 1999).

A inibição pelo produto é particularmente problemática quando altas concentrações de substratos são usadas com o objetivo de produzir xarope com alta concentração de glicose para fermentação. Consequentemente, preparações de celulasas são tipicamente suplementadas com quantidade adicional de β -glicosidases (Coughlan, 1991; Saha e Bothast, 1996; Kang, 1999; Ortega, 2001; Lynd et al., 2002).

A enzima pode ser usada na síntese de β - glicosídeos de interesse como os alquil glicosídeos com potenciais aplicações nas indústrias de alimentos, de

detergente e farmacêutica (Coughlan, 1985; Makropoulou et al., 1998; Yan e Liao, 1998). Estas enzimas têm participação em reações importantes na liberação enzimática de compostos aromáticos a partir de precursores glicosídicos presentes em frutas e produtos de fermentação, fator importante nas indústrias de alimentos e de bebidas, a fim de melhorar as características sensoriais dos produtos (Gueguen et al., 1996; Riou et al., 1998). Também atuam na formação de moléculas bioativas, hidrolisando compostos glicosilados, como as isoflavonas, liberando as suas formas agliconas (Riou, et al., 1998; Park et al., 2001; Chang e Juang, 2007).

Apesar de possuírem excelentes propriedades catalíticas, as enzimas apresentam muitas outras características que não são adequadas para o uso em indústrias químicas, como: baixa estabilidade, inibição por altas concentrações de substrato ou produto, baixa atividade e seletividade para substratos não-naturais em condições não-convencionais. O principal objetivo da imobilização de enzimas é a sua reutilização por muitos ciclos. Deste modo, simplicidade do processo e propriedades da enzima devem estar fortemente associadas com o desenvolvimento do método pra imobilização da enzima. Nos últimos 30 anos, inúmeros trabalhos de imobilização de enzimas e células têm sido publicados na literatura científica. Entretanto, apenas poucos trabalhos são simples e adequados o suficiente para promover as propriedades funcionais de enzimas e células, como atividade, estabilidade, seletividade e propriedades relativas (Guisan, 2006). Outra questão importante a ser considerada quanto a aplicação é o custo inerente ao suporte, método de imobilização e o que fazer com o suporte uma vez que toda atividade catalítica da enzima tiver sido esgotada.

Este trabalho visou a seleção de suportes para a imobilização da enzima β -glicosidase, caracterização da β -glicosidase imobilizada, e aplicação da enzima imobilizada em batelada e em processo contínuo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A imobilização de enzimas oferece muitas vantagens industriais e aplicações biotecnológicas, incluindo a reutilização, aumento da estabilidade enzimática, facilidade de separação do produto de reação do biocatalisador permitindo o processo contínuo e evitando a perda de proteína ou atividade nas etapas subsequentes do processo (Polizzi et al., 2007).

Existe uma ampla gama de estratégias que tem sido propostas na literatura para a imobilização de enzimas. Algumas delas são imobilização em suportes pré fabricados por adsorção, ligação iônica, ligação covalente, aprisionamento em polímeros, encapsulação, ligação cruzada com cristais de enzima (CLEC) e ligação cruzada com enzima agregados (CLEA).

O aprisionamento da enzima é normalmente realizado através de uma rede de polímeros, como polímeros orgânicos ou sol-gel e geralmente é realizado *in situ*, ou seja, a síntese da rede polimérica ocorre na presença da enzima (Sheldon, 2007). A vantagem desta técnica é que ela confere proteção à enzima evitando o contato direto com o meio, assim minimiza os efeitos das bolhas de ar, agitação mecânica, solventes orgânicos, porém possui desvantagens como limitações de transferência de massa e baixa carga de enzima quando comparado aos suportes porosos (Lalonde e Margolin, 2002).

A encapsulação de enzimas é um método similar ao aprisionamento, no qual as enzimas são contidas no interior de uma película polimérica ou micelar. Confere igualmente proteção ao meio externo, porém possui limitada aplicação para biocatálise de substratos maiores causando problemas de transferência de massa, tendencialmente menos significativos que no caso do aprisionamento, devido à menor espessura do meio sólido onde ocorre difusão (Lalonde e Margolin, 2002).

A imobilização em suportes sólidos oferece a perspectiva de redução de custos pela possibilidade da utilização da enzima por múltiplos ciclos. A imobilização em muitos casos também aumenta a termoestabilidade ou a resistência da enzima a inativação pelo cisalhamento (Katchalski- Katzir e Kraemer, 2000; Mateo et al., 2000). A imobilização em suportes pré-fabricados proporciona rigidez e a possibilidade de uso em reatores de diferentes configurações para biocatálise como o de leito fluidizado (Kunamneni et al., 2008).

A enzima pode ser adsorvida no suporte sendo esta técnica relativamente simples e barata além de não modificar quimicamente a enzima, porém há limitações, pois como a ligação é relativamente fraca em condições industriais pode ocorrer fuga da enzima, principalmente em solventes aquosos (Miletić et al., 2009).

Ligação iônica também é outra técnica simples de imobilização não-covalente. A enzima pode ser ligada à biopolímeros polissacarídeos como a dextrana, agarose e quitosana. Esses suportes poliméricos possuem grupos químicos que podem ser ativados promovendo uma interação iônica.

A imobilização covalente possui vantagens, pois forma ligações fortes e estáveis entre a enzima e o suporte, eliminando desse modo a perda de atividade pelo desligamento da enzima. O grupo ϵ -amino da lisina é o mais comumente utilizado como ponto de fixação da ligação covalente (Křenkova e Foret, 2004). Os grupos epóxidos geralmente são utilizados como auxiliares na ligação, pois são relativamente estáveis e podem se ligar a lisina, e reagir com a proteína em condições amenas. O suporte de imobilização ideal deve ter braços curtos, grande densidade dos grupos reativos necessários para ligação multi-pontual e assim promover a rigidez da enzima (Mateo et al., 2007). Entretanto a formação de ligações fortes também pode ser considerado uma desvantagem, pois a enzima pode ser irreversivelmente desativada impossibilitando o seu uso e a reutilização do suporte (Sheldon, 2007).

Com o objetivo de aumentar a massa de biocatalisador imobilizado, suportes porosos têm sido utilizados, permitindo a ligação do biocatalisador também à estrutura superficial interna (Groboillot et al., 1994).

Assim, há um interesse crescente em agentes de ligação cruzada para enzimas sem aplicação de reagentes proibidos na indústria de alimentos. Para este efeito, o uso da enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) tem se mostrado adequado, pois ela catalisa a ligação cruzada de proteínas entre grupo carboxila de um resíduo de glutamina e os amino-grupo de lisina. Em comparação com métodos químicos, a reação catalisada pela transglutaminase requer condições brandas, que permitem a imobilização de enzimas sensíveis.

O método de auto-imobilização, consiste na imobilização sem a necessidade do suporte, utilizando agentes de ligação cruzada bifuncionais como o glutaraldeído para a ligação da enzima. Biocatalisadores fisicamente fortes podem ser formados quando as enzimas estão próximas na forma de cristais de proteína. Os cristais de enzima unidos por ligação cruzada, denominados CLEC, apresentam tamanho na faixa de 1-100 μm , possuem alta estabilidade mecânica e requerem enzima com alto grau de pureza (Roy e Abraham, 2004). As desvantagens deste método é que só pode ser aplicado a enzimas capazes de se cristalizar e possui custo elevado (Brady et al., 2004).

Um método com um custo mais acessível consiste em precipitar as enzimas e promover a formação de ligações cruzadas formando agregados (CLEA) de tamanho de partículas entre 50-100 μm (López-Serrano et al., 2002; Kaul et al., 2007). Através de modificações adequadas das condições para a formação de ligações cruzadas, as propriedades das CLEA podem ser significativamente ajustadas. Uma vantagem desta técnica é a alta concentração de atividade enzimática no catalisador, já que não há uma diluição provocada pela adição de suporte (Sheldon, 2007).

Synowiecki e Wolosowska (2006) estudaram a imobilização da β -glicosidase termoestável de *Sulfolobus shibatae* em sílica gel modificada

utilizando transglutaminase como agente de ligação cruzada. Foi obtida maior eficiência de imobilização em pH 5,0. Os autores observaram que as preparações de β -glicosidase imobilizada mais ativas foram alcançadas utilizando-se 40 mg/mL de transglutaminase e 50°C. A imobilização não alterou o pH ótimo da enzima.

Nagamoto et al. (2005) encapsularam β -glicosidase hipertermoestável de *Pyrococcus furiosus* em gel de gelatina contendo ligação cruzada com transglutaminase. A enzima β -glicosidase imobilizada em gelatina foi consideravelmente mais termoestável que a enzima nativa. A enzima imobilizada e liofilizada foi armazenada por um período de 1 mês a 90°C sem perda significativa de atividade. A β -glicosidase imobilizada em gelatina se mostrou capaz de catalisar a transglicosilação de 5-fenilpentanol (PP) com equivalente a 1,5 mmol de fenil β -D - glucopiranosídeo (PG) e com equivalente a 3,0 mmol de celobiose a pH 5,0 e 70°C, formando 5-fenil β -D-glucopiranosídeo (PPG) com rendimento de 31 e 44%, respectivamente. A β -glicosidase imobilizada foi reutilizável por vários ciclos.

Abdel-Fattah et al. (1997) estudaram a imobilização de celobiase também conhecida como β -glicosidase de *A. niger* 20 em quitosana e poliacrilamida. Os autores estudaram a quantidade de enzima adicionada, inicialmente na faixa de 800-4000 U de celobiase, a concentração de glutaraldeído na faixa de 0,1 - 0,4% para ativação da quitosana e a concentração das soluções de acrilamida na faixa de 2,5-12,5%, contendo diferentes agentes de ligação cruzada. A melhor eficiência de imobilização foi obtida na concentração de 0,3% de glutaraldeído, pois acima dessa concentração a atividade enzimática diminuiu, devido à uma forte ligação da enzima com o suporte alterando sua conformação estrutural. A quantidade de enzima adicionada inicialmente para uma maior eficiência de imobilização foi de 2400 U por grama de suporte. Os autores observaram que o aumento da concentração de acrilamida resultava num aumento da atividade da celobiase, sendo obtida atividade mais elevada utilizando-se 10% de acrilamida e grau de reticulação de 5%. Os parâmetros de

pH, temperatura e constantes cinéticas para a enzima livre e imobilizada também foram avaliados. De acordo com os autores o pH de atividade ótimo para a enzima imobilizada foi 4,5-5,0, similar ao pH da enzima livre e a temperatura de atividade ótima para a enzima imobilizada foi 65°C, enquanto que para a enzima livre a temperatura ótima foi 55°C indicando que a imobilização em quitosana conferiu maior resistência térmica à enzima celobiase. O valor de K_M para enzima imobilizada foi um pouco superior do que enzima livre, 1,24 e 1,05 mM, respectivamente. Enquanto a V_{max} da enzima imobilizada foi um pouco inferior da enzima livre, 60 e 71 U/mg de proteína, respectivamente. Os autores atribuíram esse comportamento a uma limitação difusional do substrato resultante da presença do suporte de imobilização.

Shen e Xia (2004) imobilizaram os esporos de *A. niger* ZU 07 contendo celobiase em alginato de cálcio. Os autores estudaram a fermentação do fungo em meio de cultivo composto de sabugo de milho triturado, farelo de trigo, e os sais KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2$ e verificaram que o nível máximo de formação de esporos e maior atividade de celobiase (438 IU/g substrato) era obtido após 72 h, indicando que a produção de celobiase estava relacionada com a formação de esporos. O tempo de meia – vida dos esporos imobilizados em alginato de cálcio armazenados em tampão citrato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,8 a 50°C foi de 38 dias. Os esporos imobilizados também foram bastante estáveis e eficientes na hidrólise de solução de celobiose 10 g/L após 10 ciclos. Foi testada também a hidrólise de resíduos de palha de milho pré-tratada com ácido e os resultados foram comparados com celulase de *Trichoderma reesei*. O desempenho da celobiase imobilizada em alginato foi superior ao da celulase de *Trichoderma reesei* sendo que a concentração de açúcares redutores foram 48,5 e 58,78 g/L, respectivamente. Os autores atribuíram essa melhora no desempenho a hidrólise da celobiose que atua como inibidor das enzimas celulolíticas. Além disso, esse resultado é bastante relevante para conversão e utilização de biomassa como fonte renovável.

Tu et al. (2006) imobilizaram a enzima comercial β -glicosidase de *A. niger* (Novozyme 188) em Eupergit C durante 36 h na presença de 1% de glicose e

1% de albumina de soro bovino (BSA), para promover a ligação multipontual. Os autores avaliaram a enzima imobilizada na presença e ausência destes aditivos e concluíram que a amostra sem os aditivos apresentou a taxa mais baixa de imobilização e atribuíram a inativação da enzima pela interação dos grupos oxirano da Eupergit C com o sítio ativo da enzima. Quando a glicose foi adicionada, a taxa de imobilização aumentou 20% e os autores atribuíram esse comportamento ao fato de a glicose ser um inibidor competitivo da β -glicosidase e atuar protegendo o sítio ativo da enzima durante a imobilização. Quando a enzima foi imobilizada e tratada com glicose e BSA, a taxa de imobilização aumentou em 30%, pois segundo os autores, o BSA bloqueou os grupos oxirano residuais. A enzima imobilizada em Eupergit C promoveu o aumento da estabilidade da enzima a 65°C quando comparada com a enzima livre, e ambas não foram estáveis a 85°C. O perfil de pH não foi alterado para a enzima imobilizada, porém o valor de K_M aumentou, sendo 1,1 mM para enzima livre e 11 mM para enzima imobilizada e V_{max} aumentou de 296 para 2430 mol/mg/min. O efeito da β -glicosidase imobilizada na hidrólise de substratos lignocelulósicos e celulósicos foram comparados com a enzima livre utilizando-se a mesma quantidade de proteína. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi demonstrada durante seis ciclos para a hidrólise de lignocelulose (Tu et al., 2006).

A eficácia da imobilização com Eupergit C está relacionada com sua capacidade de estabelecer ligações multipontuais o que estabiliza a estrutura tridimensional a elevadas temperaturas (Figura II – 1) (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000; Mateo et al., 2000).

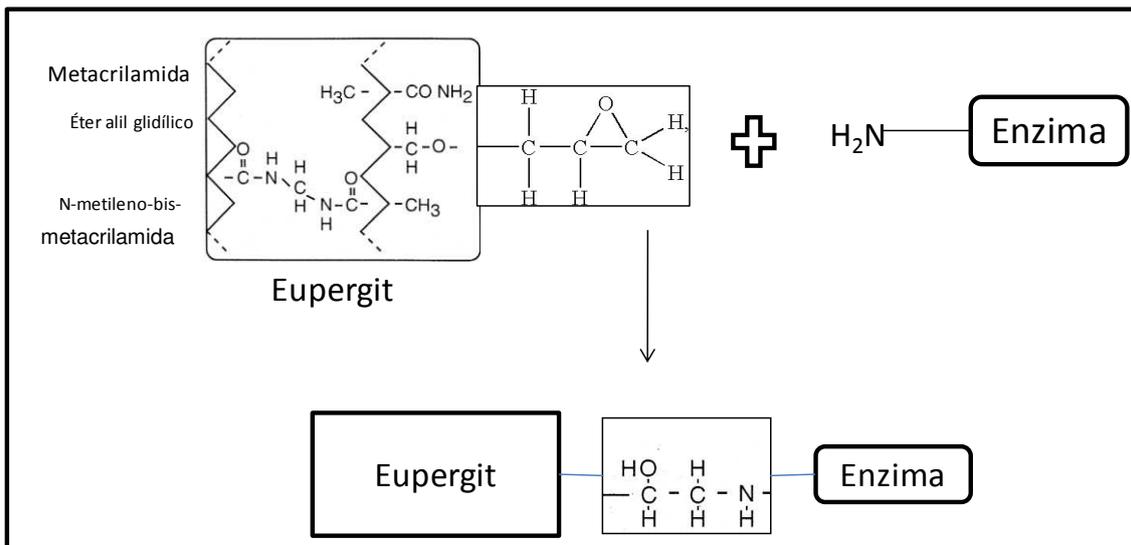


Figura II - 1: Estrutura da Eupergit e imobilização covalente com a enzima *

*Figura adaptada a partir de Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000

Chang e Juang (2007) estudaram o uso de esferas compostas de argila e quitosana para a imobilização de β -glicosidase de amêndoas, uma preparação comercializada pela Sigma. Os autores compararam os parâmetros de carga inicial de enzima (10 – 50 mg/g de quitosana), tempo de imobilização (3 – 24 h), tempo de ligação cruzada com glutaraldeído (30 – 210 minutos) e concentração de glutaraldeído (0,5 - 10 g/L) para esferas compostas por quitosana e argila denominadas secas, pois após sua confecção permaneceram em liofilizador durante 6 h e as esferas compostas denominadas úmidas, pois não passaram pela etapa de secagem e para esferas contendo somente quitosana. Os autores verificaram que a atividade aumentou com o aumento da carga inicial de β -glicosidase até 30 mg/g de quitosana, sendo que as esferas compostas secas apresentaram atividade aproximadamente 2 vezes maior que as esferas úmidas. Foi observado também que as esferas compostas secas possuem maior espaço interior para comportar a enzima, tendo sido escolhido o tempo de imobilização de 18 h. A concentração de glutaraldeído mais adequada para as esferas compostas

secas e úmidas foram 1 e 4 g/L, respectivamente. Os autores verificaram que a enzima livre perdeu 85% da atividade inicial durante o armazenamento a 4°C durante 60 dias, enquanto as esferas úmidas e secas apresentaram atividades 4,9 e 10,4 maiores quando comparadas a enzima livre, respectivamente.

Existe um grande número de trabalhos de oclusão de biocatalisadores utilizando alginato de sódio descritos na literatura, porém a estabilidade mecânica do gel de trabalho é baixa quando as esferas são empregadas em reatores submetidos a alta agitação e, além disso, o cálcio da matriz de trabalho pode ser facilmente carregado principalmente trabalhando em meios contendo tampão fosfato ou citrato, causando a ruptura da esfera. Outro fator que pode dificultar sua utilização é a necessidade de se trabalhar em condições estéreis, pois o alginato é uma matriz muito facilmente biodegradável e susceptível a contaminações microbianas (Jahnz et al., 2001).

O uso de matrizes de álcool-polivinílico (PVA) também tem se mostrado adequado para preparar partículas estáveis química e mecanicamente, fornecendo uma alternativa adequada para superar as desvantagens dos polímeros naturais mantendo os benefícios inerentes ao seu uso (El-Hadi, 2003; Schlieke e Vorlop, 2006).

Muitos métodos tem sido desenvolvidos para formar hidrogéis a partir de álcool-polivinílico (PVA), através de congelamento-descongelamento, irradiação ou ligação química cruzada. Uma abordagem diferente, a qual tem aplicação comercial, depende da secagem controlada do hidrogel de PVA (Líquido de Lentikats[®]) e subsequente estabilização química, promovendo a formação de partículas com formato de lentes (Figura II - 2) (Ding e Vorlop, 1995; Vorlop e Jekkel, 1999). É válido ressaltar que esta técnica já foi validada para utilização em indústrias alimentícias e farmacêuticas (Lentikat's Biotechnologies).

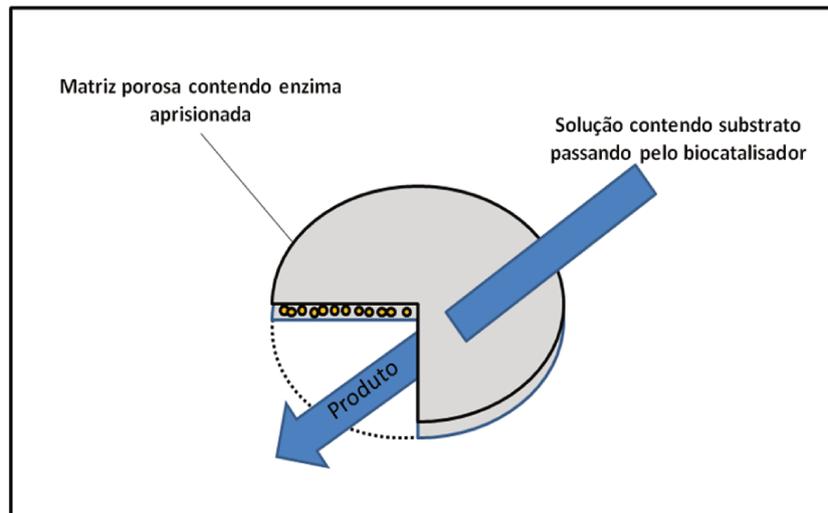


Figura II - 2: Ilustração do sistema de imobilização pelo método de Lentikats[®]

*Adaptada Lentikat's biotechnologies, 2011.

Fernandes et al. (2009) estudaram a imobilização de inulinase em partículas de PVA através da extrusão de líquido Lentikats[®] (Genialab) em polietileno glicol (PEG). Os autores concluíram que o método foi adequado para a imobilização de enzimas e sugerem haver potencial para aplicação em processos de larga-escala, sugestão reforçada pelo trabalho de Bieler et al. (2010), que apresentaram um método automatizado para a produção de enzimas imobilizadas em PVA na presença de PEG.

Segura et al. (2003) compararam os métodos de Lentikats[®] através de secagem controlada e alginato de cálcio através de gelificação iontrópica para encapsulação da enzima dextranasacarase. Os autores concluíram que os hidrogéis de Lentikats[®] foram mecânica e quimicamente estáveis, resistentes a biodegradação e foram facilmente separados do meio de reação por filtração. Os autores ainda recomendaram o seu uso em reatores de leito fluidizado ou colunas empacotadas.

Uma técnica relativamente recente para a imobilização de enzimas baseia-se num processo de sol-gel, que permite a síntese de matrizes de sílica à

temperatura ambiente, devidamente modificado para excluir condições adversas que possam causar a desnaturação da enzima (Avnir et al., 2006).

O grupo de Avnir et al. (1994) ampliou o uso da técnica de imobilização em sol-gel para uma ampla gama de enzimas como a fosfatase, tripsina, aspartase, glicose oxidase, anidrase carbônica, quitinase e monoamina oxidase.

O processo de formação do sol-gel é uma técnica bem estabelecida e consiste na hidrólise de precursores adequados em solução aquosa para produzir monômeros hidroxilados, ocorrendo uma polimerização e separação de fases formando metais hidratados ou hidrogel de óxido de semi-metal. Após a remoção da água do gel hidratado, o que leva frequentemente a mudanças na porosidade e estrutura do gel trabalho, resulta em um xerogel poroso. O precursor utilizado mais comumente são os alquil-alcoxi siloxanos, pois são bastante reativos em água (Figura II – 3) (O’Neil et al., 2002).

As características e propriedades de um sol-gel de trabalho especialmente inorgânico está relacionada com o número de fatores que afetam a taxa de hidrólise e reações de condensação, como pH, temperatura e tempo de reação, concentração de reagentes, temperatura de maturação, tempo e taxa final de umidade (Brinker e Scherer, 1990).

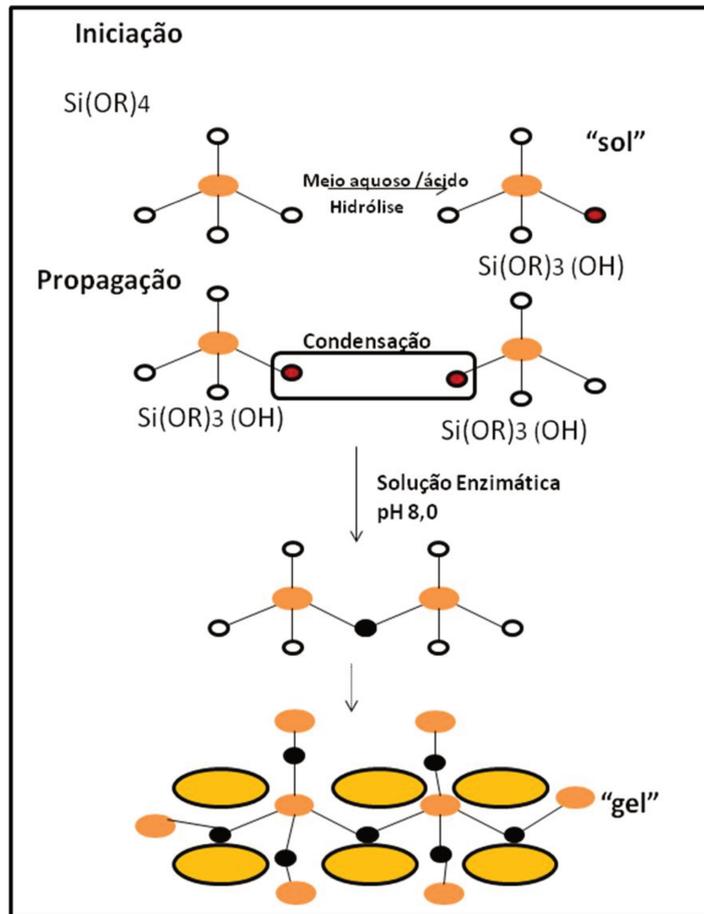


Figura II - 3: Técnica de imobilização de enzimas por sol-gel *

*Figura adaptada de Noguer et al., 2002

Estes materiais oferecem as mesmas propriedades favoráveis que as matrizes tradicionais baseadas em sílica. Além disso, a quantidade de enzima que pode ser imobilizada não é limitada pela superfície de área disponível na matriz, porque a enzima também pode ser aprisionada dentro da matriz polimérica durante a sua formação, e se torna distribuída homogeneamente pelo material (Reetz et al., 1998).

Este método tem sido empregado para imobilização de enzimas, anticorpos e células (Avnir et al., 2006).

Pelo exposto, este trabalho visou a seleção de métodos para a imobilização da enzima β -glicosidase de *Aspergillus niger* LBA 02, caracterização da enzima imobilizada e com aplicação da enzima imobilizada em batelada e processo contínuo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção e obtenção do extrato enzimático

A enzima β -glicosidase foi produzida pela linhagem do fungo *Aspergillus niger* LBA 02 da coleção de cultura do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. O fungo foi cultivado em tubos de ensaio inclinados contendo Ágar Batata Dextrose e cobertos com vaselina durante armazenamento para manutenção.

O fungo foi espalhado em placas de petri contendo Ágar Batata Dextrose com auxílio de um cotonete esterilizado, e incubado durante 5 dias a 30°C. Discos de 10 mm de diâmetro foram retirados e utilizados como inóculo.

O meio de cultura utilizado para a produção da enzima foi preparado a partir de uma mistura de 95 g de farelo de trigo e 5 g de bagaço de cana-de-açúcar moído e 100 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e amostras de 20 g de meio de cultura foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 500 mL e estes foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. Quinze discos de 10 mm de diâmetro da cultura de *A. niger* LBA 02 foram inoculados em cada frasco Erlenmeyer contendo o meio de cultura farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. Os frascos Erlenmeyers foram incubados durante 5 dias a 30°C.

Para a extração da enzima foram adicionados 100 mL de água destilada aos frascos Erlenmeyers. Após agitação a 150 rpm durante 20 minutos a suspensão foi filtrada em papel de filtro. O filtrado foi utilizado como extrato enzimático bruto.

3.2 Determinação da atividade de β -glicosidase

3.2.1 Determinação da atividade de β -glicosidase utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil- β -glicosídeo (p-NPG)

A atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por Turan e Zhen (2005). Uma mistura de 300 μ L de solução 5 mM de *p*-nitrofenil- β -glicosídeo (p-NPG) em tampão acetato 0,05 M pH 4,5 foi incubada a 50°C por 5 minutos. Após a adição de 300 μ L de solução de enzima, a mistura foi incubada a 50°C por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de solução 0,5 M de Na₂CO₃. A hidrólise foi estimada pelo monitoramento da liberação de *p*-nitrofenol a 410 nm usando uma curva padrão de *p*-nitrofenol preparada de forma similar com 5 a 300 μ mol de *p*-nitrofenol. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio por grama de enzima.

3.2.2 Determinação da atividade de β -glicosidase utilizando-se o substrato celobiose

A atividade da enzima β -glicosidase utilizando-se o substrato celobiose foi determinada medindo-se a liberação de glicose usando o kit de glicose oxidase-peroxidase (Sigma).

A mistura de 300 μ L da solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e 300 μ L da solução de β -glicosidase 0,1 mg/mL foi incubada a 60°C por 30 minutos. Alíquotas de 40 μ L de amostra, previamente diluídas,

foram pipetadas nos poços de microplaca e em seguida foram adicionadas 80 μL de reagente de trabalho. As análises foram realizadas em triplicata. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos e a reação paralisada pela adição de 80 μL de solução de H_2SO_4 6M. A absorbância da solução foi medida em leitor de ELISA a 540 nm. Utilizou-se uma curva padrão de glicose na faixa de 0,02 a 0,08 mg de glicose/mL. Uma unidade de β -glicosidase foi definida como μmol de glicose liberada por minuto por mL de enzima.

3.3 Concentração da enzima por precipitação com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto foi saturado com sulfato de amônio 80% e armazenado durante 15 h a 3°C. Em seguida o extrato foi centrifugado durante 10 minutos a 17000 x *g* e o precipitado foi ressuscitado em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 e dialisado. O extrato foi liofilizado durante 48 h e armazenado a 4°C. A atividade da enzima imobilizada foi determinada como descrito no item 3.2.1.

3.4 Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -glicosidase de *A. niger* LBA 02

3.4.1 Imobilização de β -glicosidase em álcool polivinílico (PVA) – lentes de Lentikats®

A imobilização da enzima foi realizada de acordo as instruções do fabricante (<http://www.genialab.de/download/tt-english.pdf>). O líquido de

Lentikats[®] (Genia Lab) foi aquecido a 95°C e em seguida resfriado até aproximadamente 40°C. Em um béquer foram adicionados 200 µL de suspensão de 0,1 mg/mL enzima (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5 e 2 mL de solução de Lentikats[®] a 40°C e em seguida a mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético.

A mistura foi transferida para uma seringa com agulha (20Gx2") e depositada na forma de gotas em placas de petri, previamente taradas. As placas de petri foram pesadas e armazenadas a 30°C em agitador orbital para desidratação das gotas. O teor de umidade final de 28% foi atingido após aproximadamente 2 h. Em seguida as lentes foram transferidas para um béquer contendo 100 mL de solução estabilizadora (15g/L) para curar as lentes durante 2 h.

As lentes PVA – Lentikats[®] foram então peneiradas e armazenadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5 durante 30 minutos. Após esse período, as lentes foram novamente peneiradas e armazenadas em um frasco contendo solução estabilizadora a 5°C. Alíquotas da solução estabilizadora e do tampão de lavagem foram recolhidas para determinação da atividade de β-glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.2 Imobilização de β-glicosidase em álcool polivinílico (PVA) – esferas de Lentikats[®]

O líquido de Lentikats[®] (Genial Lab) foi aquecido a 95°C e em seguida resfriado até aproximadamente 40°C. Em um béquer foram adicionados 200 µL de suspensão de 0,1 mg/mL de enzima (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5 e 2 mL de líquido de Lentikat[®] a 40°C e em seguida a mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético.

A mistura foi transferida para uma seringa com agulha (20Gx2”) e gotejada em um béquer contendo 100 mL da solução de PEG 600 (polietilenoglicol) sob agitação lenta durante 2 h. Em seguida as esferas foram peneiradas e lavadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5. As amostras foram armazenadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5 a 5°C durante 12 h para curar. Foram retiradas alíquotas de PEG 600 e do tampão de lavagem para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.3 Imobilização de β -glicosidase em alginato de cálcio

Em um béquer foram misturados 2 mL de solução 3% de alginato de sódio em tampão acetato 0,1M pH 4,5; e 200 μ L de suspensão de 0,1mg/mL de enzima (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5. A mistura foi transferida para uma seringa com agulha (20Gx2”) e gotejada em um béquer contendo de 100 mL de solução 0,3M de CaCl_2 . As cápsulas ficaram curando durante 2 h, com agitação lenta. Em seguida as cápsulas foram peneiradas, lavadas com tampão acetato 0,1M pH 4,5 e armazenadas no mesmo tampão a 5°C. Alíquotas de solução 0,3 M de CaCl_2 e do tampão de lavagem, foram recolhidas para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.4 Imobilização de β -glicosidase em gelatina

Alíquotas de 1g de gelatina (Merck 1.04078.1000) e 10 mL de tampão acetato 0,1M pH 4,5 foram aquecidas em béquer de 25 mL, utilizando-se placa de aquecimento até a solubilização da gelatina a 40°C. Em seguida alíquotas de 2 mL da solução de gelatina foram transferidas para um béquer de 10 mL,

onde adicionou-se 200 μ L de solução 0,1mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5. As misturas foram homogeneizadas com o auxílio de agitador magnético, transferidas para placa de petri e armazenadas a 5°C para solidificação durante aproximadamente 1 hora. Em seguida foram adicionados 4 mL de glutaraldeído 10% sobre a camada de gelatina para reticulação. As amostras foram armazenadas durante 1 h a 5°C. O sobrenadante foi removido e as amostras de gelatina foram cortadas em tamanhos homogêneos de aproximadamente 2 x 2 mm e armazenadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5 a 5°C.

Alíquotas do tampão de armazenamento foram recolhidas, para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.5 Imobilização de β -glicosidase em Amberlite IRC50 e IRC 86

Amostras de 1,0 g de Amberlite IRC50 e IRC 86 foram pesadas em tubos de ensaio e lavadas com aproximadamente 5 mL de água durante 5 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2600 x *g* durante 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e as amostras de resina foram lavadas com 5 mL de tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e novamente centrifugadas a 2600 x *g* durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. As amostras de resina foram tratadas com 2,5 mL de solução 10% de polietilenimina, com agitação a 150 rpm durante 2 h, a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2600 x *g* durante 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. As amostras de resina foram lavadas com 2,5 mL de água destilada, centrifugadas a 2600 x *g* durante 10 minutos e os sobrenadantes descartados.

As amostras de resina foram tratadas com 5 mL de solução 10% de glutaraldeído, seguindo-se de nova incubação durante cerca de 16 h a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 2600 x g durante 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados, as amostras de resina foram lavadas com tampão acetato 0,1M pH 4,5 e filtradas em papel de filtro. As amostras de resina Amberlite ativada e 1 mL de solução 0,1 mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) foram incubadas a 28-30°C em agitador orbital (200 rpm) durante 2h. Em seguida foram centrifugadas, os sobrenadantes reservados, e os precipitados lavados duas vezes com tampão acetato 0,1 M pH 4,5 como descrito anteriormente. As amostras de β -glicosidase imobilizada em Amberlite IRC50 e IRC 86 foram armazenadas a 4°C. Alíquotas dos tampões de lavagem foram recolhidas para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.6 Imobilização de β -glicosidase em Eupergit C e Eupergit 250L

Foram preparadas soluções 0,1 mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) em tampão acetato 1 M pH 4,5, tampão fosfato de sódio 1 M pH 5,5, e em tampão fosfato de sódio 1 M pH 6,0.

Amostras de 200 mg de Eupergit C e 250L foram lavadas com 5 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram centrifugados e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida foram adicionados 5 mL de solução 0,1mg/mL de enzima (13600 U/g) nas amostras de Eupergit C e 250L. Os tubos foram incubados a 28-30°C em agitador orbital a 200 rpm, diâmetro 25 mm, por 24 – 48 h. Amostras de 0,1 mL de sobrenadante foram retiradas em intervalos de 12 em 12 h e o teor de proteína nos sobrenadantes foi estimado pela medida da absorbância a 280 nm. Após a estabilização do valor da absorbância, os tubos foram centrifugados a 2600 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram recolhidos e os precipitados foram lavados com 5 mL de

tampão acetato 0,1M pH 4,5. Após centrifugação, os sobrenadantes foram recolhidos e as amostras de enzima imobilizada foram armazenadas a 4°C. Alíquotas dos tampões de lavagem foram recolhidas, para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.4.7 Imobilização de β -glicosidase em sol-gel

Tubos eppendorf contendo 100 μ L de tetrametoxisilano (TMOS) e 40 μ L de HCl 10 mM, foram incubados em banho ultrasonificador durante 10 minutos. Em seguida foram adicionados 160 μ L de solução 0,1 mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5. As misturas foram homogeneizadas e as amostras de 300 μ L foram transferidas rapidamente para tubos de ensaio contendo 6 mL de dioctil sulfocinato de sódio (AOT)/isooctano na proporção 1:15 (m/v), que foram homogeneizados com auxílio de um vortex durante alguns segundos. Os tubos de ensaio foram centrifugados a 2600 x *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram lavados mais duas vezes com tampão acetato 0,1M pH 4,5 e centrifugados para obtenção das amostras de enzima imobilizada.

Foi adicionado 1 mL de tampão acetato 0,1M pH 4,5 aos precipitados que em seguida foram transferidos para um eppendorf e centrifugados. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados armazenados em um recipiente fechado contendo solução salina (40% NaCl) para secagem em ambiente controlado de atividade de água ($A_w = 0,75$), durante 7 dias a temperatura ambiente.

O conteúdo dos tubos de eppendorf foram pesados, ressuspendidos em tampão acetato 0,1M pH 4,5 e armazenados a 5°C.

Alíquotas das amostras de solução de AOT/isoctano e dos tampões de lavagem foram recolhidas para determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com item 3.2.1 e cálculo da eficiência de encapsulação.

3.5 Avaliação do efeito da velocidade de agitação na atividade das amostras de β -glicosidase imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]

Tubos eppendorf contendo 10 mg de β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel em 300 μ L de tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e 300 μ L de solução 5 mM de p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG) em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 foram incubados com agitação magnética na faixa de 200 a 600 rpm, a 50°C durante 15 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 300 μ L de solução 0,5 M de Na₂CO₃. A atividade da enzima β – glicosidase foi determinada conforme descrito no item 3.2.1.

3.6 Teste de reutilização da β -glicosidase imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel utilizando-se substrato p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG)

Tubos eppendorf contendo 10 mg de β – glicosidase imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel em 300 μ L de tampão acetato 0,05 M, pH 4,5 e 300 μ L de solução 5 mM de p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG) em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 foram incubados com agitação magnética a 400 rpm, a 50°C durante 15 minutos. Após este intervalo, os tubos de eppendorf foram centrifugados a 17000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente para recuperação das enzimas imobilizadas. Alíquotas de 600 μ L de amostra foram transferidas para tubos eppendorf contendo 300 μ L de solução

0,5 M de Na_2CO_3 . A atividade da enzima β – glicosidase imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel foi determinada conforme descrito no item 3.2.1.

Amostras de β – glicosidase imobilizadas foram recuperadas por centrifugação e utilizadas sucessivas vezes para verificar a estabilidade da enzima como descrito acima.

3.7 Teste de reutilização da β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel utilizando-se substrato celobiose

Foi testada a reutilização da β – glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel utilizando o substrato celobiose 1,5 mM em tampão acetato 0,05 M pH 5,0.

Tubos de eppendorf contendo 7 mg de β -glicosidase imobilizada em sol-gel e em lentes PVA - Lentikats[®] e 2 mL da solução de celobiose 1,5 mM em tampão acetato 0,05 M pH 5,0, foram incubadas à 50°C, durante 24 h. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 40 μL e a quantidade de glicose foi determinada conforme o item 3.2.2. Os tubos de eppendorf foram centrifugados a 19000 x *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente para recuperação da enzima imobilizada e reutilização sucessivas vezes, como descrito, acima para determinar a estabilidade da enzima.

3.8 Determinação da eficiência de encapsulação da enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

A eficiência de encapsulação foi calculada através do balanço da atividade de β -glicosidase determinada conforme o item 3.2.1, nos sobrenadantes e soluções de lavagem.

3.9 Caracterização da enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

Foi estudado o efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima livre e imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]. Foi estudado o efeito da concentração dos substratos p-NPG e celobiose e do inibidor glicose na atividade da enzima livre e imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]. A morfologia e superfície das amostras de β -glicosidase imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

3.9.1 Estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel em soluções 5 mM do substrato sintético p-NPG em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 em temperaturas de 40°C a 80°C, como descrito no item 3.2.1. O efeito do

pH sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel em soluções 5 mM do substrato p-NPG em tampão acetato (pH 4,0 a 6,0), como descrito no item 3.2.1.

3.9.2 Efeito da concentração de substrato na atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

Foram testados os efeitos da concentração dos substratos p-NPG (0,5 a 10 mM) e celobiose (0,5 a 10 mM) na atividade da enzima β – glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel. A atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel nos substratos p-NPG e celobiose foi determinada respectivamente como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, a 60°C para a β -glicosidase livre e imobilizada em sol-gel e a 55°C para a β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e pH 4,5.

Os valores de K_M e V_{max} foram determinados pelos métodos gráficos de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf e pelo método não linear recorrendo à ferramenta Solver do Excel.

3.9.3 Determinação da temperatura e do pH de estabilidade da β -glicosidase livre e imobilizada lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

A temperatura de estabilidade foi determinada incubando-se tubos eppendorfs contendo 14 mg de β – glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel em 300 μ L de tampão acetato 0,05 M pH 4,5, em temperaturas na faixa de 40°C a 80°C. Alíquotas de 300 μ L foram coletadas

após 1 h, 2 h e 3 h de reação e a determinação da atividade foi realizada conforme item 3.2.1. Alíquotas de 300 μL de solução 0,1 mg/L de β -glicosidase livre(13600 U/g) também foram incubadas nas mesmas condições que as amostras de β – glicosidase imobilizadas para comparação dos resultados.

A partir dos valores de atividade residual obtidos durante a determinação da temperatura de estabilidade, foram determinados alguns parâmetros da β -glicosidase. Inicialmente, os dados do estudo da termoestabilidade enzimática foram ajustados graficamente em modelos de curvas teóricas para verificar o perfil da cinética de desnaturação enzimática. E foram calculados o tempo de meia-vida e a energia de desativação.

A estabilidade das amostras de β – glicosidase imobilizadas em foi determinada incubando-se tubos eppendorfs contendo 14 mg de β – glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel ressuspensos em 300 μL de tampão acetato 0,05 M na faixa de pH 4,0 - 5,0 à 55°C. Em diferentes intervalos alíquotas foram coletadas e a atividade residual determinada conforme item 3.2.1. Alíquotas de 300 μL de solução 0,1 mg/L de β -glicosidase (13600 U/g) também foram incubadas nas mesmas condições que as amostras de β – glicosidase imobilizadas para comparação dos resultados.

3.9.4 Efeito da concentração de glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

O efeito da concentração de glicose na atividade da β -glicosidase foi avaliado utilizando o substrato sintético p-NPG.

Alíquotas de 300 μL de solução 5 mM de p -nitrofenil- β -glicosídeo (p -NPG) em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 contendo glicose na faixa de concentração 0 a 100 mM foram incubadas a 50°C por 5 minutos. Após a adição de 300 μL de solução 0,1 mg/mL de enzima (13600 U/g), as misturas foram incubadas a 50°C por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 300 μL de solução 0,5M de Na_2CO_3 . A hidrólise de p -NPG foi estimada pelo monitoramento da liberação de p -nitrofenol a 410 nm usando uma curva padrão de p -nitrofenol.

3.9.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats®

A morfologia e superfície da enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel foram caracterizadas utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio utilizado foi JEOL modelo JSM 5800 LV (Toquio, Japão). As cápsulas foram liofilizadas durante 24 h e dispersas em fita adesiva dupla para fixação e depósito de ouro em *Sputter* (Balzer modelo SCP 050).

3.10 Cinética da hidrólise de celobiose em mini reator utilizando-se β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel

Em um mini reator (30 cm^3) encamisado contendo 10 mL de solução de celobiose 1,5 mM em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 foram adicionados 70 mg de enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel e em lentes PVA - Lentikats® a 60°C e 50°C, respectivamente, com agitação de 400 rpm. Foram retiradas

alíquotas de 200 μL em diferentes intervalos de tempo até 32 h para determinação do teor de glicose de acordo com item 3.2.2.

O mesmo procedimento foi realizado incubando-se 10 mL de solução de celobiose 1,5 mM em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 e 300 μL da solução de 0,001 mg/mL de enzima livre (13600 U/g) em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 a 60°C e 50°C, com agitação de 400 rpm. Foram retiradas alíquotas de 200 μL em diferentes intervalos de tempo até 32 h para determinação do teor de glicose.

3.11 Hidrólise de celobiose por processo contínuo utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®]

A conversão contínua de celobiose em glicose foi testada a 50°C em reator com capacidade de 1,0 cm^3 empacotado com enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®]. A solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,05 M pH 5,0, a 50°C foi adicionada no reator com fluxo de 0,3 mL/min com bomba peristáltica. Foram retiradas alíquotas de 200 μL em diferentes intervalos de tempo até 148 h para determinação do teor de glicose de acordo com item 3.2.2. Foi testada também a hidrólise ácida da celobiose. A mistura de 5 mL de celobiose 1,5 mM e 20 mL de H_2SO_4 12N, em um tubo de ensaio foi aquecida a 45°C por 10 minutos. Após incubação o pH foi ajustado para 4,5 e o teor de glicose foi determinado de acordo com item 3.2.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -glicosidase de *A. niger* LBA 02

A Figura II - 4 ilustra a porcentagem de atividade relativa das amostras de β -glicosidase imobilizadas em cápsulas PVA - Lentikats[®], lentes PVA - Lentikats[®], sol-gel, cápsulas de alginato de cálcio, gelatina, Amberlite IRC 86, Amberlite IRC 50, Eupergit C pH (4,5; 5,5 e 6,0) e Eupergit 250 L pH (4,5; 5,5 e 6,0).

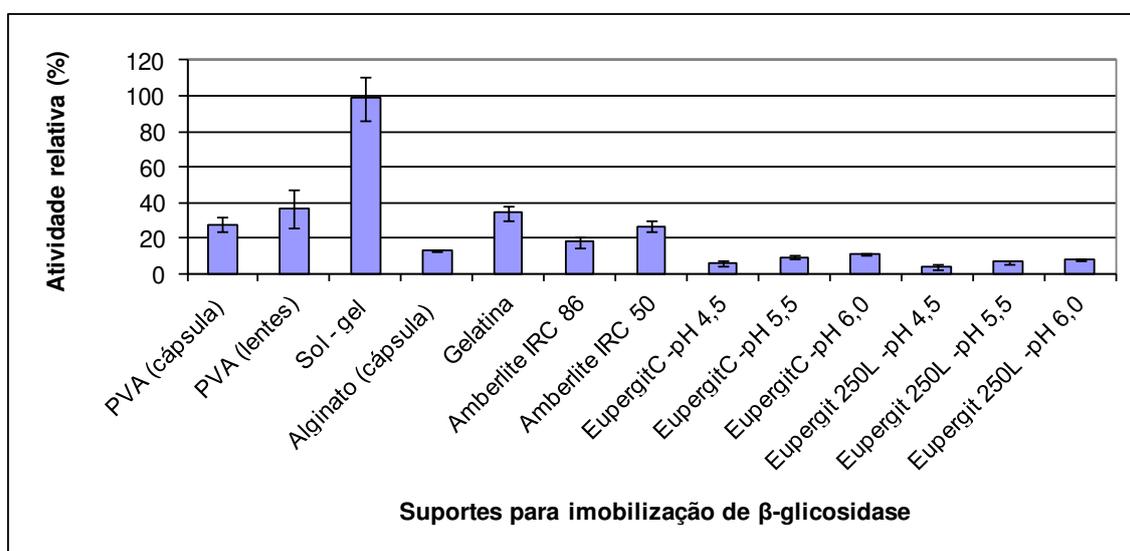


Figura II - 4: Porcentagem de atividade relativa das amostras de β -glicosidase imobilizadas em diferentes suportes

Foi obtida maior atividade relativa de β -glicosidase nas amostras de enzima imobilizada em sol-gel (85%), lentes PVA - Lentikats[®] (32%), gelatina (29%),

cápsulas PVA - Lentikats[®] (24%), Amberlite IRC 50 (23%), comparadas com a atividade de β -glicosidase inicial considerada como 100% (0,13 U/mL).

A imobilização em sol-gel oferece as mesmas propriedades favoráveis que as matrizes tradicionais baseadas em sílica. Além disso, a quantidade de enzima que pode ser imobilizada não é limitada pela área de superfície disponível na matriz, porque a enzima também é aprisionada dentro da matriz polimérica durante a sua formação, e se torna distribuída homogeneamente pelo material (Reetz et al.,1998).

Neste trabalho foi testada a imobilização da enzima β -glicosidase em Eupergit C e 250L, em pH 4,5; 5,5 e 6,0 com intuito de avaliar se o processo de ligação enzima/suporte era afetado pelo pH do meio reacional. A eficácia da imobilização de enzimas com Eupergit C tem sido relacionada com sua capacidade de estabelecer ligações multipontuais o que estabiliza a estrutura tri-dimensional a elevadas temperaturas (Katchalske-Katzi e Kraemer, 2000; Mateo et al., 2000). Contudo as amostras de β -glicosidase imobilizadas em Eupergit C e 250L, em pH 4,5; 5,5 e 6,0 apresentaram baixa atividade (3 a 10 % de atividade relativa).

Tu et al. (2006) imobilizaram a enzima comercial β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme 188) em Eupergit C. Os autores concluíram que a enzima quando imobilizada sem aditivos apresentou a taxa mais baixa de imobilização e atribuíram a inativação da enzima pela interação dos grupos oxirano da Eupergit C com o sítio ativo da enzima. Quando foi introduzida glicose, a taxa de imobilização aumentou 20%, e os autores atribuíram esse comportamento ao fato de a glicose ser um inibidor competitivo da β -glicosidase e atuar protegendo o sítio ativo da enzima durante a imobilização. Quando a enzima foi imobilizada com o aditivo glicose e depois tratada com albumina de soro bovino (BSA), a taxa de imobilização foi 30% superior, pois segundo os autores a BSA possui capacidade de bloquear os grupos oxirano residuais.

As amostras de β -glicosidase immobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] foram selecionadas para os testes posteriores.

4.2 Avaliação do efeito da velocidade de agitação na atividade das amostras de β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 immobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]

Foi estudado o efeito da velocidade de agitação na atividade de β -glicosidase immobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] para determinar as condições hidrodinâmicas que garantiriam a ausência de limitações externas à transferência de massa, por minimização da camada de fluido estagnante, adjacente às partículas de suporte.

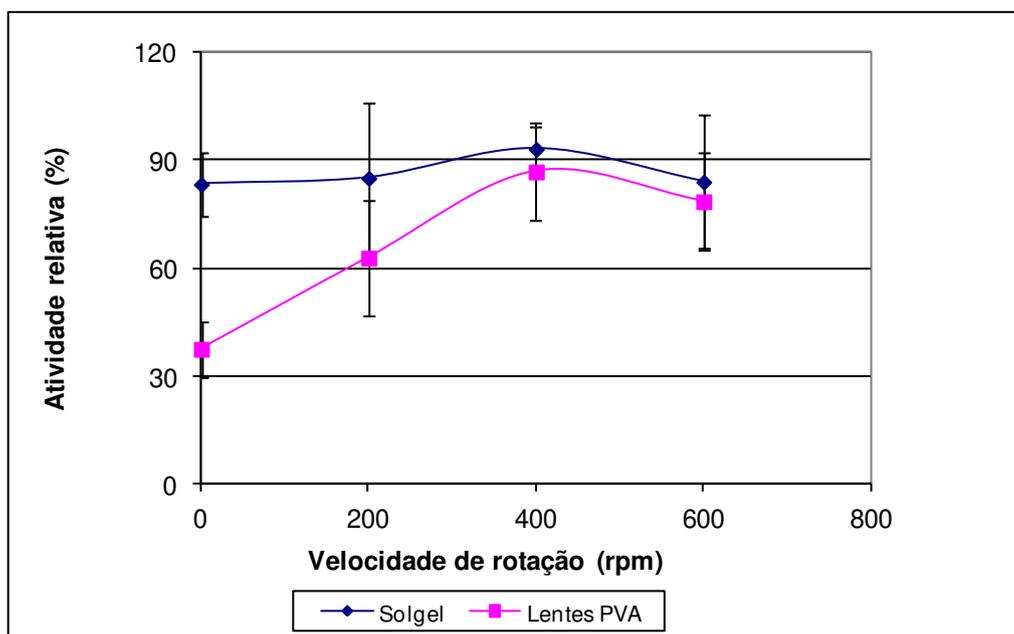


Figura II - 5: Efeito da velocidade de agitação na atividade de β -glicosidase immobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]

Observou-se que a velocidade de agitação mais adequada para as amostras de enzima imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] foi 400 rpm (Figura II - 5). A integridade física dos suportes não pareceu ser afetada nas condições hidrodinâmicas geradas. Assumiu-se que esta agitação seria igualmente válida para os suportes de gelatina. Os ensaios posteriores foram realizados com uma velocidade de agitação de 400 rpm, garantindo assim a minimização de resistências externas à transferência de massa.

4.3 Teste de reutilização da enzima β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 imobilizada em gelatina, lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel utilizando substrato p-nitrofenil- β -glicosídeo (p-NPG)

A Figura II - 6 mostra que a enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel manteve cerca de 65 a 90% da atividade relativa, utilizando-se o substrato p-NPG após 11 ciclos de 15 minutos de reação. O teste Tukey (nível de confiança de 95%) para os resultados apresentados das amostras de sol-gel evidenciou a existência de dois grupos de médias (A e B), entretanto o processo oscilou entre estes dois grupos durante os 11 ciclos, podendo o processo de reutilização da enzima imobilizada no suporte sol-gel durante os 11 ciclos ser considerado estável.

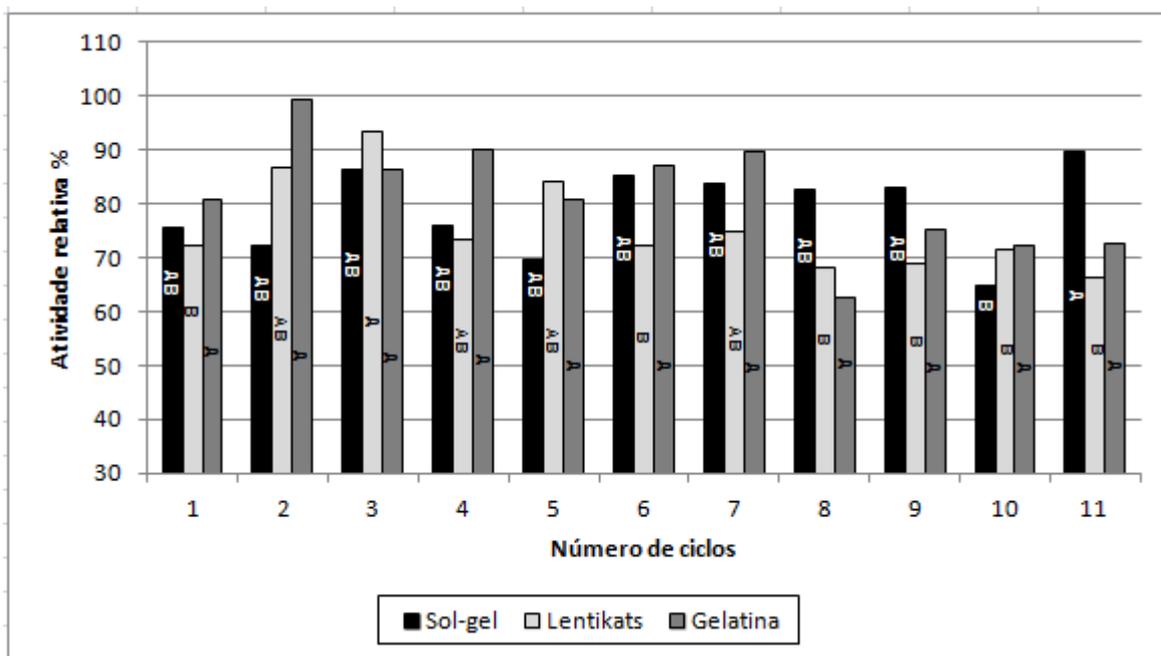


Figura II - 6: Estudo da reutilização de β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] e gelatina, utilizando-se substrato ρ -NPG, em processo de batelada.

* As letras são referentes ao teste de Tukey, comparando-se triplicatas.

A enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] manteve cerca de 66 a 93% da atividade relativa, utilizando-se o substrato ρ -NPG após 11 ciclos de 15 minutos de reação. Analisando o processo de reutilização da enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] pelo teste de Tukey com 95% de confiança, também foram identificados dois grupos de médias (A e B) sendo que até o sétimo ciclo o processo oscilou entre os dois grupos. A partir do oitavo ciclo notou-se que as médias se mantiveram constantes no grupo B, sugerindo uma possível queda na atividade relativa.

A enzima β -glicosidase imobilizada em gelatina manteve cerca de 72 a 99% da atividade relativa, utilizando-se o substrato ρ -NPG após 11 ciclos de 15 minutos de reação. Para a enzima imobilizada em gelatina após o teste de Tukey (nível de confiança de 95%) foi identificado somente um grupo de

médias (A) durante todo o processo, sugerindo que o processo foi estável durante os 11 ciclos.

A enzima imobilizada em sol-gel, lentes PVA - Lentikats[®], e gelatina se mostraram estáveis por 11 ciclos, porém para a enzima imobilizada em gelatina houve perda de massa durante os ciclos.

A reutilização de enzimas imobilizadas é importante para que o uso de enzimas seja economicamente viável. Além disso, a solução contendo o produto deve ser facilmente separada do suporte contendo a enzima imobilizada, nos reatores de processo em batelada ou contínuo (Goradia et al., 2005).

4.4 Teste de reutilização da enzima β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel utilizando substrato celobiose

A Figura II. 7 ilustra a reutilização da β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] testada em meio reacional contendo solução de celobiose 1,5 mM em tampão acetato 5 mM pH 5,0.

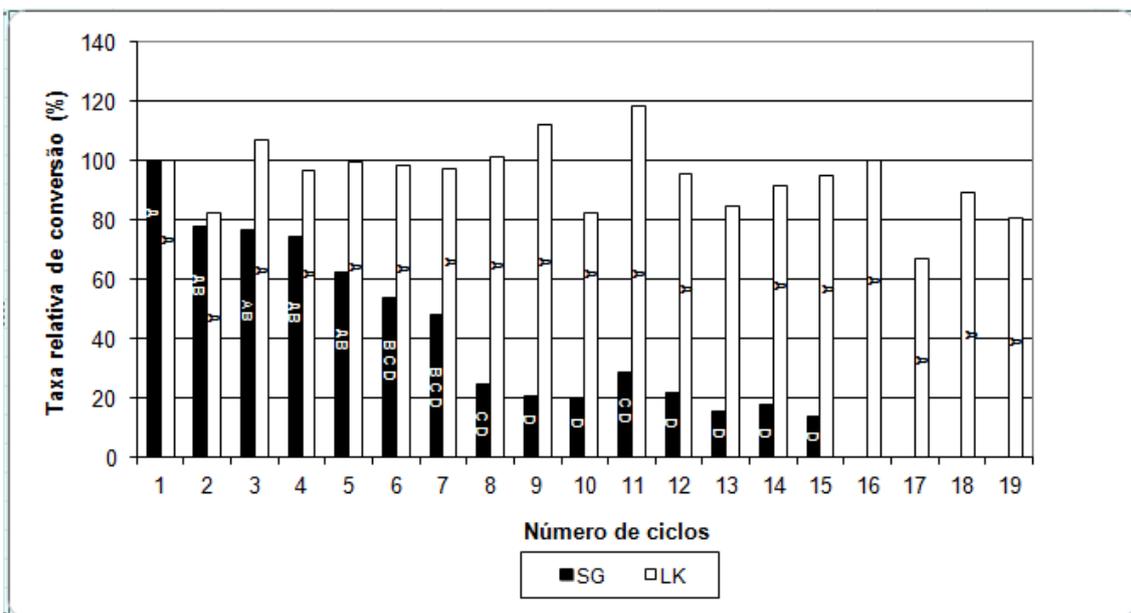


Figura II - 7: Estudo da reutilização de β -glicosidase imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats®, utilizando-se substrato celobiose, em processo de batelada.

* As letras são referentes ao teste de Tukey, comparando-se triplicatas.

A β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® apresentou maior estabilidade comparada com a enzima imobilizada em sol-gel, sendo que a primeira apresentou cerca de 80% de conversão de celobiose em glicose após 19 ciclos de 24 h. O teste de Tukey (nível de confiança 95%) constatou que o processo permaneceu estável durante os 19 ciclos de 24 h, ou seja, foi identificado somente um grupo de médias (A) durante todo o processo. Indicando que a conversão de celobiose em glicose permaneceu constante durante os 19 ciclos.

A β -glicosidase imobilizada em sol-gel apresentou alta taxa de conversão de celobiose em glicose nos quatro primeiro ciclos de 24 h, mas a conversão diminuiu para 20 e 15 %, nos ciclos 9 e 15, respectivamente. Analisando o processo de reutilização da enzima imobilizada em sol-gel pelo teste de Tukey com 95% de confiança, foram identificados quatro grupos de médias (A, B, C e D) sendo que até o quarto ciclo o processo oscilou entre os grupos A e B. A

partir do quinto ciclo notou-se que as médias oscilaram entre os grupos B, C e D, sugerindo uma variação durante o processo de conversão.

O comportamento apresentado pela enzima imobilizada em sol-gel pode ser atribuído a problemas operacionais como o carreamento do suporte durante as sucessivas retiradas de alíquotas, fazendo que a quantidade de suporte diminuísse após cada ciclo de reutilização.

4.5 Eficiência de encapsulação da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]

A eficiência de encapsulação da β -glicosidase nas lentes PVA - Lentikats[®] foi de 97% e para o sol-gel de 58%. Como a eficiência de encapsulação foi calculada através da atividade da enzima β -glicosidase com o substrato sintético p -NPG nos sobrenadantes e soluções de lavagem, há um indício que a imobilização em sol-gel não foi a mais adequada para retenção da enzima, havendo assim, um sub-aproveitamento da mesma durante a imobilização. Porém, dentre as metodologias avaliadas, a β -glicosidase imobilizada em sol-gel apresentou a atividade relativa mais elevada.

4.6 Caracterização da enzima β -glicosidase livre de *A. niger* LBA 02 e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

4.6.1 Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes - PVA Lentikats[®] e sol-gel

A β -glicosidase livre apresentou atividade ótima a 65°C em substrato p-NPG, sendo que a atividade da enzima diminuiu rapidamente em temperaturas superiores a 65°C. A atividade relativa da enzima livre a 70°C e 75°C reduziu para 40% e 25%, respectivamente (Figura II- 8).

As lentes PVA - Lentikats[®] contendo β -glicosidase imobilizada começaram a fundir na temperatura de 60°C. Este comportamento já foi observado por Rebros (2007) e impede o aquecimento das lentes PVA - Lentikats[®] a 60°C. Desta forma, 50°C foi fixada como temperatura de trabalho para as lentes PVA - Lentikats[®]. A 50°C, a β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] apresentou cerca de 50% da atividade relativa comparada com a atividade relativa de 100% da enzima livre a 65°C.

A enzima imobilizada em sol-gel mostrou atividade ótima (95 a 100%) na faixa de 60 a 65°C. Quando imobilizada em sol-gel, a β -glicosidase apresentou uma mudança no perfil de atividade quando incubada à temperaturas de 70 e 80°C. Para a enzima livre, a atividade relativa da enzima livre foi 40% e 9% à temperaturas de 70 e 80°C, respectivamente, ao passo que a enzima imobilizada em sol-gel reteve 85% e 65% de atividade relativa nas respectivas temperaturas.

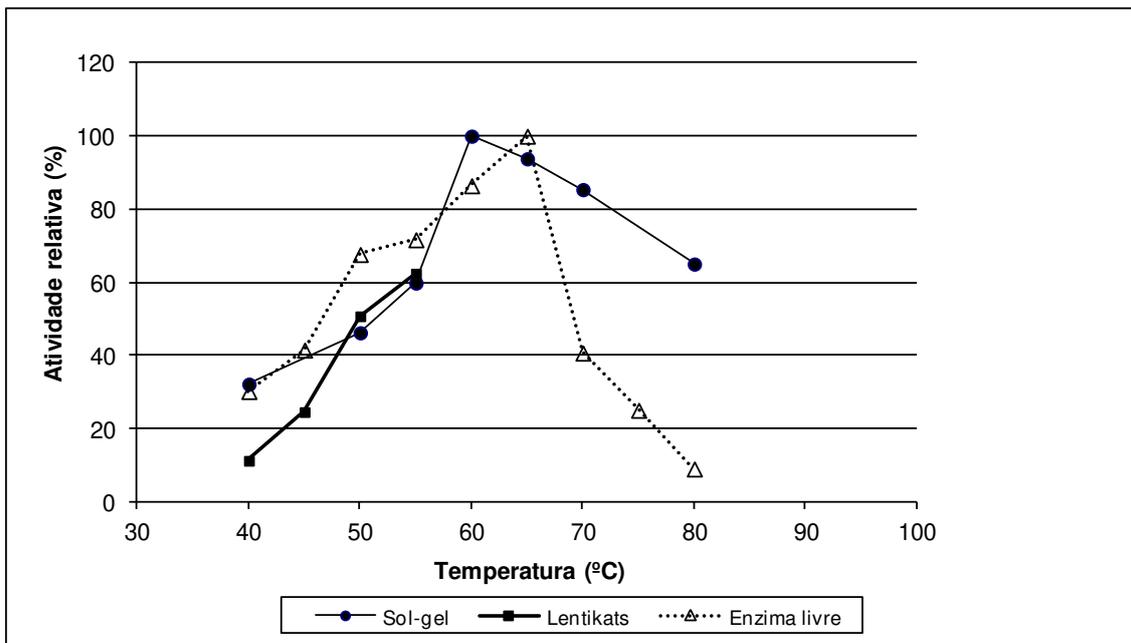


Figura II - 8: Efeito da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada em sol - gel e lentes PVA - Lentikats®

Yan e Lin (1997) relataram que a β -glicosidase de *A. niger* CCRC 31494 apresentou atividade ótima a 55°C.

Segundo Abdel-Naby (1993), a imobilização pode afetar a flexibilidade conformacional da enzima, aumentar a rigidez, refletindo num aumento da estabilidade da enzima à desnaturação com o aumento da temperatura.

A imobilização da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 em sol-gel e lentes PVA - Lentikats® não alteraram o perfil de pH da atividade enzimática quando comparados com a enzima livre. As três formas da enzima apresentaram atividade ótima em pH 4,5. As amostras de β -glicosidase imobilizadas em sol-gel e lentes PVA - Lentikats® apresentaram um aumento de cerca de 20% e 10 % na atividade relativa em pH 6,0, comparada com a enzima livre (Figura II - 9).

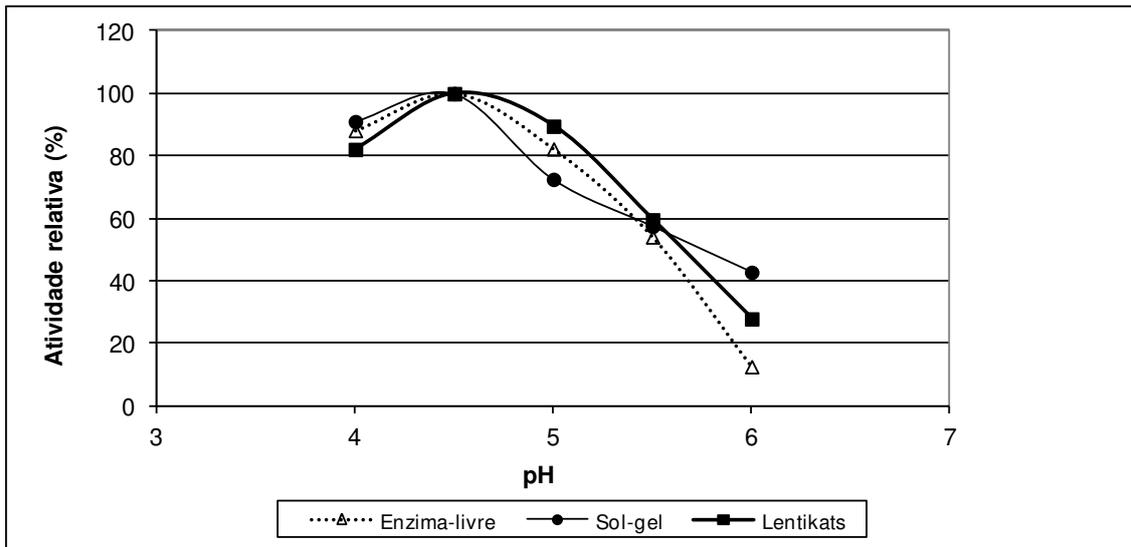


Figura II - 9: Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada pelo método de sol-gel e lentes - PVA Lentikats®

Abdel-Fattah et al. (1997) estudaram a imobilização de celobiase de *A. niger* 20 em quitosana e poliacrilamida e também verificaram que o pH ótimo de atividade não foi alterado com a imobilização, sendo observado maior atividade na faixa de pH 4,5-5,0.

Bedani (2010) produziu e caracterizou a enzima β -glicosidase produzida por *Aspergillus* sp. por fermentação semissólida contendo farelo de trigo e casca de maracujá. A enzima apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C, estabilidade na faixa de pH 3,0 – 8,5 após 2 h de incubação a 60°C.

4.6.2 Efeito da concentração de substrato na atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel

A Tabela II - 1 ilustra os valores de K_M e V_{max} determinados pelos métodos gráficos de Lineweaver-Burk e de Hanes-Woolf e pelo método não linear recorrendo à ferramenta Solver do Excel. O método de Hanes Wolf foi utilizado com o intuito de eliminar os efeitos estatísticos para baixas concentrações de substrato que condicionam os dados extraídos dos estudos cinéticos usando a linearização de Lineweaver-Burk (Nguyen et al., 2011).

Tabela II - 1: Parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) da enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel determinados com o substrato sintético p-NPG

Biocatalisador	Lineweaver-Burk		Hanes-Woolf		Solver	
	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)
Enzima livre	1,4	0,02	1,54	0,02	1,6	0,02
β -glicosidase imobilizada em sol-gel	5,0	0,44	8,06	0,2	7,33	0,63
β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats®	12,0	0,27	6,14	0,58	4,16	0,17

Os valores de K_M da β -glicosidase imobilizada em sol-gel (5,0; 8,06 e 7,33 mM de p-NPG) e da β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® (12,0; 6,14 e 4,16 mM de p-NPG), estimados pelo método de Lineweaver - Burk, Hanes - Woolf e Solver, respectivamente, foram maiores que os valores estimados para a enzima livre (1,4; 1,54 e 1,6 mM de p-NPG), sugerindo que a imobilização diminuiu a afinidade da enzima pelo substrato.

Aumento do K_M similar já foi relatado para β -glicosidases imobilizadas em outros suportes (Levitsky et al., 1999). Os autores atribuíram esse comportamento a alteração da estrutura tri-dimensinal e limitações de transferência de massa.

Bedani (2010) estudou o efeito da concentração do substrato p -NPG na atividade da enzima β -glicosidase produzida por *Aspergillus* sp. Os valores de K_M e V_{max} foram 3,41 mM e 72,46 μ mol p -nitrofenol /mL, respectivamente.

Tu et al. (2006) imobilizaram a enzima comercial β -glicosidase de *A. niger* (Novozyme 188) em Eupergit C, e verificaram que os valores de K_M foram quase 10 vezes mais elevados para a enzima imobilizada do que para a enzima livre sendo 1,1 e 11 mM, respectivamente.

Segundo Grosová et al. (2008) apesar da natureza porosa dos suportes, o aumento do K_M é tipicamente observado após a imobilização das enzimas.

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação da β -glicosidase livre e imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] também foi testado com o substrato celobiose (Tabela II.2).

Tabela II - 2: Parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) da enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel determinados com o substrato celobiose

Biocatalisador	Lineweaver-Burk		Hanes-Woolf		Solver	
	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max} (mM L ⁻¹ min ⁻¹)
Enzima livre	1,69	0,05	0,97	0,04	0,92	0,04
β -glicosidase imobilizada em sol-gel	1,01	0,07	1,25	0,07	1,14	0,07
β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	3,61	0,03	2,7	0,03	3,03	0,03

Os valores de K_M da β -glicosidase imobilizada em sol-gel estimados em 1,01; 1,25 e 1,14 mM de celobiose, a 60°C, pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver foram similares aos valores obtidos para a enzima livre (1,69; 0,97 e 0,92 mM de celobiose), respectivamente, indicando que não houve alteração da afinidade da enzima pelo substrato celobiose, com a imobilização. Os valores de K_M da enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] estimados em 3,61; 2,7 e 3,03 mM de celobiose a 50°C, pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver foram maiores que os valores obtidos para a enzima livre (1,69; 0,97 e 0,92 mM de celobiose), sugerindo uma diminuição da afinidade da enzima imobilizada pelo substrato, devido a limitações na transferência de massa.

Os valores de K_M obtidos com o substrato sintético foram muito superiores aos valores obtidos utilizando a solução de celobiose como substrato, indicando que a enzima livre e imobilizada de *Aspergillus niger* LBA 02 possuem mais afinidade pela celobiose.

Tabela II - 3: Valores de F-test resultantes da análise dos dados obtidos pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver

	Enzima livre	β - glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	β - glicosidase imobilizada em sol-gel
Modelo (Solver)	0,938	0,951	0,999
Lineweaver-Burk	0,758	0,820	0,941
Hanes-Wolf	0,927	0,976	0,965

Os valores de F-test obtidos após análise dos gráficos de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf e da ferramenta Solver indicam que dentre os 3 métodos

utilizados para determinar K_M e V_{max} , o que representa melhor os valores é o método de Solver ferramenta do Excel (Tabela II – 3).

4.6.3 Efeito da concentração de glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel

A β -glicosidase livre e imobilizada de *Aspergillus niger* LBA 02 em sol-gel e lentes PVA – Lentikats® apresentaram 50% de inibição na presença de glicose 17, 16 e 11 mM (Figura II - 10).

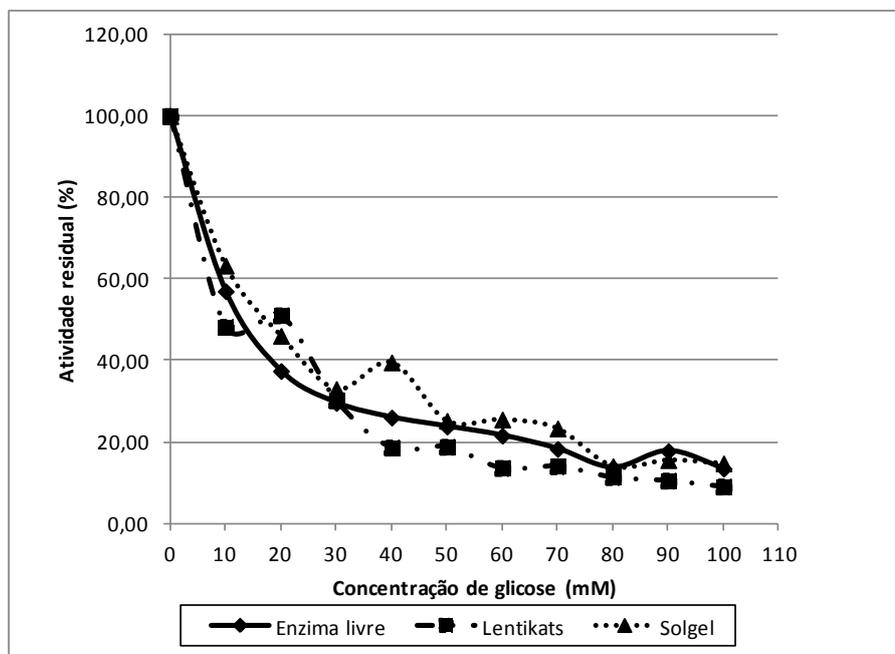


Figura II - 10: Efeito inibitório da glicose na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats® e sol-gel, utilizando-se substrato p-NPG

Este comportamento foi evidenciado através da análise dos valores aparentes de IC_{50} , que é a medida da concentração do inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática para metade do valor observado na ausência do

inibidor, mantendo as restantes condições idênticas. Os valores sugerem que a atividade da enzima imobilizada foi inibida pela glicose da mesma forma que a enzima livre.

Tabela II - 4- Efeito da imobilização na inibição da β -glicosidase pela glicose, expresso por valor IC'_{50}

Enzima	IC'_{50} (mM)
Enzima livre	17
Imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	11
Imobilizada em Sol-gel	16

Os valores IC'_{50} foram determinados pela Eq. 1 (Wu et al., 2003),

$$\text{Atividade relativa (\%)} = \frac{IC'_{50}}{[Glicose] + IC'_{50}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Após linearização computacional da inclinação da reta, de acordo com a Eq. 2

$$\frac{1}{\text{Atividade relativa (\%)}} = [Glicose] \times \frac{1}{IC'_{50}} + 1 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os processos de imobilização geralmente são conhecidos por reduzir a inibição enzimática (Mateo et al., 2004). Entretanto, de acordo com o teste de Tukey (95% de confiança) não foi observada diferença entre a atividade da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 imobilizada por sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] e a enzima livre, ou seja, a imobilização não diminuiu o efeito inibitório da glicose.

Chauve et al. (2010) compararam os parâmetros cinéticos de duas β -glicosidases produzidas por *A. niger* e *Trichoderma reesei* e o efeito da temperatura e da concentração de celobiose e glicose na atividade da enzima β -glicosidase. Os autores observaram que a enzima β -glicosidase de *T. reesei* foi menos inibida pela glicose do que a β -glicosidase de *A. niger*. As enzimas foram inibidas a partir da concentração de 11 mM.

4.6.4 Determinação do pH e da temperatura de estabilidade da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats® e sol-gel

A Figura II - 11 ilustra que a enzima livre e imobilizada em sol-gel retiveram cerca de 90% de atividade residual após 3 h de incubação a 40°C e cerca de 50% após 3 h a 60°C. A β -glicosidase imobilizada em sol-gel reteve cerca de 10% de atividade após 3 h a 70°C enquanto a enzima livre foi inativada após 1 hora a 70°C. Em geral, a imobilização em suportes tem efeito protetor aumentando a estabilidade térmica das enzimas. A flexibilidade conformacional da enzima pode ser alterada com a imobilização. Os passos de imobilização podem causar um aumento da rigidez da enzima, conferindo maior estabilidade pela desnaturação em temperaturas elevadas (Abdel-Naby, 1993).

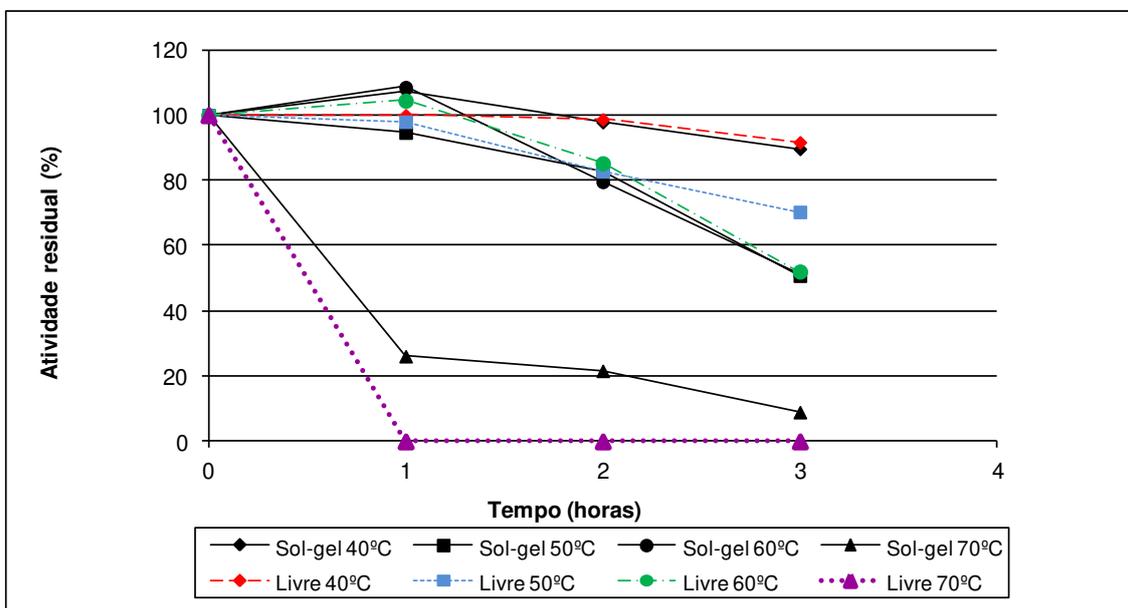


Figura II - 11: Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada em sol-gel

A Figura II - 12 mostra que a β -glicosidase immobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] apresentou-se mais estável do que a enzima livre, após três horas de tratamento na faixa de 45 a 55 °C. Após 3 h de incubação a 55°C, a enzima immobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] reteve cerca de 85% de atividade residual, enquanto que a enzima livre reteve cerca de 62% de atividade residual.

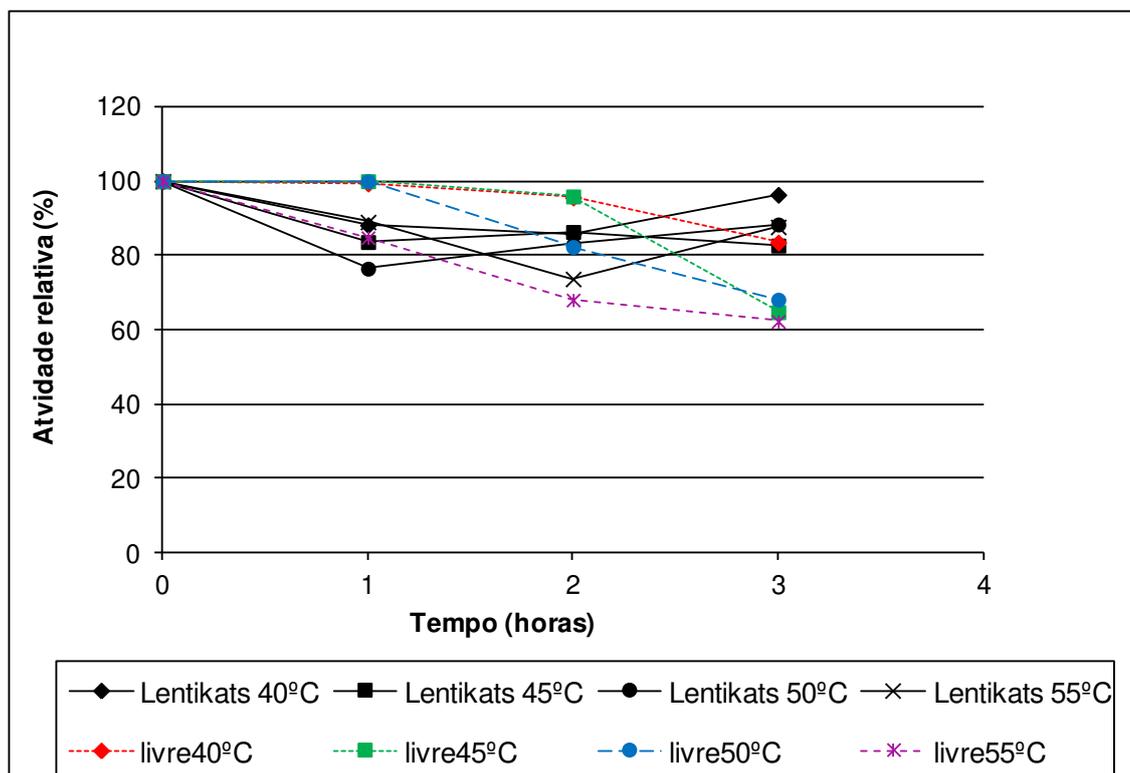


Figura II - 12: Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e immobilizada em lentes PVA – Lentikats[®]

Figueira et al. (2011) verificaram que a immobilização da β – glicosidase de *A. niger* LBA 02 em lentes PVA-Lentikats[®] e sol-gel aumentou o pH e a temperatura de estabilidade da enzima.

Tu et al. (2006) immobilizaram a enzima β -glicosidase comercial de *A. niger* (Novozymes 188) em Eupergit C e observaram que a enzima livre e immobilizada

foram estáveis a temperatura de 45°C sem perda significativa da atividade. Entretanto, a 65°C, a estabilidade da enzima imobilizada foi muito superior a enzima livre. Os autores atribuíram o aumento da estabilidade ao fato da Eupergit C fazer ligações multi-pontuais, o que pode favorecer a estabilidade da estrutura terciária da enzima β -glicosidase em temperaturas elevadas.

A Tabela II-5 mostra que o tempo de meia-vida da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 imobilizada por sol-gel e em lentes PVA - Lentikats[®] aumentou quando comparadas com a enzima livre, evidenciando que houve um pequeno aumento da estabilidade térmica após a imobilização. O tempo de meia vida para a enzima imobilizada em sol-gel a 70°C foi 0,88h (Tabela II-5) enquanto que a enzima livre foi inativada após 1 hora a 70°C (Figura II-11).

Os resultados obtidos sugerem que a imobilização atenua o efeito do aumento de temperatura sobre a conformação da enzima, em particular o aumento de movimento que induz alterações da sua estrutura. Este fenômeno pode ter conferido maior rigidez à estrutura da enzima em função de interações com o suporte.

Tabela II - 5: Tempo de meia-vida da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

Temperatura °C	Valor de tempo de meia-vida (h)		
	Enzima livre	Enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats [®]	Enzima imobilizada em sol-gel
40	8,0	15,0	11,0
45	2,9	9,3	ND
50	ND	7,7	4,3
55	3,6	4,9	ND
60	1,5	ND	1,7
70	0	ND	0,88

ND: Não determinada

A enzima imobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] mostrou-se mais estável na faixa de pH 4,0 a 5,0 do que a enzima livre (Figura II - 13).

A β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] mostrou-se mais estável em pH 4,0 e pH 4,5 retendo cerca de 90% de atividade relativa após 3 h de incubação a 55°C, entretanto, em pH 5,0, reteve cerca de 65% de atividade residual.

A enzima imobilizada em sol-gel apresentou cerca de 55% a 75% de atividade residual após 3 h de incubação a 55°C na faixa de pH 4,0 a 5,0. Enquanto a enzima livre apresentou atividade residual de cerca de 10% a 25%, nas mesmas condições de ensaio.

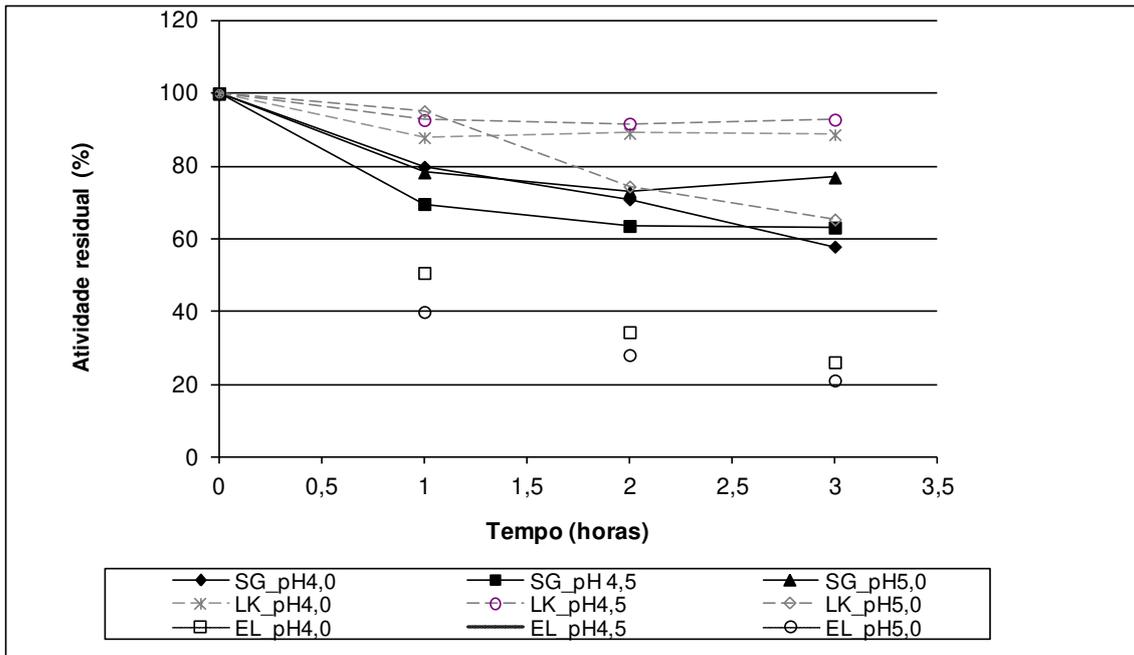


Figura II - 13: pH de estabilidade da β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 livre e immobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e em sol-gel, a 55°C (SG: sol-gel; LK: Lentikats; EL: Enzima livre)

4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da enzima β -glicosidase immobilizada em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®]

As Figuras II - 14a e II - 14b ilustram a superfície das amostras de β -glicosidase immobilizadas em lentes PVA - Lentikats[®], com aumento de 700x e 3000x, respectivamente, analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Enquanto que as Figuras II - 14c e II - 14d mostram a superfície das amostras de β -glicosidase immobilizadas em sol-gel, com aumento de 100x e 500x, respectivamente. A amostra de β -glicosidase immobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] apresentou superfície mais porosa do que a amostra de β -glicosidase immobilizada em sol-gel. De acordo com estas características, as limitações de difusão seriam bem menores para as Lentikats[®] do que para o sol-gel, porém outros fatores como a difusividade ou caminho de difusão

devem ser considerados. No caso das Lentikats[®], o caminho de difusão (axial), de 100 a 200 μm , é maior do que no sol-gel (Schlieker e Vorlop, 2006). Por outro lado, a estrutura mais porosa das lentes PVA Lentikats[®] é mais susceptível a fuga de enzima.

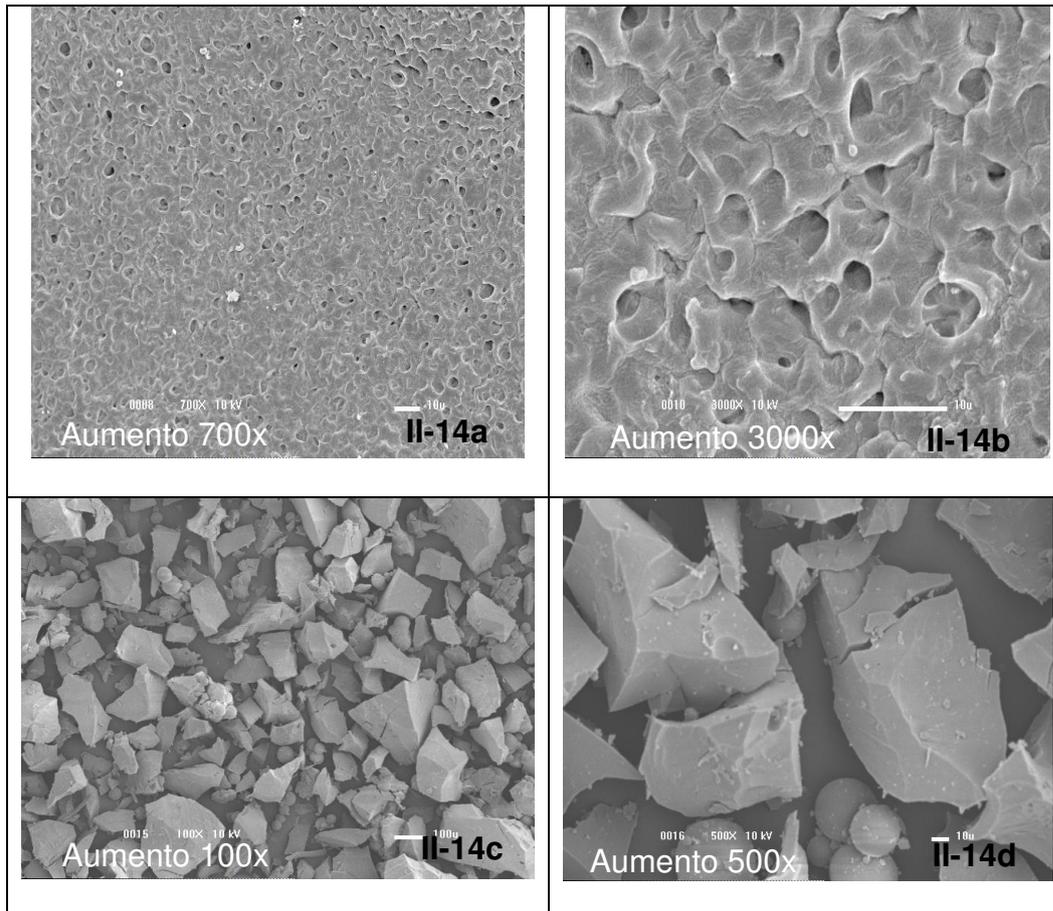


Figura II - 14: β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] com aumento 700x (a) e aumento 3000x (b); β -glicosidase imobilizada com sol-gel com aumento 100x (c) e aumento 500x (d).

4.7 Cinética da hidrólise de celobiose em mini reator utilizando enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel

A Figura II – 15 ilustra a hidrólise da solução 1,5 mM de celobiose pela enzima β -glicosidase livre e imobilizada em sol –gel a 60°C e pH 5,0 e pela enzima livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] a 50°C e pH 5,0.

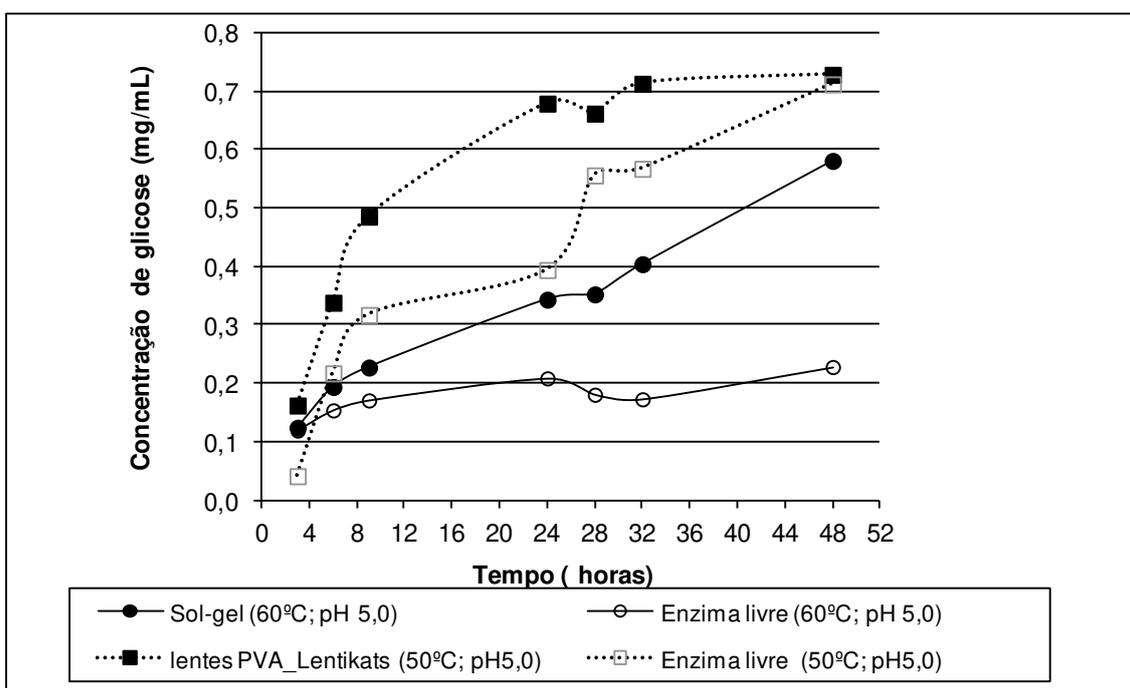


Figura II - 15: Hidrólise de celobiose pela β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e sol-gel

A enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] apresentou maior atividade de hidrólise da celobiose a 50°C, pH 5,0 quando comparada com a enzima imobilizada em sol-gel a 60°C pH 5,0 (Figura II – 15).

4.8 Hidrólise de celobiose por processo contínuo utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®]

A Figura II - 16 ilustra a conversão contínua de solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,5 M pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] em coluna de 1,0 cm³ e fluxo de 0,3 mL/min. Foi obtido 100% de conversão relativa da solução 1,5 mM de celobiose em glicose após 5 h, com diminuição para cerca de 40% após 148 h.

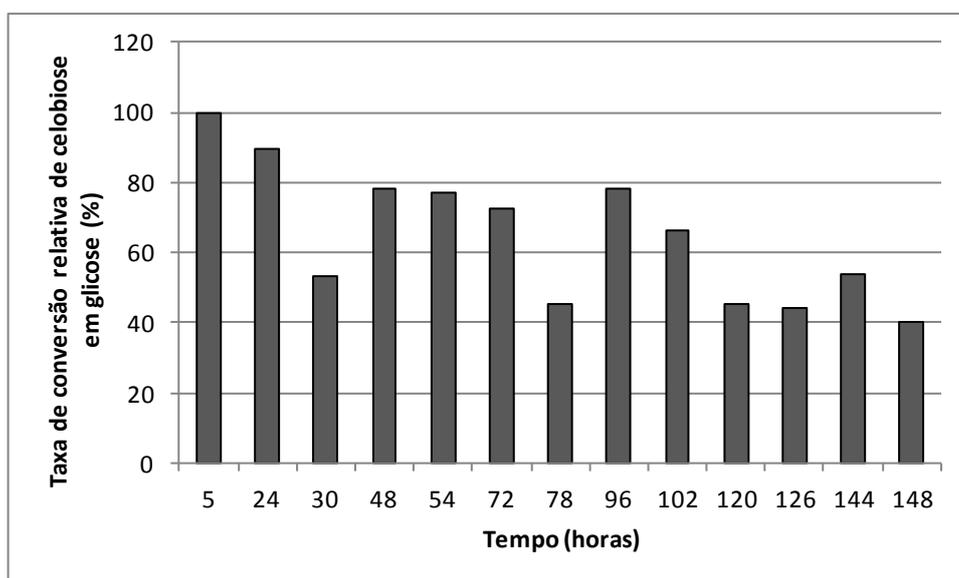


Figura II - 16: Taxa de conversão relativa de celobiose em glicose por β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®]

Na hidrólise ácida da solução 1,5 mM de celobiose com H₂SO₄ (6N) durante 10 minutos a 45°C, foi obtido 50% de conversão relativa de celobiose em glicose, indicando que a hidrólise enzimática da celobiose foi eficiente.

Mais estudos devem ser realizados para avaliar se a queda na taxa de conversão é devido a liberação da enzima do suporte ou se é devido a uma perda intrínseca da atividade catalítica da enzima. Outras velocidades de fluxos devem também ser estudadas com intuito de se otimizar a taxa de conversão da celobiose.

5 CONCLUSÃO

A β -glicosidase livre de *Aspergillus niger* LBA 02 apresentou atividade ótima a 65°C e pH 4,5. A enzima imobilizada em sol-gel mostrou atividade ótima na faixa de 60 – 65°C.

A temperatura de 50°C foi fixada como temperatura ótima de trabalho para a enzima imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®], pois acima da temperatura de 60°C ocorreu a fusão das lentes. A imobilização de β -glicosidase em sol-gel e lentes PVA - Lentikats[®] não alterou o pH ótimo de atividade da enzima, permanecendo em 4,5.

A enzima livre e imobilizada em sol-gel retiveram cerca de 90% de atividade residual após 3 h a 40°C e cerca de 50% após 3 h a 60°C. O tempo de meia vida da β -glicosidase imobilizada em sol-gel a 70°C foi 0,88 h. A β -glicosidase imobilizada em sol-gel reteve cerca de 10% da atividade residual após 3 h a 70°C, enquanto a enzima livre foi inativada após 1 hora a 70°C.

A β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] apresentou-se mais estável do que a enzima livre, após 3 h de tratamento na faixa de 40 a 55°C.

A β -glicosidase imobilizada em sol-gel apresentou valores de K_M estimados na faixa de 1,0 a 1,25 mM de celobiose, a 60°C, pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e Solver enquanto que a enzima livre apresentou valores de 0,92 a 1,69 mM de celobiose, sugerindo que não houve alteração da afinidade da enzima pelo substrato celobiose, com a imobilização.

A imobilização da enzima em lentes PVA - Lentikats[®] resultou em um aumento dos valores de K_M estimados em 3,61; 2,7 e 3,03 mM de celobiose, a 50°C, respectivamente, pelos métodos de Lineweaver – Burk, Hanes – Woolf e

Solver indicando que a imobilização resultou em diminuição da afinidade da enzima imobilizada pelo substrato.

A taxa de conversão relativa da solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,5 mM pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] em coluna de 1,0 cm³ e fluxo de 0,3 mL/min foi de 100% após 5 h entretanto a porcentagem de conversão diminuiu para 40% após 148 h.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A.F.; OSMAN, M.Y.; ABDEL-NABY, M.A. – Production and immobilization of cellobiase of *Aspergillus niger* 20. **Chemical Engineering Journal**, v.68, p. 189-196, 1997.

ABDEL-NABY, M.A. - Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. **Applied Biochemistry Bioechnology**. v.38, p.69–81, 1993.

AVNIR, D.; BRAUN, S.; LEV, O.; OTTOLENGHI, M., - Enzymes and other protein-gel materials. **Chemical of Material**.v.6, p.1605–1614, 1994.

AVNIR, D.; CORADIN, T.; LEV, O.; LIVAGE, J. - Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**.,v.16, p.1013–1030, 2006.

BIELER NC, ANSORGE-SCHUMACHER MB, GREINER L. - Automated lab-scale production of PVA/PEG-enzyme immobilisates. **Biotechnology Journal**, v.5, n. 8, p.881-5, 2010.

BEDANI, C.C. - Produção, caracterização e purificação de β -glicosidases fúngicas e sua ação sobre a hidrólise de amígdalina, celbiose e p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo, Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

BRADY D, JORDAAN J. - Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p.1639-1650, 2009.

BRINKER, J. C.; SCHERER, G. W. (Eds.). - Sol-Gel Science: the physics and chemistry of Sol-Gel processing. **Book News**, Inc.Portland, OR 1990.

CHANG, M.Y.; JUANG, R.S. - Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase, **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p. 93–98, 2007.

CHAUVE, C.; GAVRANOVIC, H.; OUANGRAOUA, A.; TANNIER, E. - Yeast ancestral genome reconstructions: the possibilities of computational methods II. **Journal of Computational Biology**, v.17, p.1097–1112, 2010.

COUGHLAN, M.P. - Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.32, p.77-100, 1991.

DING, W.A.; VORLOP, K.D. - Gel aus polyvinylalkohol und verfahren zu seiner herstellung. German Patent DE 4327923 A1, 1995.

EL-HADI ,A.A. - Factors affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumilus* E601 cells in poly(vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. **Process Biochemistry**, v.38, p.1659–1664, p.2003.

FERNANDES, P.; MARQUES, M.P.C; CARVALHO, F.; CABRAL, J.M.S - A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84:p. 561–564, 2009.

FIGUEIRA, J.A.; DIAS, F.F.G.; SATO, H.H.; FERNANDES, P. - Screening of supports for the immobilization of β -glucosidase. **Enzyme Research**, v. 2011, ID. 642460, p. 1-8, 2011.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; JANBON, G.; ARNAUD, A.; GALZY, P. - A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44: p.2336–2340, 1996.

GUISAN, J.M. - Immobilization of enzymes and cells, Humana Press, second edition, 2006.

GORADIA, D.; COONEY, J.; HODNETT, B.K.; MAGNER, E.- The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v.32, p.231–239, 2005.

GROBOILLOT, A; BOADI, D.K; PONCELET, D; NEUFELD, R.J. - Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.14, p.75-107, 1994.

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M.; ŠIPOCZ, M.; SEDLACKOVA, B. - Entrapment of β -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 763–767, 2008.

IWASHITA, K.; TODOROKI, K.; KIMURA, H.; SHIMOI, H. ITO, K. - Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 10, p. 1938-1946, 1998.

JAHNZ, U.; WITTLICH, P.; PRUSSE, U.; VORLOP, K.D. - New matrices and bioencapsulation processes, In: Hofman, M. and Thonart, P., eds, Engineering and Manufacturing for Biotechnology (Kluwer Academic Publishers, London) p.293- 307, 2001.

LÓPEZ-SERRANO P., L.; CAO, F.; VAN RANTWI, J.K.; SHELDON, R.A. - Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1379-1384, 2002.

KANG, S. W.; KO, E.H.; LEE, J. S.; KIM, .S. W. - Over-production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 647–650, 1999.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPHUKIEW, J.; WHALLEY, A.J.; REYNOLDS, C.D.; SIHANONTH, P. - Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the

wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 162-170, 2007.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. - Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.157–176, 2000.

KAUL, P.; STOLZ, A.; BANERJEE, U.C. - Cross linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. **Advanced Synthesis and Catalysis**. v.349, p. 2167–2176, 2007.

KŘENKOVA, J.; FORET, F. - Immobilized microfluidic enzymatic reactors. **Electrophoresis**, v.25, p.3550-3563, 2004.

KUNAMNENI, A.; GHAZI, I.; CAMARERO, S.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J.; ALCALDE, M. - Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. **Process Biochemistry**, v.43, p. 69-178, 2008.

LALONDE, J.; MARGOLIN, A. - Immobilization of Enzymes. In *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry*, Drauz K and Waldmann H (eds) 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim. p. 163-184, 2002.

Lentikat's biotechnologies - <http://www.lentikats.eu/en/download-farmacie> (acesso em 10 de Fevereiro de 2011)

LEVITSKY, V.Y.; LOZANO, P.; IBORRA, J.L. - Kinetic analysis of deactivation of immobilized alpha-chymotrypsin by watermiscible organic solvent in kyotorphin synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 65, p. 170–175, 1999.

LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIOUS, I.S. - Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACEDO, J.A.; SATO, H.H. - Propriedades e aplicações da transglutaminase em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16(4), p.413-419, 2005.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. - Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAKROPOULOU, M.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TSITSIMPIKOU, C.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; MACRIS, B. J. - Factors affecting the specificity of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-beta-D-glucosides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, p. 97–101, 1998.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNADEZ-LAFUENTE, R. - Increase in the conformational stability of enzymes immobilized on epoxyactivated supports by favouring additional multipoint attachment. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 26, p.509–515, 2000.

MATEO, C.; GRAZÚ, V.; PESSELA, B.C.C.; MONTES, T.; PALOMO, J.M.; TORRES, R.; LÓPEZ- GALLEGO, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. - Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society Transactions**, v.35, p.1593-1601, 2007.

MILETIĆ, N.; VUKOVIĆ, Z.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. - Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethylacrylate) resins – versatile immobilisation supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p196-201, 2009.

NAGAMOTO, H.; MATSUSHITA, Y.; SUGAMOTO, K.L.; MATSUI, T. - Preparation and properties of gelatin immobilized β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, p.128-136, 2005.

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CZUKOR, B.; HOSCHKE, A. - Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. **Process Biochemistry**, v.46, p. 298-303, 2011.

NOGUER, T., TENCALIEC, A., CALAS-BLANCHARD, C., AVRAMESCU, A., AND MARTY, J.L. - Interference-free biosensor based on screen-printing technology and solgel immobilization for determination of acetaldehyde in wine. **Journal of AOAC International**, v. 85, n.6, p.1383–1389, 2002.

OH, K.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H.; MATSUOKA, H.- Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1999, v. 63, n. 2, p. 281-287.

O'NEIL, H.; ANGLE, C.V.; HEMERY, I.; EVANS, B. R.. - Properties of carbohydrate-metabolizing enzymes immobilized in sol-gel beads: stabilization of invertase and β -glucosidase by blue dextran. **Biotechnology Letters**, v.24, p.783–790, 2002.

ORTEGA, N.; BUSTO, M.D.; PEREZ-MATEOS M. - Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p.7–14, 2001.

PANDEY, M.; MISHRA, S. - Expression and characterization of *Pichia etchellsii* β -glucosidase in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 45-51, 1997.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. - Survey of isoflavone contents in Brazilian soybean, **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.3, p.156-160, 2001a.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.; AGUIAR, C.L.; SATO, H.H. - Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food Science and Industry**, v. 34, n. 4, p.14-19, 2001b.

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

POLIZZI, K.M.; BOMMARIUS, A.S.; BROERING, J.M.; CHAPARRO-RIGGERS, J.F. - Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p.220-225, 2007.

REBROS, M.; ROSENBERG, M.; MLICHOVÁ, Z.; KRIŠTOFÍKOVÁ, L. - Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p. 784-787, 2007.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; VIJAYAKRISHNAN, V.; SCHIMOSSEK, K. - Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.134, p. 251–258, 1998.

RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, I.Z.; GUNATA, Z.; BARRE, P. - Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p. 3607–3614, 1998.

ROODE, B.M.; VAN DER MEER, T.D.; KARPER, T.; FRANSSSEN, C.R.; VAN DER PADT, A.; VAN DER OOST, J.; BOOM, R.M. - The catalytic potency of β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus* in the direct glucosylation reaction, **Enzyme Microbiology Technology**, v. 29, p. 621-624, 2001.

ROY, J.J.; ABRAHAM, T.E. - Strategies in making cross-linked enzyme crystals. **Chemical Reviews**.v. 104, n.9, p 3705-3721, 2004.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. - Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*, **Applied of Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3165–3170, 1996.

SCHLIEKER, M.; VORLOP, K.D. - A novel immobilization method for entrapment LentiKats, in Immobilization of Enzymes and Cells, 2nd edn, ed. by Guisan JM. Humana Press, Totowa, NJ, p 333–343, 2006.

SEGURA, A.G.; ALCALDE, M.; PLOU, F.J.; SIMEON, M.R.; MONSAN, P.; BALLESTEROS, A. - Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21 (6). p. 325-331, 2003.

SHELDON R.A. - Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**. v. 349, p.1289 – 1307, 2007.

SHEN, X.; XIA, L. - Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1363–1367, 2004.

SYNOWIECKI, J.; WOŁOSOWSKA, S. - Immobilization of thermostable β - glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1417–1422, 2006.

TU, M.; ZHANG, X.; KURABI, A.; GILKES, N.; MABEE, W.; SADDLER, J. - Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis, **Biotechnology Letters**, v. 28, p.151-156, 2006.

VAN RENSBURG, P.; ZYL, W.H.V.; PRETORIOUS, I.S. - Engineering yeast for efficient cellulose degradation. **Yeast**, v.14, p. 67-76, 1998.

YAN, T.R.; LIN, C.L. - Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 965–970, 1997.

YUN, S.; JEONG, C.; CHUNG, D.; CHOI, H. - Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

CAPÍTULO III - APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE *A. niger* LBA 02

RESUMO

A enzima β -glicosidase possui diversas aplicações em diferentes setores da indústria, como de alimentos, bebidas, farmacêutica e detergentes. Dentre estas aplicações duas vêm se destacando devido a grande importância na área da saúde e na produção de combustíveis renováveis. O destaque na área da saúde deve-se a capacidade desta enzima hidrolisar isoflavonas glicosiladas na sua forma aglicona, a qual é melhor absorvida pelo organismo e possui ação preventiva de câncer, osteoporose, minimizando os efeitos pós-menopausa e hipercolesterolêmicos. Na produção de combustíveis renováveis, a β -glicosidase apresenta um papel fundamental na hidrólise de materiais lignocelulósicos, hidrolisando a celobiose em glicose prevenindo o acúmulo desse dissacarídeo que atua como inibidor de outras enzimas celulolíticas, tornando o processo mais efetivo. Este trabalho visou a aplicação da enzima β -glicosidase de *A. niger* LBA 02 livre e imobilizada na transformação das isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas. Após 24 h de reação, o teor de daidzeína aumentou aproximadamente 2,6; 10,8 e 12,2 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre, imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e imobilizada em sol-gel, respectivamente. Já para o teor de genisteína foram observados aumentos de 11,7; 11,4 e 11,4 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre, imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e imobilizada em sol-gel, respectivamente.

SUMMARY

The β -glucosidase enzyme has various applications in different industries, such as food, beverages, pharmaceuticals and detergents. Among these two applications have gained prominence because of great importance in the health and production of renewable fuels. The emphasis on health is because of the ability of this enzyme hydrolyze isoflavone glycosides in its aglycone form, which is well absorbed by the body and has a preventive action in cancer, osteoporosis, minimizing the effects of postmenopausal syndromes and hypercholesterolaemia. In the production of renewable fuels, the β -glucosidase plays a fundamental role in the hydrolysis of lignocellulosic material, hydrolyzing cellobiose to glucose preventing the accumulation of this disaccharide which cause the inhibition of other cellulolytic enzymes, making the process more effective. This study aimed to apply the β -glucosidase enzyme free and immobilized form in the transformation of isoflavone glycosides from soybean in isoflavone aglycones. After 24 h of reaction, the concentration of daidzein increased approximately 2.6, 10.8 and 12.2 fold when applied β -glucosidase enzyme free and immobilized in lenses PVA - Lentikats[®] and sol-gel, respectively. The content of genistein increased 11.7, 11.4 and 11.4 times when applied β -glucosidase enzyme free and immobilized in lenses PVA - Lentikats[®] and sol-gel, respectively.

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases representam um importante grupo de enzimas devido ao seu uso potencial em vários processos biotecnológicos (Karnchanatat et al., 2007), incluindo a degradação de biomassa e a síntese de β -glicosídeos de interesse como os alquil glicosídios com aplicações nas indústrias de alimentos, de detergente e farmacêutica (Coughlan, 1985; Makropoulou et al., 1998; Yan e Liao, 1998).

Estas enzimas têm participação em reações importantes na liberação enzimática de compostos aromáticos a partir de precursores glicosídicos presentes em frutas e produtos de fermentação, fator importante na indústria de alimentos e bebidas, a fim de melhorar as características sensoriais dos produtos (Gueguen et al., 1996; Riou, et al., 1998). Também atuam na formação de moléculas bioativas, hidrolisando compostos glicosilados, como as isoflavonas, com conseqüente liberação das suas formas agliconas (Riou, et al., 1998; Park et al., 2001; Chang e Juang, 2007).

Neste capítulo foi estudada a aplicação da β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel na hidrólise de isoflavonas glicosiladas nas suas formas agliconas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aplicações da β -glicosidase

Nos últimos anos, o interesse na β -glicosidase tem aumentado devido a sua participação nos mais variados processos biotecnológicos, incluindo a aplicação da enzima para formação de compostos de aroma e estabilização de sucos e bebidas, sendo de potencial interesse para a indústria de alimentos e bebidas, para melhoramento das propriedades sensoriais dos produtos (Karnchanatat et al., 2007; Villena, 2007; Palmeri e Spagna, 2007).

A β -glicosidase tem grande importância na indústria vinícola e de sucos, devido a sua habilidade de estabilizar a coloração de sucos e vinhos (Villena, 2007; Palmeri e Spagna, 2007). A enzima possui a capacidade de hidrolisar antocianinas, produzindo antocianidinas e açúcar livre, mono ou dissacarídeos. A aglicona resultante tem pouca cor e é menos solúvel que a antocianina, tendendo a ser rapidamente precipitada e facilmente removida durante a filtração. Isto é importante na indústria de sucos, porque evita a alteração na cor que ocorreria com a presença de antocianinas durante o processo de pasteurização do suco (Palma-Fernandez et al., 2002). Este efeito também é responsável pela suavização da coloração do vinho tinto durante o processo de fabricação.

As β -glicosidases também podem ser utilizadas para melhorar as propriedades sensoriais dos sucos de frutas cítricas, nos quais o gosto amargo é devido, em parte, a compostos glicosídicos, como a naringina (4,5,7-trihidroxiflavanona-7-

ramnoglicosídeo), que podem ser hidrolisados pela ação sucessiva de α -ramnosidase e β -glicosidase (Riou et al., 1998). (Figura III - 1)

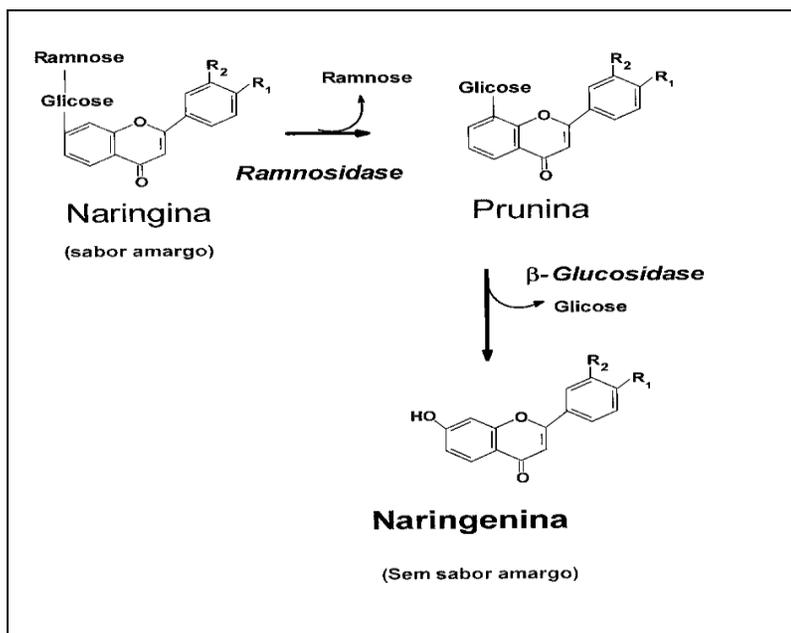


Figura III - 1: Hidrólise da naringina pela ação sucessiva de α -ramnosidase e β -glicosidase

A β -glicosidase também hidrolisa os compostos ciânogênicos linamarina (Figura III .2) e amigdalina (Figura III . 3) encontrados em mandioca brava e casca de maracujá, respectivamente.

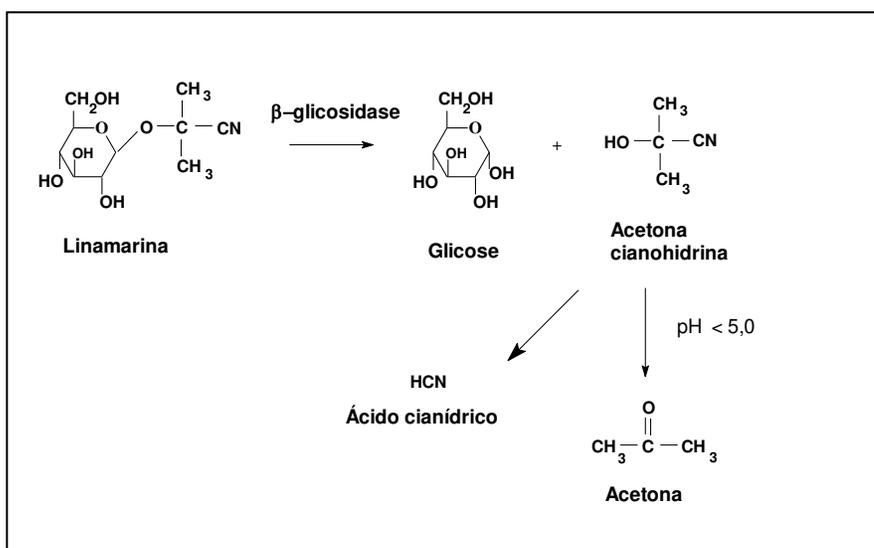


Figura III - 2: Hidrólise da linamarina (mandioca brava) por β -glicosidase

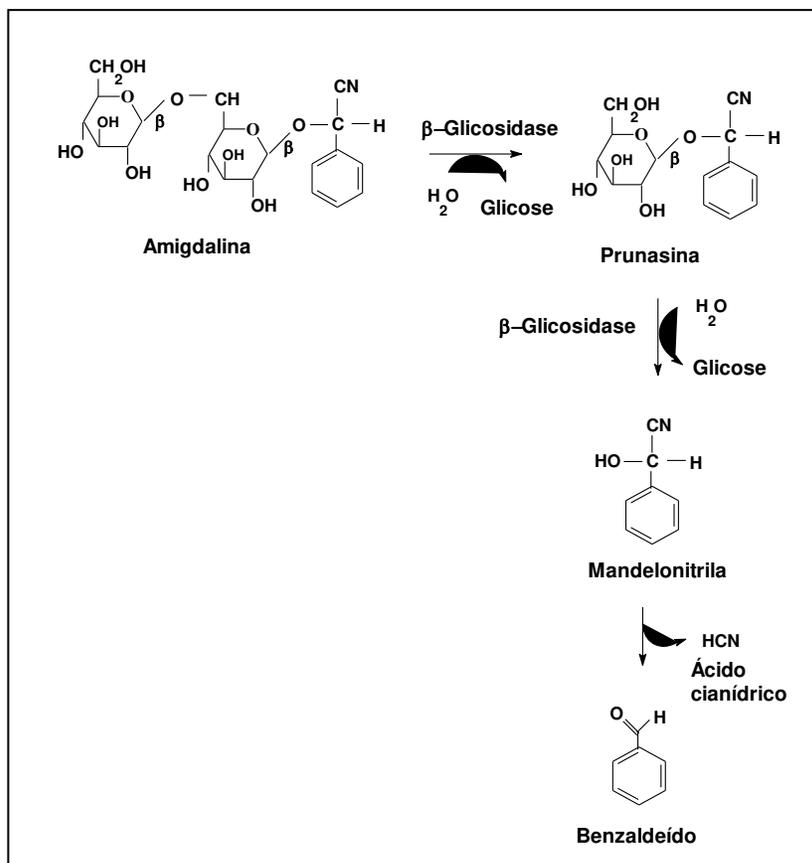


Figura III - 3: Hidrólise da amigdalina e prunasina (maracujá) pela β -glicosidase

Os precursores glicosilados como os terpenos (Caldini et al., 1994) são encontrados em uvas, manga, maracujá (Sarry e Gunata, 2004) e as β -glicosidases são mais efetivas e específicas do que o processo de hidrólise ácida para a liberação de terpenol a partir de terpenilglicosídeo. Estes compostos voláteis glicosiladamente ligados também são de grande interesse para a indústria de alimentos, cosmética e de tabaco (Jerkovic e Mastelic, 2004).

A β -glicosidase também possui a habilidade de catalisar reações de transglicosilação (Iwashita, 1998; Yun et al., 2001; Chang e Juang, 2007). A enzima β -glicosidase tem sido descrita como capaz de sintetizar alquil-glicosídeos e mono e diésteres de glicosídeos etoxilados (Millqvist-Fureby et al., 1998; Ortner et al., 2000; Parry et al., 2001; Bhatia et al., 2002). Estes produtos têm muitas aplicações potenciais na indústria farmacêutica, cosmética, bebidas e detergentes (Béguin e Aubert, 1994; Sarney e Vulfson, 1995; Gonzalez-Candelas et al., 2000).

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

2.2 Hidrólise de isoflavona de soja por β -glicosidase

Os grãos de soja contêm isoflavonas, metabólitos secundários difenólicos de plantas, dentre as quais podemos citar: daidzina, genistina e glicitina e suas formas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína, além de suas formas conjugadas acetil e malonil (KUDOU et al., 1991).

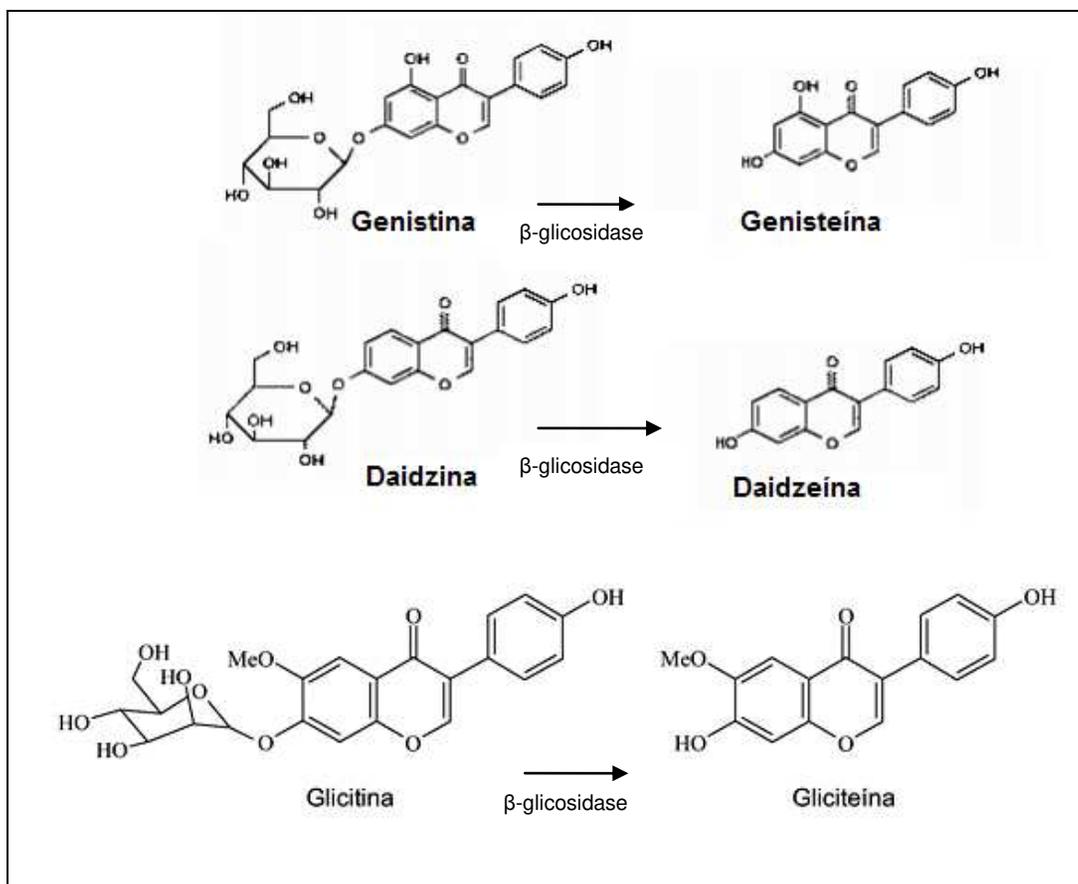


Figura III - 4: Transformação enzimática de isoflavonas glicosiladas em agliconas

O teor de isoflavonas e composição varia de acordo com a variedade da soja, produto e técnicas de processamento como aquecimento e fermentação (Chum et al., 2008).

Segundo Nielsen e Willianson (2007), as isoflavonas de soja possuem diversos efeitos benéficos para a saúde humana como atividade anti-carcinogênica, antioxidante e antiesclerose. Porém, diversos estudos apontam que a forma aglicona das isoflavonas são mais facilmente metabolizadas pelo organismo.

Nos últimos anos houve um crescente interesse em pesquisas com o objetivo de incrementar o teor de isoflavonas agliconas nos produtos a base de soja. Algumas pesquisas têm demonstrado que produtos tradicionais fermentados da

cultura chinesa a base de soja são benéficos a saúde apresentando propriedades antioxidante, antiproliferativa, anticolesterolêmica, anti-hipertensiva. Estas propriedades estão associadas ao teor de isoflavonas presentes nestes produtos (Wang et al., 2003; Murakami et al. 1984; Hirota et al., 2000).

A Figura III - 5 ilustra o mecanismo de ação das β -glicosidases.

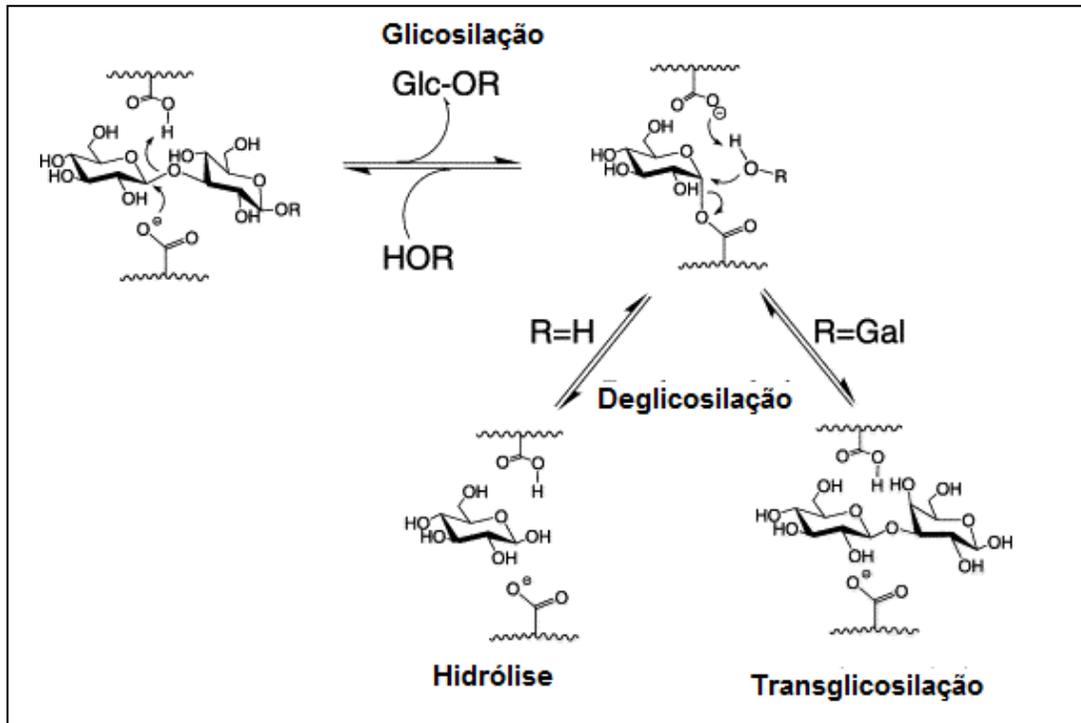


Figura III - 5: Mecanismo geral da ação de β -glicosidases

*Fonte: Blanchard e Withers, 2001.

A ingestão de alimentos fermentados à base de soja é um hábito tradicional na cultura oriental e têm desempenhado um papel importante na saúde das pessoas durante séculos. Dentre os alimentos fermentados da cultura asiática mais conhecidos estão o missô, natô, tempeh, sufu e douchi.

O douchi, consumido como tempero há séculos na China, pode ser fermentado por linhagens de *Mucor*, *Aspergillus* e bactérias (Bao, 1985).

Wang et al. (2007) estudaram a influência do processamento e adição de NaCl no teor de isoflavonas durante a produção de douchi. Os autores utilizaram o fungo *A. oryzae* (1×10^6 conídeos/g) para a fermentação. O produto foi incubado a 30°C durante 60 h em cestas de bambu. As fermentações foram conduzidas em frascos de vidro, onde foi adicionado NaCl nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5% (p/p). As amostras foram incubadas a 35°C e envelhecidas durante 30 dias. Os autores coletaram amostras de diversas etapas do processamento do grão cru, etapa de molho, grãos cozidos, fermentados (12, 24, 36, 48 e 60 h), e durante a maturação (1, 2, 3 e 4 semanas). Os resultados obtidos mostraram que o teor de isoflavonas agliconas aumentou durante a produção do douchi, fato este fortemente relacionado com a produção de β -glicosidase durante a fermentação. Foi observado também que quanto maior o teor de NaCl menor foi a produção de β -glicosidase e menor o teor de isoflavonas agliconas.

Yang et al. (2009) compararam a β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila* e a enzima comercial extraída de amêndoas (Sigma 0395) na hidrólise de isoflavonas glicosiladas em cinco variedades de soja. Os autores aplicaram o extrato enzimático no extrato de isoflavonas obtido através da moagem dos grãos de soja, na suspensão da farinha de soja e na bebida à base de soja. A extração das isoflavonas foi realizada pela adição de 20 mL de solução 80% metanol após a remoção de lipídeos da farinha com éter de petróleo. O teor de isoflavonas totais encontrado nas cinco variedades variou na faixa de 190 a 446 mg/100g. A variedade que apresentou o maior teor de isoflavonas foi a Zhongdou-27, sendo 1,29-2,85 vezes superior as demais variedades. Os autores verificaram que a β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila*, foi capaz de hidrolisar quase 100% das isoflavonas presentes na farinha de soja em suas formas agliconas após 4 h de reação, exceto as formas malonil que não

foram hidrolisadas. A β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila* também foi capaz de hidrolisar as isoflavonas presentes na suspensão de farinha de soja e na bebida à base de soja, aumentando em até 35 vezes o teor de isoflavonas agliconas nestas amostras, enquanto a β -glicosidase comercial de amêndoas aumentou somente 10 vezes o teor inicial. Os autores concluíram que a β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila* foi mais efetiva na hidrólise das isoflavonas presentes nos produtos de soja do que a enzima comercial extraída de amêndoas.

2.3 Efeitos benéficos das isoflavonas de soja

As isoflavonas estão presentes naturalmente nas plantas, principalmente na forma de glicosídeos, promovendo a simbiose com rizobactéria, em combinação com outras funções, como defesa contra pestes e outros patógenos (Gang et. al., 1997).

Segundo Rostagno et al. (2004) os grãos de soja contém em média 1,2-2,4 mg de isoflavonas totais por grama de amostra. Estando essa variação relacionada ao genótipo, ambiente, localização, tempo de armazenamento pós-colheita e técnicas de análises.

Aguiar (2004) estudou diferentes concentrações de etanol:água e metanol:água, para extração de isoflavonas de farinha de soja. O autor obteve maior extração de isoflavonas quando utilizou soluções 80 ou 90% de metanol e 60 ou 70% de etanol.

Os grãos de soja são ricos em diferentes tipos de isoflavonas, como suas formas agliconas (daidzeína, gliciteína, genisteína), glicosiladas (daidzina, glicitina, genistina), malonil glicosiladas e acetil glicosiladas (Wang e Murphy, 1994).

As isoflavonas estão presentes na dieta das populações que consomem soja e produtos à base de soja. A atenção para estes compostos aumentou devido à associação da baixa incidência de câncer de mama, próstata e colo-retal em população onde a dieta é rica em produtos à base de soja (Adlercreutz e Mazur, 1997).

Recentemente, vem aumentando o número de pessoas que se interessam pelas propriedades fisiológicas dos alimentos fermentados de soja como atividade antioxidante, atividade antiproliferativa, e efeito anti-hipertensivo (Wang et al., 2003).

Muitos autores têm relatado a hidrólise de isoflavonas glicosiladas em suas correspondentes agliconas durante a fermentação de produtos como sufu, missô, natô e tempeh (Yin et al., 2004; Chiou e Cheng, 2001; Ibe et al., 2001; Murakami, 1984).

Estudos clínicos têm sido realizados em humanos para avaliar os efeitos da ingestão de isoflavonas e sua biodisponibilidade, sendo coletadas amostras de plasma, urina e fezes após a ingestão de produtos à base de soja ou compostos puros. Os resultados nem sempre estão em concordância devido as diferentes análises realizadas, fonte de isoflavonas e matriz alimentar (Nielsen e Willianson, 2007).

Piskula et al. (1999) compararam a absorção de isoflavonas glicosiladas e agliconas em ratos. Os autores administraram oralmente as isoflavonas daidzina, genistina, daidzeína e genisteína em uma dose de 7,9 μmol em solução 25 mM de Na_2CO_3 . E a concentração dos metabólitos no plasma foram monitoradas durante

30 minutos. Após as análises cromatográficas nas amostras de plasma os autores observaram que as isoflavonas agliconas apareceram no plasma, antes das isoflavonas glicosiladas, indicando que as isoflavonas agliconas foram absorvidas rapidamente no estômago enquanto as isoflavonas glicosiladas passaram pelo estômago até alcançarem o duodeno para somente então serem absorvidas.

Após ingestão, as isoflavonas glicosiladas são hidrolisadas pelas β -glicosidases intestinais nas suas formas agliconas no intestino delgado e são absorvidas intactas ou podem ser metabolizadas pela microbiota intestinal no intestino grosso em outros metabólitos como equol ou o-desmetilangolensina (Day et al. 1998; Axelson et al., 1984).

Onozawa et al. (1998) relataram que a genisteína possui maior atividade antiproliferativa em células humanas de carcinoma de mama e de células cancerígenas de próstata quando comparada com a genistina.

Pascual-Teresa et al. (2006) realizaram um estudo avaliando o efeito da matriz alimentícia na biodisponibilidade aparente de isoflavonas em produtos de soja. Os autores avaliaram o efeito da ingestão de 50 mg de isoflavonas de soja adicionados em suco de frutas, barra de chocolate e biscoitos em um grupo de mulheres na pós-menopausa. Os resultados mostraram que os níveis de isoflavonas no plasma, urina e soro não foram alterados pela matriz alimentícia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração das isoflavonas glicosiladas de soja

As isoflavonas glicosiladas de soja foram obtidas como descrito por Aguiar (2004) com modificações. Os farelos de soja secos foram moídos até obtenção da farinha (100-200 mesh), que foi desengordurada com hexano (1:10 m/v) por 30 minutos a 25°C com agitação a 100 rpm. Uma amostra de 10 g de farinha desengordurada de soja foi misturada com 100 mL de solução 80% de metanol e incubada por 1h a 25°C a 100rpm para extração das isoflavonas totais. O sobrenadante foi utilizado como extrato para determinação do teor de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de acordo com o método proposto por Park et al. (2002), descrito no item 3.4. O extrato também foi utilizado na conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre e imobilizada.

3.2 Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e sol-gel.

Tubos eppendorf contendo amostras de 1 mL de extrato de isoflavonas e 0,1 mL de solução 0,1mg/mL de β -glicosidase (13600 U/g) em tampão acetato 0,1M pH 4,5 ou 0,1 mL de enzima imobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e sol-gel foram incubados em banho maria a 50°C, sob agitação. Após intervalos de tempo

de 0,5; 3 e 24 h foram retiradas alíquotas para análise da conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas por cromatografia líquida como descrito no item 3.4. O extrato de isoflavonas sem adição da enzima foi utilizado como controle.

3.3 Análise das isoflavonas de soja por cromatografia em camada delgada

As análises de isoflavonas de soja por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas de acordo com método proposto por Kudou et al. (1994). Alíquotas das amostras coletadas nos item 3.2, foram aplicadas em cromatoplas (10 x 10 cm) Kieselgel 60 F₂₄, (Merck Co., Alemanha). A fase móvel foi composta por clorofórmio-metanol-água (7:3:1 v/v) em fluxo ascendente. A corrida durou 45 minutos para o desenvolvimento do cromatograma e após a secagem, a placa foi observada sob luz ultra-violeta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando iluminador modelo UV Cole Parmer UVP-UVGL-58.

3.4 Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência

O teor de isoflavonas foi determinado conforme descrito por Aguiar (2004) com modificações, utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex UltiMate 3000 (Alemanha), amostrador automático (WPS-3000(T) SL Analytical), bomba quaternária (LPG-3400SD) e detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). Amostras de 20 µL foram injetadas na coluna C18 Atlantis[®] (Waters, 5 µm, 4,6 x

150 mm) a 30°C. Foram utilizados como fase móvel água-ácido acético (solvente A; 19:1, v/v) e metanol (solvente B). A corrida ocorreu conforme o seguinte gradiente: 20% da solução B por 15 min., de 20-80% de B entre 15-75 minutos, de 80-100% de B entre 75-80 minutos, 100-20% de B entre 80-90 minutos e 20 % de B entre 90-95 minutos, com fluxo de 0,5 mL/min. Os espectros foram obtidos entre 190 e 480 nm e o cromatograma processado a 254 nm. As análises quantitativas de daidzina, genistina e suas formas agliconas foram obtidas por comparação com padrões autênticos de daidzina (Sigma 30408), genistina (Sigma 0897), daidzeína (Sigma 16587) e genisteína (Sigma 73822). As concentrações foram expressas em µg de isoflavonas por g de farelo de soja, em base seca.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Conversão de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas usando β -glicosidase livre e imobilizada

A Figura III - 6 mostra o perfil cromatográfico em camada delgada do extrato de isoflavonas de soja no tempo zero e após aplicação da enzima livre nos tempos de 0,5; 2; 4 e 24 h de reação a 50 °C.

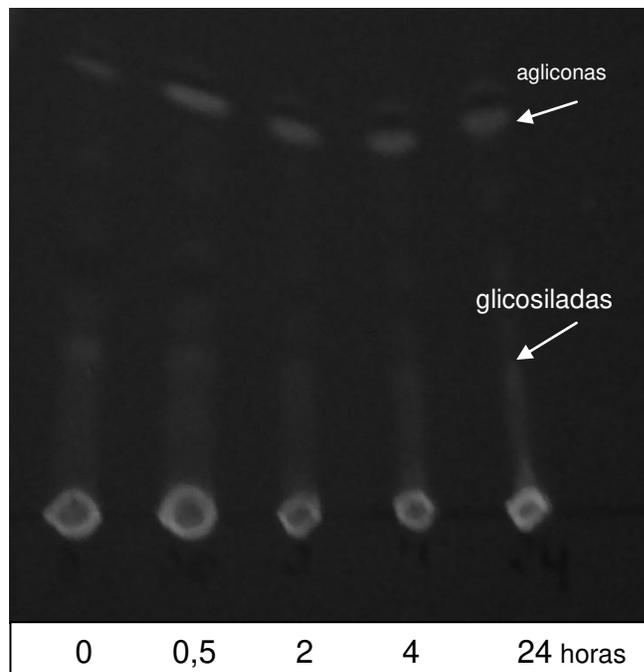


Figura III - 6: Perfil cromatográfico em camada delgada do extrato de isoflavonas de soja sem aplicação de enzima (0) e após aplicação de enzima β -glicosidase nos tempos de 0,5; 2; 4 e 24 h.

Lhutria et al. (2007) estudaram diferentes solventes e técnicas na extração de isoflavonas de soja. A mistura de solventes mais eficiente estudada foi o dimetil sulfóxido:etanol:água (5:70:25 v/v/v). Entretanto a mistura metanol:água 90% descrita por Aguiar (2004) também apresentou um elevado percentual de extração de das isoflavonas totais (83,7%).

A enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel foi testada na hidrólise de isoflavonas glicosiladas de soja.

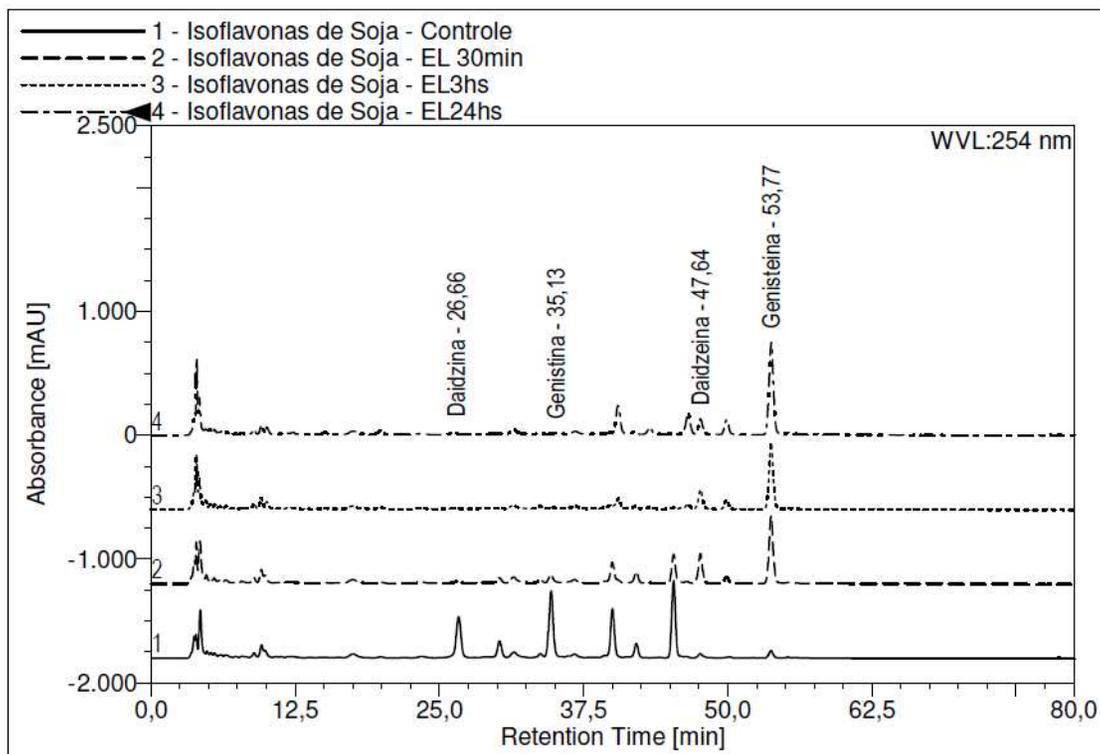


Figura III - 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase livre durante os tempos 0,5; 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente.

A Figura III - 7, ilustra que a β -glicosidase livre de *A. niger* LBA 02 foi capaz de converter quase totalmente as glicosil – isoflavonas daidzina e genistina em suas formas agliconas daidzeína e genisteína, após 0,5 h de reação a 50°C.

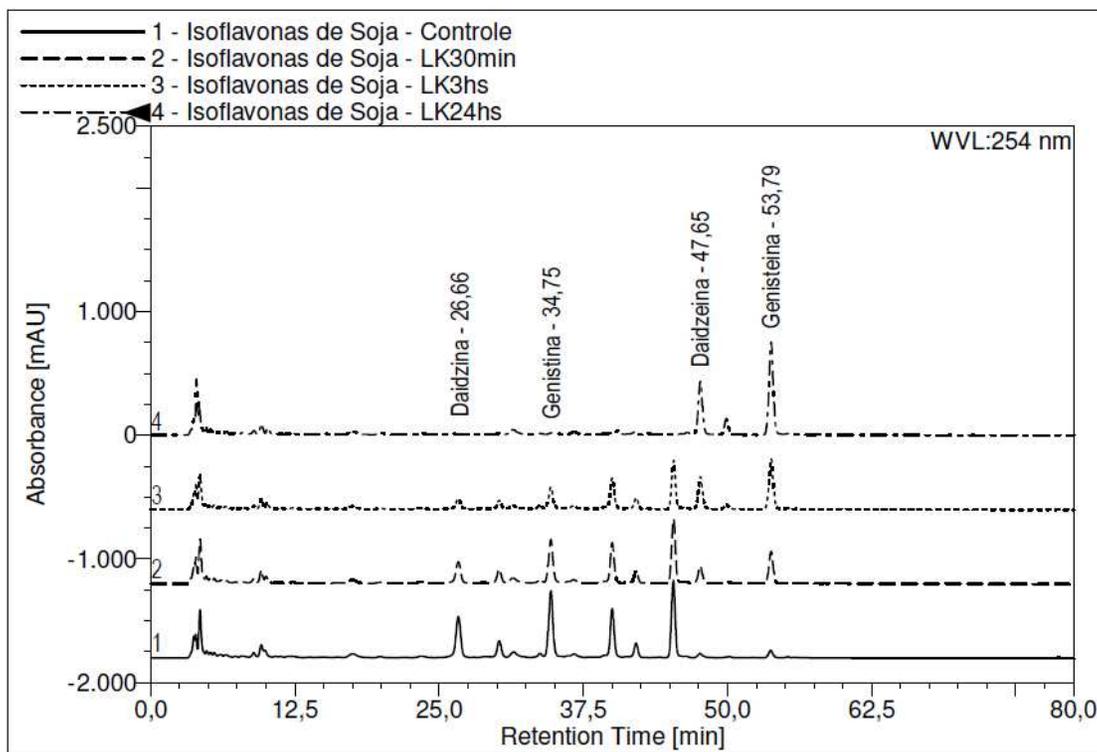


Figura III - 8: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] nos tempos 0,5, 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente.

As Figuras III - 8 e III - 9, ilustram que a β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel converteram as glicosil-isoflavonas, daidzina e genistina do extrato obtido de soja em suas formas agliconas daidzeína e genisteína, após 24 h de reação a 50°C.

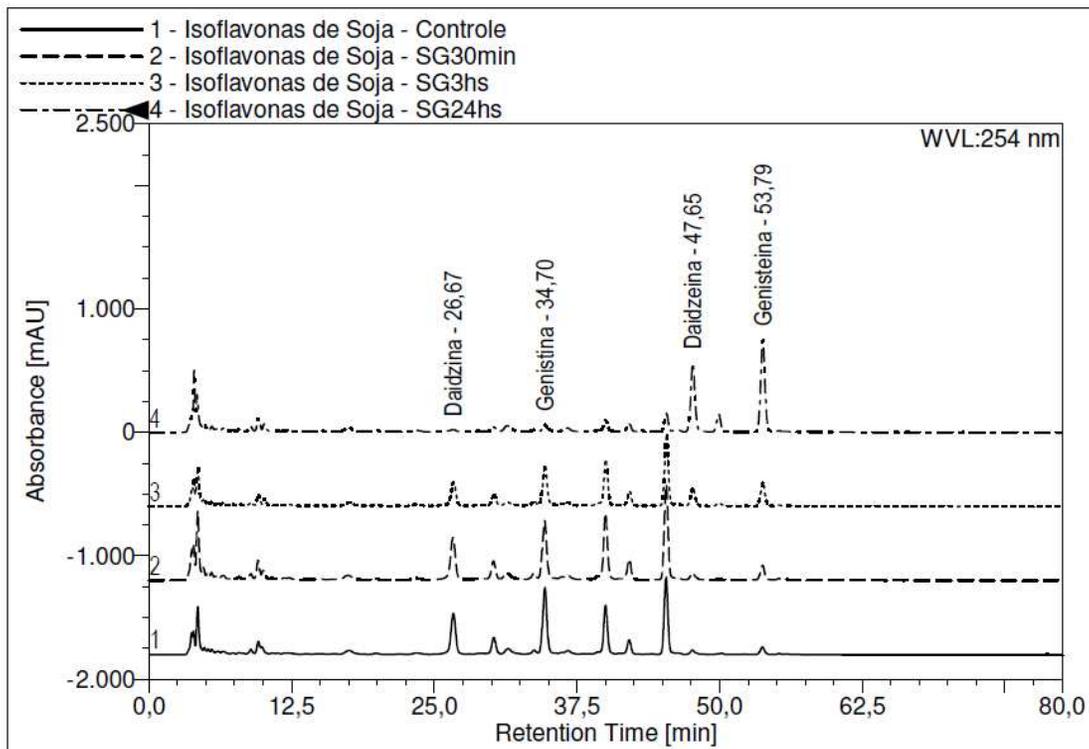


Figura III - 9: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja controle (cromatograma 1) e dos extratos tratados com β -glicosidase imobilizada em sol-gel nos tempos 0,5, 3 e 24 h (cromatogramas 2, 3 e 4), respectivamente.

Os compostos daidzina, genistina, daidzeína e genisteína nas amostras foram confirmados através da comparação do tempo de retenção e dos espectros de absorção dos padrões. A Figura III - 10 apresenta os cromatogramas e espectros de absorção das glicosil - isoflavonas da amostra extraída de soja, em comparação com os cromatogramas da mistura de padrões HPLC (Sigma). As Figuras III - 10 (A; C) apresentam os cromatogramas da amostra de extrato de isoflavonas de soja onde há dois picos que foram eluídos nos tempos de retenção 26,6 e 34,6 minutos, respectivamente, sendo estes valores próximos aos tempos de retenção da mistura de padrões contendo daidzina (Sigma 30408) e genistina

(Sigma 0897), 26,9 e 34,9 minutos, respectivamente. Além dos tempos de retenção, os espectros de absorção ampliados das amostras de extrato de isoflavonas (Figura III – 10 a e c) e da mistura de padrões HPLC (Sigma) (Figura III – 10 b e d) foram semelhantes, indicando que os compostos eluídos da amostra são as glicosil – isoflavonas daidzina e genistina.

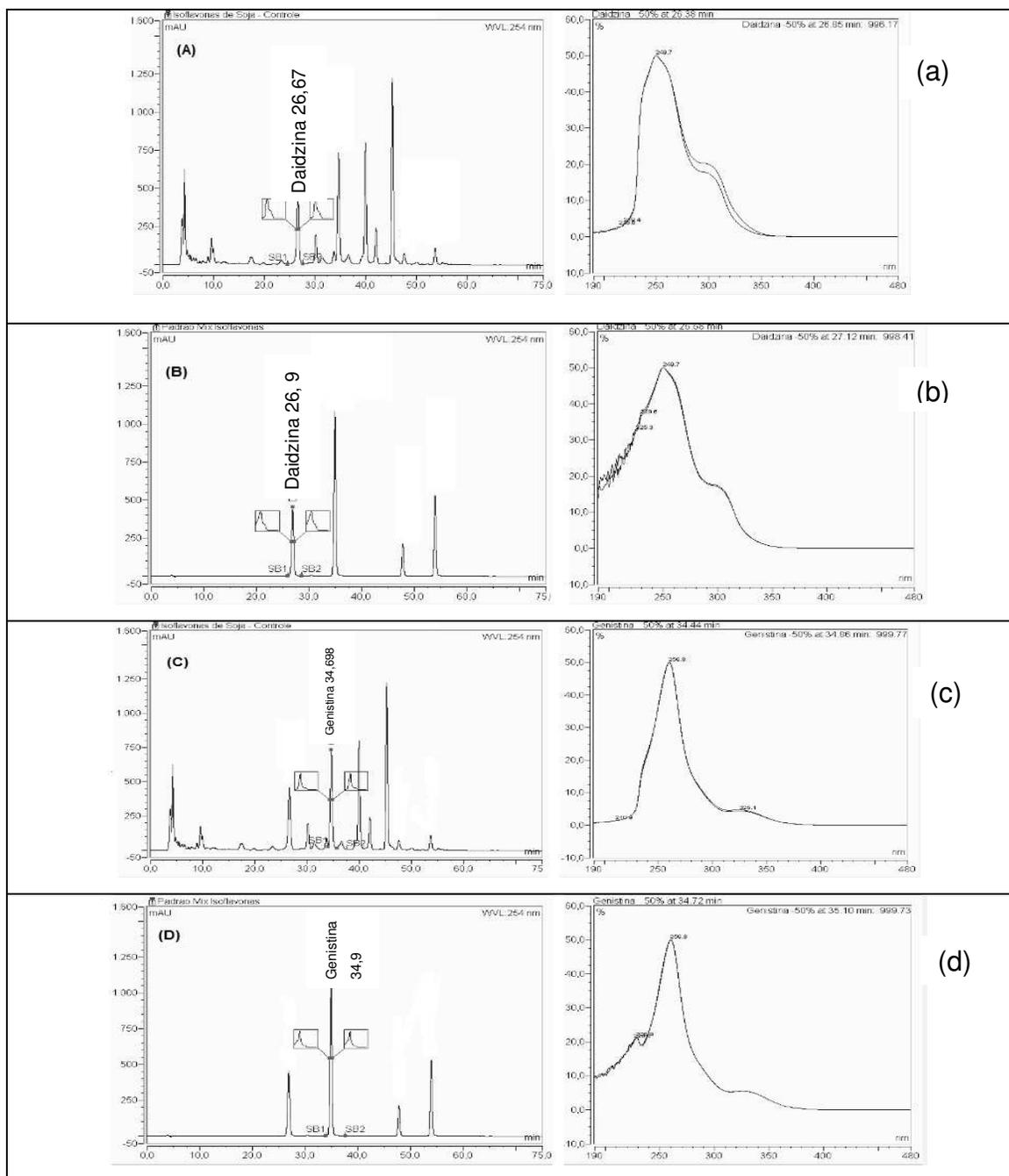


Figura III - 10: Cromatogramas obtidos por CLAE – DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja na amostra controle, tempo zero de reação com destaque para o pico de absorção da daidzina (A) e padrão daidzina (Sigma) (B). Cromatograma obtido por CLAE – DAD a 254 nm da mistura de padrões HPLC (Sigma) com destaque para o pico de absorção da genistina amostra (C) e padrão genistina (Sigma) (D). Espectro de absorção ampliado da daidzina presente na amostra (a), daidzina padrão (Sigma) (b), genistina presente na amostra (c) e genistina padrão (Sigma).

A Figura III – 11 apresenta os cromatogramas e espectros de absorção das isoflavonas agliconas da amostra extraída de soja, em comparação com os cromatogramas da mistura dos padrões HPLC (Sigma). As Figuras III – 11 (A; C) apresentam os cromatogramas da amostra de extrato de isoflavonas de soja onde há dois picos que foram eluídos nos tempos de retenção 47,6 e 53,7 min., respectivamente, sendo estes valores próximos aos tempos de retenção da mistura de padrões contendo daidzeína (Sigma 16587) e genisteína (Sigma 73822), 47,8 e 53,9 minutos, respectivamente. Além dos tempos de retenção, os espectros de absorção ampliados das amostras de extrato de isoflavonas (Figura III – a e c) e da mistura de padrões HPLC (Sigma) (Figura III – b e d) foram semelhantes, indicando que os compostos eluídos da amostra são as glicosil – isoflavonas daidzeína e genisteína.

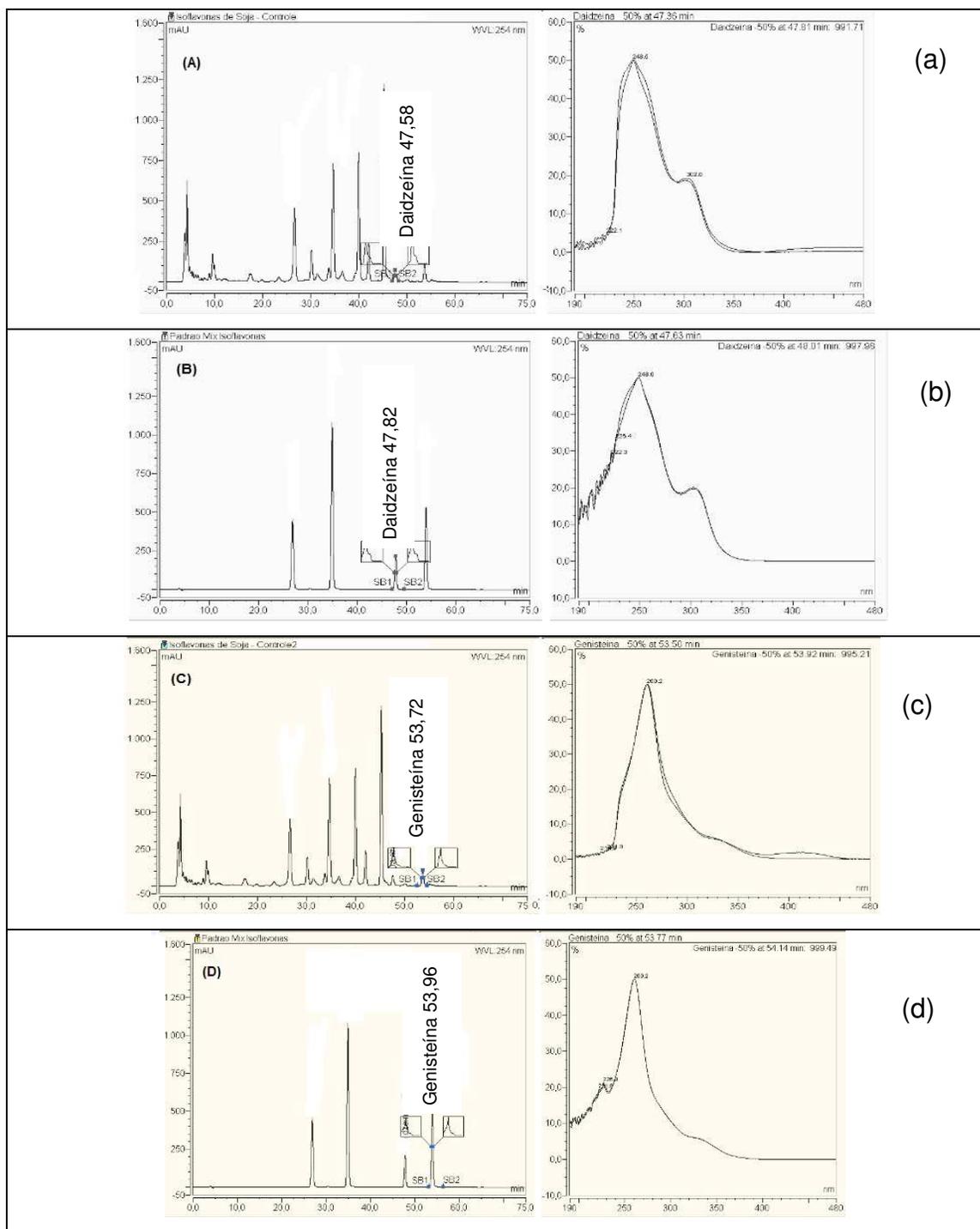


Figura III - 11: Cromatogramas obtidos por CLAE – DAD a 254 nm do extrato de isoflavonas de soja na amostra controle, tempo zero de reação com destaque para o pico de absorção da daidzeína (A) padrão daidzeína (B) genisteína presente na amostra(C) e genisteína padrão (Sigma) (D).

Para quantificação da daidzina, genistina, daidzeína e genisteína nas amostras de extrato de isoflavonas tratadas com a β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e sol-gel foi preparada uma curva de calibração contendo os padrões HPLC (Sigma).

A Figura III – 12 (A e B) ilustra a conversão de daidzina e genistina em daidzeína e genisteína, respectivamente, pela enzima β – glicosidase livre. A porcentagem de hidrólise de daidzina foi 76%, 43% e 36%, após 0,5 h, 3 h e 24 h de reação a 50°C, respectivamente. A hidrólise de genistina em genisteína pela β -glicosidase livre foram estimadas em 79%, 79% e 100% após 0,5 h, 3 h e 24 h de reação a 50°C, respectivamente.

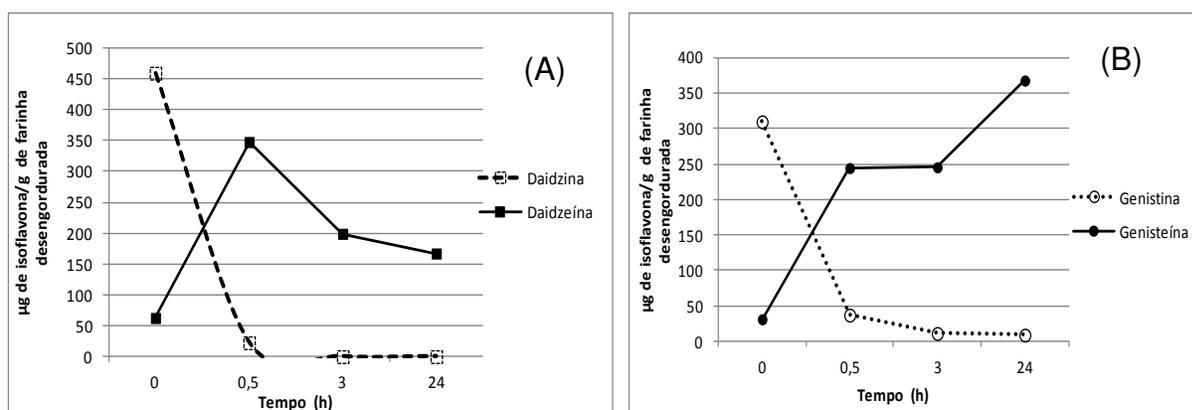


Figura III - 12: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase livre após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C.

A Figura III – 13 (A e B) ilustra a conversão de daidzina e genistina em daidzeína e genisteína, respectivamente, pela enzima β – glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats. A hidrólise de daidzina foi de 35%, 86% e 100%, após 0,5 h, 3 h e

24 h de reação a 50°C, respectivamente. Enquanto que a hidrólise da genistina foi 23%, 60% e 100% após 0,5 h, 3 h e 24 h de reação a 50°C, respectivamente.

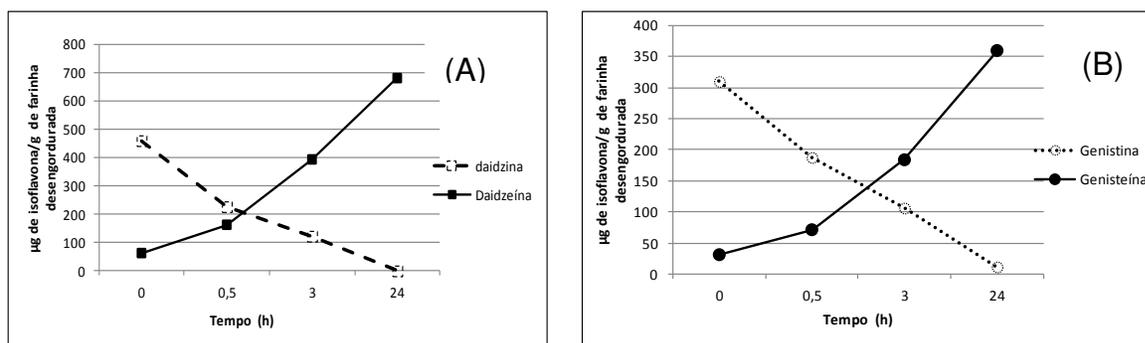


Figura III - 13: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C.

A Figura III - 14 (A e B) ilustra a conversão de daidzina e genistina em daidzeína e genisteína, respectivamente, pela enzima β - glicosidase imobilizada em sol-gel. A hidrólise de daidzina foi 9%, 45% e 100%, após 0,5 h, 3 h e 24 h de reação a 50°C, respectivamente. Enquanto que a hidrólise da genistina foi 10%, 23% e 100% após 0,5 h, 3 h e 24 h de reação a 50°C, respectivamente.

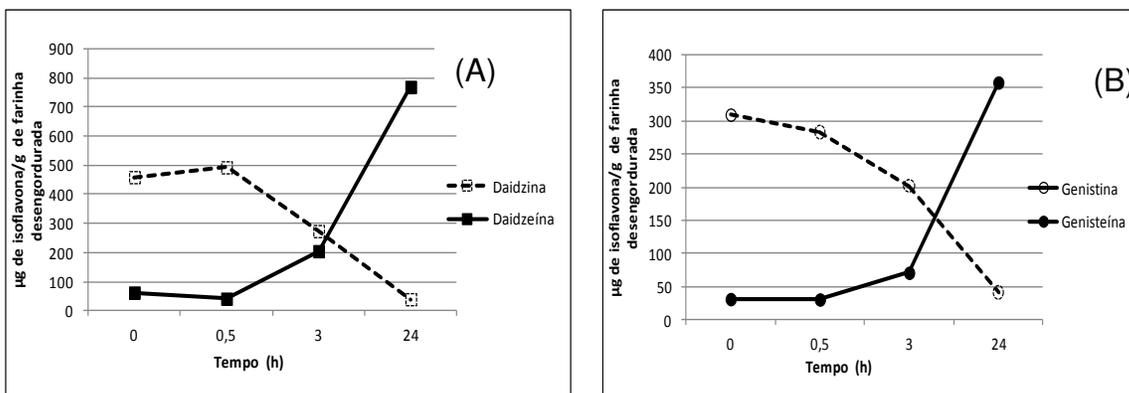


Figura III - 14: Conversão de daidzina em daidzeína (A) e de genistina em genisteína (B) pela enzima β -glicosidase imobilizada em sol-gel após 0,5 h, 3h e 24h de reação a 50°C.

Foi observado um aumento no teor de daidzina na amostra com aplicação da enzima imobilizada em sol-gel após 0,5 h de reação. Sugere-se que isoflavonas presentes nas amostras em formas menos estáveis, como por exemplo malonil conjugadas, podem ter sido convertidas em formas como a daidzina durante o aquecimento da amostra.

Segundo Hou e Chang (2002), as formas malonil são hidrolisadas espontaneamente e liberam glicosídeos simples. Os grupos malonil são comumente hidrolisados durante o processamento da soja com calor quando o produto está suficientemente hidratado.

Riedl et al. (2005) verificaram a diminuição de 3-15% do teor de malonil isoflavonas durante a etapa de forneamento, quando estudaram a otimização das condições de repouso da massa de pão de soja.

Aguiar (2004) estudou a hidrólise de isoflavonas de soja através da fermentação sólida da farinha de soja inoculada com esporos de *A. oryzae* ATCC 22786 e pela aplicação da enzima β -glicosidase no extrato de isoflavonas de soja. O autor verificou que para a fermentação sólida após 48 h de incubação a 30°C

houve a eficiente conversão das glicosil-isoflavonas (85,5%) em suas formas agliconas. Por outro lado, quando a enzima livre foi aplicada no extrato de isoflavonas a conversão ocorreu em meia hora a 40°C.

Yang et al. (2009) estudaram a hidrólise de glicosídeos de isoflavonas de cinco variedades de soja através da aplicação de β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila*. Amostras de farinha de soja foram desengorduradas com éter de petróleo em extrator Soxhlet. Em seguida, as isoflavonas foram extraídas utilizando metanol 80% durante 12 h a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada, filtrada e as isoflavonas foram quantificadas em HPLC. Os resultados foram expressos em mg de isoflavona por 100 g de farinha desengordurada. Os autores verificaram que a enzima foi capaz de converter as isoflavonas glicosiladas de farinha de soja em suas formas agliconas, resultando numa taxa de hidrólise de 93% das principais isoflavonas encontradas (daidzina, genistina e glicitina) após 4 h de incubação a 50°C. Os autores compararam a enzima β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila* com a enzima comercial e verificaram que a β -glicosidase termoestável de *Paecilomyces thermophila* demonstrou maior poder de deglicosilação sobre as isoflavonas glicosiladas de soja do que a enzima comercial, aumentando o teor de suas formas agliconas em até 38,3 vezes, após 4 h de incubação a 50°C.

No presente trabalho, o teor de daidzeína aumentou aproximadamente 2,6; 10,8 e 12,2 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre, imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e imobilizada em sol-gel, respectivamente, ao final de 24 h. O teor de genisteína aumentou 11,7; 11,4 e 11,4 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre, imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e imobilizada em sol-gel, respectivamente, ao final de 24 h.

As isoflavonas de soja tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, principalmente a daidzeína e a genisteína, por serem fitoestrogênios com uma ampla variedade de atividades biológicas (Nielsen e Willianson, 2007).

A maioria desses efeitos benéficos está relacionada à saúde feminina. Estudos clínicos com proteína de soja rica em fitoestrogênios vem demonstrando ação benéfica em pessoas com condição hormônio dependentes como câncer de mama, osteoporose, sintomas pós-menopausa e hipercolesterolêmica (Setchell e Olsen, 2003). Também foram relatados efeitos benéficos em outros tipos de câncer, doenças cardiovasculares e funções cerebrais (Bingham et al., 1998).

Estudos para comprovar os efeitos benéficos da daidzeína e da genisteína, em humanos, têm sido realizados através da ingestão de dieta rica nesses fitoestrogênios, como a soja, demonstrando redução dos sintomas pós menopausa e dos fatores de risco cardiovasculares (Bingham et al., 1998; Cassidy et al., 1995; Brzezinski et al., 1997).

5 CONCLUSÃO

A β -glicosidase obtida de *Aspergillus niger* LBA 02 livre e imobilizada em lentes PVA – Lentikats[®] e sol-gel foi capaz de hidrolisar as isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas .

O teor de isoflavonas agliconas daidzeína aumentou cerca de 2,6; 10,8 e 12,2 vezes após tratamento do extrato de isoflavonas de soja com β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel, respectivamente, ao final de 24 h. E para a genisteína, os aumentos observados foram 11,7; 11,4 e 11,4 vezes quando aplicada a enzima β -glicosidase livre e imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] e sol-gel, respectivamente, ao final de 24 h.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L. - Transformações físicas e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine Max L.*) e o efeito na atividade biológica *in vitro*, Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. - Phyto - estrogens and Western disease. **Anal of Medical** ,v.29, p.95-120, 1997.

AXELSON, M.; SJOVALL, J.; GONSTAFSSON, B.F.; SETECHELL, K.D.R. - Soya : a dietary source of the non-steroidal estrogen equol in man and animals. **Journal Endocrinology**, v.102, p. 49-56, 1984.

BAO, Q.A. – The headsteam and technology of douche. **China Brewing**, v.14, p.103-109, 1985.

BEGUIN, P.; AUBERT, J.P. - The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews.**, v. 13, p. 25–58, 1994.

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

BINGHAM, S.A.; ATKINSON, C.; LIGGINS, J.; BLUCK, L.; COWARD, A. - Phyto-oestrogens: where are we now? **Brazilian Journal in Nutrition**, v. 79, p. 393-406, 1998.

BLANCHARD, J. E.; WITHERS, S. G. - Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Chemistry and Biology**, v. 8, p. 627-633, 2001.

BRZEZINSKI, A.; ADLERCREUTZ, H.; SHAOUL, R.; ROSLER, A.; SHMUELI, A.; TANUS, V.; SCHENKER, J.G. - Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. **Menopause**, v. 4, p.89–94, 1997.

CALDINI, C.; BONOMI, F.; PIFFERI, P. G.; LANZARINI, G.; GALANTE, Y. M. - Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 286-291, 1994.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K. - Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soybean products. **Brazilian Journal in Nutrition**. v. 74, p. 587-601, 1995.

CHANG, M.Y.; JUANG, R.S.- Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p. 93–98, 2007.

CHIOU, R.Y.Y.; CHENG, S.L. – Isoflavone transformation during soybean koji preparation and subsequent miso fermentation supplement with ethanol and NaCl, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 3656-3660, 2001.

CHUNG, W.Y.; KIM, S.K.; SON.; J.Y. - Isoflavone contents and physiological activities of soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Bacillus natto*. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 37, p.141-147, 2008.

COUGHLAN, M.P. - Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.32, p.77-100, 1991.

DAY, A.J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, M.; RHODES, M.J.; MORGAN, M.R. - Deglycosilation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity, **FEBS Letters**, v. 436, p. 71-75, 1998.

GANG, D. R.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. - Phylogenetic Links in Plant Defense Systems: Lignans, Isoflavonoids and Their Reductases. Comparison to Isoflavonoid Metabolism. *In* "Phytochemical Pest Control Agents" (Hedin, P., ed.) **ACS Symp. Ser.**, v.658, p.58-89, 1997.

GONZALEZ-CANDELAS, L.; GIL, J.V.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; RAMON, D. - The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p.179–183, 2000.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; JANBON, G.; ARNAUD, A.; GALZY, P. - A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44: p.2336–2340, 1996.

HIROTA, A.; KAWAI, S.; YANO, M.; ABE, N. - 1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 1038-1040, 2000.

HOU, H. J.; CHANG, K. C. - Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. **Journal of Food Science**, v.67, n. 6, p.2083-2089, 2002.

IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. - Production of natto which contains a high level of isoflavone aglycons. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 48, p. 27-34, 2001.

IWASHITA, K.; TODOROKI, K.; KIMURA, H.; SHIMOI, H. ITO, K. - Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 10, p. 1938-1946, 1998.

JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J. - GC-MS characterization of acetylated β -D-glucopyranosides: Transglucosylation of volatile alcohols using almond β -glucosidase. **Croatica Chemica Acta**, v. 77, n. 3, p. 529-535, 2004.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPHUKIEW, J.; WHALLEY, A.J.; REYNOLDS, C.D.; SIHANONTH, P. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 162-170, 2007.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. - Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* MERRILL). **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, p. 2227-2333, 1991.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.C.W.; COWARD, A.; BINGHAM, S.A. – Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. **Analytical Biochemistry**, v. 264, p. 1-7, 1998.

MAKROPOULOU, M.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TSITSIMPIKOU, C.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; MACRIS, B.J. - Factors affecting the specificity of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-beta-D-glucosides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, p. 97–101, 1998.

MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. - Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal Food Science**, v.54, n.3, p.602-605, 1989.

MILLQVIST-FUREBY, A.; GAO, C.; VULFSON, E.N. - Regioselective synthesis of ethoxylated glycoside esters using β -glucosidase in supersaturated solutions and lipases in organic solvents. **Biotechnology Bioengineering**, v.59, p.747–753, 1998.

MURAKAMI, H.; ASAKAWA, T.; TERAO, J.; MATSUSHITA, S. - Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 2971 – 2975, 1984.

NIELSEN, I.L.; WILLIAMSON, G. - Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **Nutrition and cancer**, v. 57, p. 1-10, 2007.

ONozAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. - Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 360-363, 1998.

ORTNER, J.; ALBERT, M.; TERLER, K.; STEINER, W.; DAX, K. - Transglycosylation reactions with a crude culture filtrate from *Thermoascus aurantiacus*. **Carbohydrate Research**, v. 327, p.483–487, 2000.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.D; GOMES, E; DA-SILVA, R. - Purification and characterization of two β -glucosidases from thermophilic fungus *Thermonascus aurantiacus* Miede. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 685 – 690, 2002.

PALMERI, R.; SPAGNA, G. - β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 40, n. 3, p. 382-389, 2007.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. - Survey of isoflavone contents in Brazilian soybean. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.3, p.156-160, 2001.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. - Conversão de malonil-beta-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2002.

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

PASCUAL-TERESA, S.; HALLUND, J.; TALBOT, D.; SCHROOT, J.; WILLIAMS, C.M.; BUGEL, S.; CASSIDY, A. - Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, n. 4, p.257-64, 2006.

PETERSON, G.; BARNES, S. - Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **The Prostate**, v.22, n.4, p.335-345, 1993.

PISKULA, M. K.; YAMAKOSHI, J.; IWAI, Y.- Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. **FEBS Letters**, v.447, p. 287-291, 1999.

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

RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, .IZ.; GUNATA, Z.; BARRE, P. - Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p. 3607–3614, 1998.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. - Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 169–177, 2004.

SARNEY, D.B.; VULFSON, E.N. - Application of enzymes to the synthesis of surfactants. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.164–172, 1995.

SARRY, J.; GUNATA, Z. - Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SETCHELL, K.D.; LYDEKING-OLSEN, E. - Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. **American Journal Clinical Nutrition**, v.78, p.593–609, 2003.

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

WANG, H.; MURPHY, P. A.- Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42,p. 1666–1673, 1994.

WANG, L.;J.; SAITO, M.; TATSUMI, E.; LI. L.T.- . Anti-oxidative and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of sufu (fermented tofu) extracts. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 37, p. 129-132, 2003.

WANG, L.J.; YIN, L.; LI, D.; ZOU, L.; SAITO, M.; TATSUMI, E.; LI, L. - Influences of processing and NaCl supplementation on isoflavone contents and composition during douchi manufacturing. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1247-1253, 2007.

YAMABE, S.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; KANEKO, K.; ENDO, H.; TAKITA, T. – Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso. **Food Chemistry**, v.100, p.369-374, 2007.

YAN, T.R.. LIN, C.L - Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**., v. 61, p. 965–970, 1997.

YANG, S.; WANG, L.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LI, L. - Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable [beta]-glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p. 1247-1252, 2009.

YIN, L.J.; LI, L.T.; LI, Z.G.; TATSUMI, E.; SAITO, M. - Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. **Food Chemistry**, v.87, p. 587-592, 2004.

YUN, S.; JEONG, C.; CHUNG, D. CHOI, H.. - Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.