



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**



**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -
GLICOSIDASES FÚNGICAS E SUA AÇÃO SOBRE A HIDRÓLISE DE
AMIGDALINA, CELOBIOSE E P-NITROFENIL- β -GLUCOPIRANOSÍDEO.**

CAROLINA CASAGRANDE BEDANI
Bióloga

PROF^a DR^a HÉLIA HARUMI SATO
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas-SP
Junho/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B39p Bedani, Carolina Casagrande
Produção, caracterização e purificação de β -glicosidases fúngicas e sua ação sobre a hidrólise de amigdalina, celobiose e p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo /Carolina Casagrande Bedani. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Beta-glicosidase. 2. Caracterização. 3. Purificação. 4. *Aspergillus sp.* 5. Compostos cianogênicos. I. Sato, Helia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Production, characterization and purification of fungal β -glucosidases and their action in the hydrolysis of amygdalin, cellobiose and p-nitrophenyl- β -glucopyranoside

Palavras-chave em inglês (Keywords): β -glucosidase, Characterization, Purification, *Aspergillus sp.*, Cyanogenic compounds.

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi
Gabriela Alves Macedo
Luciana Francisco Fleuri

Data da defesa: 30/07/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em ___/___/___ por Carolina Casagrande Bedani aprovado pela comissão julgadora em ___/___/___.

Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DCA – UNICAMP

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DCA – UNICAMP

Membro

Prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri

Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Membro

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DTA – UNICAMP

Membro

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP

Membro

**Dedico, aos meus pais,
Antonio e Angela,
e ao meu noivo Paulo,
com muito amor.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter abençoado cada dia de dedicação a este trabalho, não permitindo que desanimasse diante dos obstáculos.

À Professora Dra. Hélia Harumi Sato pela orientação, apoio e confiança.

Aos membros da banca examinadora, Luciana, Gabriela, Pedro e Francisco, pelas valiosas sugestões que contribuíram para adequação e enriquecimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Priscila Hoffmann, Priscila Becker, Beatriz, Joelise, Marcela, Haroldo, Evandro, Márcio, Ana Luiza, Patrícia, Daniele, Janai, Gisele, Juliana, Paula, Viviane, Valdeci, Edi, Fabiano e Tatiana.

À estagiária Eloísa Sofia Serrano Robledo pela ajuda, dedicação e apoio.

Aos meus pais, Antonio e Angela, por me apoiarem sempre e pela educação, amor e incentivo.

Aos meus irmãos, Carlos e Cleber e à minha cunhada Araceli, pelo amor e pela ajuda em todos os momentos que precisei.

À toda minha família, pelo amor.

Ao meu noivo, Paulo, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, paciência e compreensão.

Às amigas Natália, Lidiane, Camila e Susana.

Aos colegas de trabalho em especial à Isabela, Vanina, Lílian, Vanessa e Kenzi pela compreensão, apoio e colaboração.

À Emulzint, pela oportunidade concedida e por contribuir com o crescimento profissional de seus colaboradores.

À todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, com sugestões, críticas e especialmente amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE FLUXOGRAMAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO 1	
ABSTRACT	3
1 Introdução	5
2 Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 β -glicosidases	6
2.2 Ação das β -glicosidases na conversão de celulose	8
2.3 Ação das β -glicosidases na degradação de compostos cianogênicos	10
2.4 Glicosídeos cianogênicos no maracujá ácido amarelo.....	14
2.5 β -glicosidases de origem microbiana	17
2.5.1 β -glicosidases de <i>Trichoderma viride</i>	18
2.5.2 β -glicosidases de <i>Aspergillus sp.</i>	19
2.5.3 β -glicosidases de <i>Mucor miehei</i>	22
2.5.4 β -glicosidases de <i>Penicillium sp.</i>	23
3 Material e Métodos.....	25
3.1 Produção de β -glicosidase em meio semi-sólido	25
3.1.1 Preparo dos meios de cultura.....	25
3.1.2 Fermentação e obtenção da enzima	25
3.2 Determinação da atividade da β -glicosidase em diferentes substratos.....	26

3.2.1	Determinação da atividade da β -glicosidase usando p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo.....	26
3.2.2	Determinação da atividade da β -glicosidase usando celbiose	27
3.2.3	Determinação da atividade da β -glicosidase usando amigdalina.....	27
3.4	Caracterização da enzima β -glicosidase.....	28
3.4.1	Determinação da temperatura ótima de atividade das β -glicosidases.....	28
3.4.2	Determinação do pH ótimo de atividade das β -glicosidases	29
3.4.3	Determinação da temperatura de estabilidade das β -glicosidases.....	30
3.4.4	Determinação do pH de estabilidade das β -glicosidases	30
3.5	Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp.	31
3.6	Fracionamento da enzima β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. com sulfato de amônio.....	31
3.7	Purificação da enzima β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. em coluna de DEAE-celulose.....	32
3.8	Eletroforese SDS-PAGE	32
3.9	Planejamento experimental para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. parcialmente purificada.	33
3.10	Planejamento experimental para a determinação do efeito do pH e temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. parcialmente purificada.....	33
4	Resultados e Discussão	35
4.1	Determinação da atividade das β -glicosidases sobre diferentes substratos.....	35

4.2	Determinação da atividade específica dos extratos enzimáticos brutos de β -glicosidase obtidos das linhagens de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i>	40
4.4	Caracterização da β -glicosidase do fungo <i>Trichoderma viride</i>	46
4.5	Caracterização da β -glicosidase do fungo <i>Penicillium</i> sp.....	50
4.6	Caracterização da β -glicosidase do fungo <i>Aspergillus</i> sp.	54
4.7	Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax da enzima β -glicosidase do fungo <i>Aspergillus</i> sp.	58
4.8	Características das β -glicosidases dos fungos estudados.....	60
4.9	Purificação da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp.	60
4.10	Eletroforese SDS-PAGE da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp.	63
4.11	Determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. parcialmente purificada.....	65
4.12	Determinação do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. parcialmente purificada.....	70
4.13	Determinação da atividade da β -glicosidase bruta e parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp. sobre diferentes substratos.....	74
5	Conclusões.....	75
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
7	Referências Bibliográficas.....	78
APÊNDICE a. Diluições dos extratos enzimáticos para os testes de caracterização da β -glicosidase bruta dos diferentes microrganismos.....		
		88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Celulose: polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glicose unidos por ligação β -1,4-glicosídica.....	9
Figura 2. Celobiose: dissacarídeo constituído de dois resíduos de D-glicose unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica.....	10
Figura 3. Reação de hidrólise da amigdalina até mandelonitrilo e posterior degradação	11
Figura 4. Produção de β -glicosidase pelas linhagens <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0 a 50°C).....	35
Figura 5. Produção de β -glucosidase pelas linhagens <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> fermentadas nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C).....	37
Figura 6. Produção da β -glicosidase pela linhagem <i>Aspergillus</i> sp. em meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C).....	37
Figura 7. Produção de β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se o substrato amigdalina em pH 5,0 a 50°C).....	39
Figura 8. Temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , utilizando-se p-NPG a pH 5,0.....	42
Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em pH 5,0	43
Figura 10. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , utilizando-se substrato p-NPG a 47°C.....	44
Figura 11. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> a 47°C	46

Figura 12. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de <i>Trichoderma viride</i> , utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0.	47
Figura 13. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Trichoderma viride</i> em pH 5,0.	48
Figura 14. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de <i>Trichoderma viride</i> , utilizando-se p-NPG a 45°C.	49
Figura 15. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de <i>Trichoderma viride</i> a 45°C.	49
Figura 16. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de <i>Penicillium sp.</i> , utilizando-se p-NPG em pH 5,0.	50
Figura 17. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Penicillium sp.</i> , utilizando-se p-NPG em pH 4,0.	52
Figura 18. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de <i>Penicillium sp.</i> , utilizando-se substrato p-NPG a 60°C.	53
Figura 19. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de <i>Penicillium sp.</i> a 60°C.	54
Figura 20. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> , utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0.	55
Figura 21. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> em pH 4,5.	56
Figura 22. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> , utilizando-se substrato p-NPG a 60°C.	57
Figura 23. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> a 60°C.	58
Figura 24. Efeito da concentração de p-NPG na atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> a 60°C e pH 4,5.	59
Figura 25. Purificação de β -glicosidase de <i>Aspergillus sp.</i> através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose.	61
Figura 26. Gel de eletroforese SDS-PAGE da β -glicosidase do extrato bruto, extrato obtido por precipitação com sulfato de amônio e parcialmente purificada de <i>Aspergillus sp.</i>	64

Figura 27. Determinação da massa molecular da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. por eletroforese SDS-PAGE	65
Figura 28. Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da temperatura e pH na atividade de β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp.	68
Figura 29. Superfície de resposta e curvas de contorno do efeito da temperatura e pH na estabilidade de β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp.	72

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Produção da enzima β -glicosidase.....	26
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de glicosídeos cianogênicos na casca de maracujá <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (CHASSAGNE <i>et al.</i> , 1996)	17
Tabela 2. Valores utilizados no planejamento experimental fatorial completo 2 ² para estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da β-glicosidase parcialmente purificada	33
Tabela 3. Valores utilizados no planejamento experimental fatorial completo 2 ² para estudo do efeito da temperatura e pH na estabilidade da β-glicosidase parcialmente purificada	34
Tabela 4. Produção de β-glicosidase pelos fungos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática determinada utilizando-se p-NPG em pH 5,0 a 50°C)	36
Tabela 5. Produção de β-glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> nos meios 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C)	38
Tabela 6. Produção de β-glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato amigdalina em pH 5,0 a 50°C).....	39
Tabela 7. Atividade específica dos extratos enzimáticos obtidos das fermentações das linhagens <i>Aspergillus</i> sp, <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> no meio de cultivo 3	41
Tabela 8. Características bioquímicas das β-glicosidases de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>Trichoderma viride</i> testadas utilizando-se p-NPG.....	60
Tabela 9. Purificação da β-glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp.....	62

Tabela 10. Planejamento experimental fatorial 2^2 para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp.	66
Tabela 11. Coeficientes de regressão a partir do modelo codificado para a atividade de β -glicosidase	67
Tabela 12. Análise de variância do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp.	67
Tabela 13. Planejamento experimental fatorial 2^2 para a determinação do pH e temperatura de estabilidade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. parcialmente purificada.	70
Tabela 14. Coeficientes de regressão a partir do modelo codificado para a atividade de β -glicosidase.....	71
Tabela 15. Análise de variância do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura de estabilidade da β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus</i> sp.	71
Tabela 16. Atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus</i> sp. do extrato bruto e do extrato parcialmente purificado sobre os substratos p-NPG, celobiose e amigdalina.....	74

RESUMO

As β -glicosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados a partir da extremidade não redutora. A enzima β -glicosidase apresenta inúmeras aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, atuando na hidrólise da celobiose em glicose, no processo de conversão da celulose em glicose em combinação com outras enzimas celulolíticas; na liberação de compostos de aroma em sucos de frutas e vinho; na hidrólise de compostos cianogênicos, presentes em plantas e resíduos agroindustriais e na transformação de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas, que podem ser utilizadas para reposição hormonal. Entre as linhagens de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* a primeira apresentou a maior produção de β -glicosidase. Na fermentação da linhagem *Aspergillus* sp. em meio semi sólido composto de farelo de trigo (Natur's): casca de maracujá: água destilada, na proporção 1:1:0,4; foram obtidos, respectivamente, 25,75 U/g, 45,88 U/g e 9,29 U/g de β -glicosidase utilizando-se os substratos p-NPG, celobiose e amigdalina, após 30 minutos a 50°C. A β -glicosidase bruta de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0 - 5,5 e uma fração com atividade em pH 7,0. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 45 - 50°C e mostrou-se estável a 45°C após 30 minutos de incubação em pH 5,0 e na faixa de pH 5,0 - 7,0 após 2 h a 47°C. A β -glicosidase bruta de *Penicillium* sp. apresentou atividade ótima em pH 4,0 a 50°C e a 60°C, evidenciando a presença de iso enzimas. Mostrou-se estável a 55°C após 30 minutos de incubação em pH 5,0 e apresentou maior estabilidade na faixa de pH 3,0 - 7,0 após 2 h a 60°C. A β -glicosidase bruta de *Trichoderma viride* mostrou atividade ótima em pH 5,0 - 5,5 e 45°C e mostrou-se estável a 45°C após 30 minutos de incubação em pH 5,0 e na faixa de pH 5,0 - 7,0 após 2 h a 45°C. A β -glicosidase bruta de *Aspergillus* sp. apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C, estabilidade a 60°C após 30 minutos de incubação em pH 4,5 e na faixa de pH 3,0 - 8,5 após 2 h de incubação a 60°C. A β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou valores de Km de 3,41 mM e Vmax de 72,46 μ mol p-

nitrofenol/mL.min para o substrato p-NPG. Após fracionamento com sulfato de amônio 80% e cromatografia em coluna DEAE-celulose, a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. foi parcialmente purificada cerca de 38 vezes com recuperação de 2,5%. Utilizando-se planejamento experimental a β -glicosidase parcialmente purificada apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C e estabilidade na faixa de pH de 3,6 - 5,0 e temperatura de 30 - 50°C após 2 h de incubação. A β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. apresentou atividade de hidrólise da celobiose, p-NPG e amigdalina.

Palavras Chave: β -glicosidase, caracterização, purificação, *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. e *Mucor miehei*.

ABSTRACT

The β -glucosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) catalyze the hydrolysis of disaccharides and conjugate glycosides from the non-reducing end. The β -glucosidases have several applications in the food and pharmaceutical industries such as the hydrolysis of cellobiose into glucose, the conversion of cellulose into glucose together with other cellulolytic enzymes; the release of flavour compounds into fruit juices and wine; the hydrolysis of cyanogenic compounds present in plants and agro-industrial residues and the conversion of isoflavone glycosides into the soy isoflavone aglycone, which can be used for hormone replacement. Of the strains *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. and *Trichoderma viride*, the first showed the greater production of β -glucosidase. In the fermentation by the *Aspergillus* sp. strain in a semi-solid medium containing wheat bran: passion fruit peel: distilled water, in a ratio of 1:1:0.4; 25.75 U/g, 45.88 U/g and 9.29 U/g of β -glucosidase were obtained, respectively, using p-NPG, amygdalin and cellobiose as the substrate, after 30 minutes at 50°C. The crude β -glucosidase obtained from *Aspergillus oryzae* showed a fraction with optimal activity at pH 5.0 – 5.5, and another fraction with activity at pH 7.0. The enzymes showed optimum activity in the temperature range from 45 to 50°C and were stable after 30 minutes of incubation at 45°C and pH 5.0, and also after 2 hours at 47°C in the pH range from 5.0 to 7.0. The crude β -glucosidase from *Penicillium* sp. showed optimal activity at pH 4.0 and isoenzymes with optimal activity at 50°C and 60°C. The enzymes showed stability after 30 minutes of incubation at 55°C and pH 5.0, and were stable in the pH range from pH 3.0 to 7.0 after 2 hours at 60°C. The crude β -glucosidase from *Trichoderma viride* showed optimal activity in the pH range from 5.0 to 5.5 at 45°C; stability after 30 minutes of incubation at 45°C and pH 5.0 and stability in the pH range from 5.0 to 7.0 after 2 hours at 45°C. The crude β -glucosidase from *Aspergillus* sp. showed optimal activity at pH 4.5 and 60°C; stability after 30 minutes of incubation at 60°C and pH 4.5, and stability in the pH range from 3.0 to 8.5 after 2 hours of incubation at 60°C. The β -glucosidase from *Aspergillus* sp. showed a Km value of 3.41 mM

and V_{max} of 72.46 $\mu\text{mol p-nitrophenyl/mL}\cdot\text{min}$ with p-NPG as the substrate. After fractionation with 80% ammonium sulphate and chromatography on a DEAE-cellulose column, the β -glucosidase from *Aspergillus* sp. was purified 38 fold with a recovery of 2.5%. Using an experimental design the partially purified β -glucosidase showed optimal activity at pH 4.5 and 60°C, and stability in the pH range from 3.6 to 5.0 and temperature range from 30°- 50°C, after 2 hours of incubation. The partially purified β -glucosidase from *Aspergillus* sp. showed hydrolytic activity with respect to cellobiose, p-NPG and amygdalin.

Keywords: β -glucosidase, characterization, purification, *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp and *Mucor miehei*.

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados a partir da extremidade não redutora. Esta enzima pertence ao complexo celulase, e hidrolisa celuloligossacarídeos e celobiose em glicose (BHIRI, 2008). Além disso, catalisa o rompimento da ligação β -glicosídica presente em alquil e aril-glicosídeos.

Esta enzima é produzida por fungos, bactérias e plantas e dependendo da fonte, as β -glicosidases apresentam diferentes características bioquímicas e afinidades em relação aos substratos.

As β -glicosidases apresentam inúmeras aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, atuando na hidrólise de celobiose em glicose, no processo de transformação de materiais celulósicos para produção de etanol de segunda geração (SONIA *et al.*, 2008); na liberação de compostos de aroma em sucos de frutas e vinho (POGORZELSKI; WILKOWSKA, 2007); na hidrólise de compostos cianogênicos presentes em plantas e resíduos agroindustriais (CHASSAGNE *et al.*, 1999); na síntese de alquil e aril glicosídeos, surfactantes não-iônicos com atividade antimicrobiana e biodegradabilidade (SATHISHKUMAR *et al.*, 2008) e na transformação de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas, as quais podem ser utilizadas para reposição hormonal (KAYA *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi testar a produção de β -glicosidase pelas linhagens *Aspergillus sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium sp.* e *Trichoderma viride* e selecionar uma linhagem de fungo altamente produtora de β -glicosidase capaz de hidrolisar β -glicosídeos, como celobiose e amigdalina e com características bioquímicas que permitam sua aplicação industrial como na hidrólise de celobiose em glicose, no processo de hidrólise enzimática de materiais celulósicos e na degradação de compostos cianogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -glicosidases

As β -glicosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1..21) catalisam a clivagem da ligação β -glicosídica entre resíduos glicona ou entre glicose e um aril ou alquil glicona.

A β -glicosidase constitui o principal grupo entre as glicosídeos hidrolases e encontra-se amplamente distribuída nos organismos vivos, sendo produzida por fungos, bactérias, plantas e animais.

Geralmente as β -glicosidases são ativas em pH 5,0 e apresentam menor atividade em pH igual ou inferior 4,0 (SONIA *et al.*, 2008). Dependendo da fonte as β -glicosidases apresentam diferentes afinidades em relação aos substratos.

As β -glicosidases têm papel importante em vários processos biológicos, como na conversão de biomassa de celulose por microrganismos e insetos, na biogênese de metabólitos secundários funcionais como fitohormônios, terpenóis e flavonóides e na degradação de metabólitos nocivos como as glicosilceramidas (LANGSTON *et al.*, 2006).

Especificamente nas plantas, esta enzima está envolvida na defesa contra patógenos e na ativação da produção de fitohormônios, que são necessários para o crescimento e desenvolvimento (BHIRI *et al.*, 2008).

A enzima β -glicosidase apresenta grande potencial de aplicação em diversos setores, por exemplo:

- Na indústria alimentícia pode ser utilizada na hidrólise de compostos amargos, como naringina e prunina, durante a extração de sucos de frutas cítricas (BHIRI *et al.*, 2008).
- As β -glicosidases podem ser utilizadas na liberação dos compostos do aroma a partir de precursores glicosídeos presentes em vinhos e sucos de frutas, melhorando assim as qualidades organolépticas (POGORZELSKI; WILKOWSKA, 2007; GUNATA *et al.*, 1993). Em um estudo da ação das β -glicosidases

proveniente de diferentes fontes verificou-se que a enzima purificada do *Aspergillus niger* aumentou a quantidade de *trans*-resveratrol em vinhos sicilianos em 75%, sem mudar significativamente as propriedades físico-químicas nem as propriedades organolépticas (TODARO *et al.*, 2008). Desta forma, na indústria de vinhos podem ser utilizadas as β -glicosidases exógenas de fungos filamentosos e leveduras com a finalidade de aumentar as qualidades organolépticas, por meio da liberação de precursores de aroma. As enzimas comumente utilizadas são as do fungo *Aspergillus niger*, sendo que as enzimas extracelulares de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são citadas como enzimas que apresentam propriedades interessantes e aplicação potencial na indústria, em especial, na produção de aromas de vinhos e sucos (POGORZELSKI; WILKOWSKA, 2007). Industrialmente as preparações comerciais de β -glicosidases de *Aspergillus niger* tem sido utilizadas devido à sua elevada estabilidade em pH ácido dos sucos de frutas e à sua termotolerância (POGORZELSKI; WILKOWSKA, 2007).

- Podem ser empregadas na síntese de alquil e aril β -glicosídeos a partir de polissacarídeos e seus derivados com álcoois por hidrólise reversa ou trans-glicosilação (BHIRI, 2008; SATHISHKUMAR *et al.*, 2008). Alquil glicosídeos, surfactantes não iônicos com propriedades antimicrobianas e de biodegradabilidade, podem ser utilizados em detergentes, alimentos e medicamentos (SATHISHKUMAR *et al.*, 2008).

- Na produção de isoflavonas agliconas a partir de isoflavonas glicosiladas presentes nos grãos de soja. As isoflavonas são homólogos estruturais do estrógeno humano que podem ser utilizados como suplemento hormonal, tendo um importante interesse farmacêutico. Por exemplo, KAYA *et al.*, 2008 estudaram a transformação de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas utilizando β -glicosidases do fungo *Aspergillus oryzae*, e verificaram que as três β -glicosidases produzidas pelo fungo hidrolisaram eficientemente as isoflavonas glicosiladas, no entanto, uma das isoenzimas apresentou maior atividade e especificidade. CHUN; KIM e KIM (2008) verificaram que as β -glicosidases de *Weissella* sp. apresentou uma taxa de hidrólise de isoflavonas de 98%-99%.

- As β -glicosidasas tem função importante na atuação do complexo de celulases na degradação de biomassa de resíduos agrícolas, pois a enzima hidrolisa a celobiose em glicose, a partir da qual pode ser produzido o combustível etanol. São especialmente importantes aquelas β -glicosidasas que não são afetadas pela concentração do produto, ou seja, são ativas a altas concentrações de glicose, e aquelas ativas em valores de pH ácidos (SONIA *et al.*, 2008).

2.2 Ação das β -glicosidasas na conversão de celulose

Na hidrólise da celulose em glicose por enzimas microbianas, as β -glicosidasas têm papel importante na hidrólise de celobiose em glicose e têm sido bastante estudadas considerando-se a abundância de materiais celulósicos renováveis que podem ser convertidos em etanol no futuro.

A celulose (Figura 2) é o constituinte principal da parede celular das plantas e é um polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glicose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas (BHIRI *et al.*, 2008). A celulose pode ser usada em processos biotecnológicos, como na produção de etanol, o que poderia representar uma nova e mais barata fonte de obtenção desse insumo (FLACHNER; RÉCZEY, 2004).

A degradação de materiais celulósicos é realizada pelo complexo celulase, produzido por bactérias e fungos, que hidrolisam a celulose cristalina em oligossacarídeos hidrolisáveis e celobiose até a obtenção de glicose pela ação sinérgica de três grupos de enzimas principais: exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), endoglucanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidasas (FLACHNER; RÉCZEY, 2004; CHAUVE *et al.*, 2010; QIN *et al.*, 2010).

As β -glicosidasas possuem um papel muito importante na degradação de celulose, pois além de fazer parte do complexo que degrada a celulose, é a enzima que limita o processo. Elevada concentração de β -glicosidase é necessária para evitar o acúmulo de celobiose, um forte inibidor das endoglucanases e exoglucanases (FLACHNER; RÉCZEY, 2004).

A degradação da celulose é feita através dos seguintes passos (BHIRI *et al.*, 2008; CHAUVE *et al.*, 2010; BOM *et al.*, 2008):

- No primeiro passo da sacarificação dos materiais celulósicos as enzimas endo e exo- β -1,4-D-glucanases atuam sinergisticamente quebrando as ligações β -1,4-glicosídicas. As endoglucanases hidrolisam randomicamente as ligações β -1,4-glicosídicas das regiões internas das moléculas de celulose, tendo mais afinidade pelas regiões amorfas, produzindo celuloligossacarídeos com diversos graus de polimerização, que serão hidrolisados pelas enzimas exoglucanases, formando o dissacarídeo celobiose (BHIRI *et al.*, 2008; CHAUVE *et al.*, 2010; BOM *et al.*, 2008).

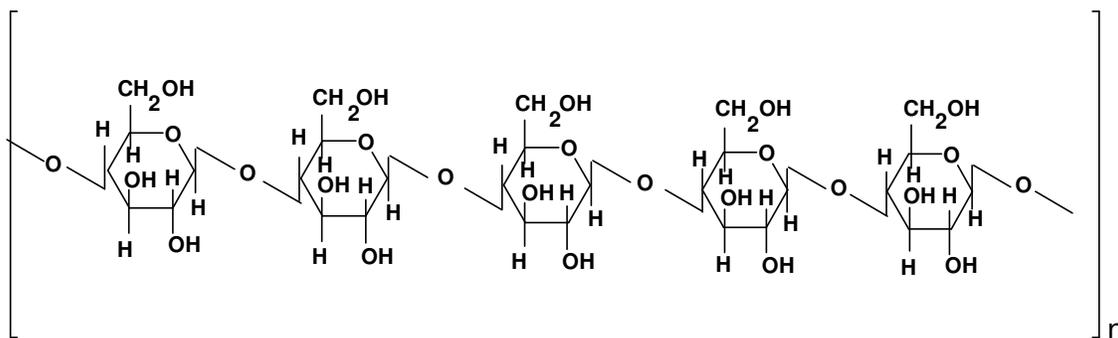


Figura 1. Celulose: polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glicose unidos por ligação β -1,4-glicosídica.

- No segundo passo a β -glicosidase hidrolisa as ligações β -glicosídicas da celobiose (Figura 2) a partir do terminal não redutor liberando glicose como produto final. Ao degradar a celobiose até glicose, a enzima β -glicosidase contribui para diminuir a ação inibidora deste composto sobre as celulasas (BHIRI *et al.*, 2008; CHAUVE *et al.*, 2010; BOM *et al.*, 2008).

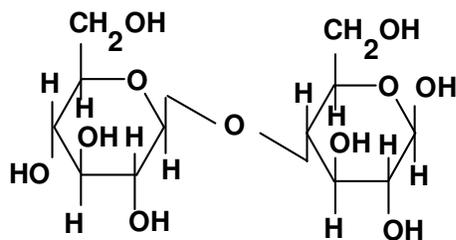


Figura 2. Celobiose: dissacarídeo constituído de dois resíduos de D-glicose unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica.

Microrganismos, como fungos e bactérias, são importantes produtores de celulase (SILVA *et al.*, 2009; KARBOUNE; GERARD; KERMASHA, 2008; SHEN *et al.*, 2008; KOVÁCS *et al.*, 2008). Os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* são capazes de produzir grandes quantidades do complexo celulase (KARBOUNE; GERARD; KERMASHA, 2008).

No reino Fungi existem várias espécies capazes de degradar celulose, embora poucos fungos produzam enzimas celulolíticas em grande quantidade e com características desejáveis (estabilidade e atividade em alta temperatura, ampla faixa de pH e não susceptíveis a inibição pelo produto) (QIN *et al.*, 2010). Entre os melhores produtores encontram-se espécies pertencentes aos gêneros: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Curvallaria*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phoma*, *Saprolegnia*, *Sporotrichium* e *Stachybotris* (LINARDI, 1998).

2.3 Ação das β -glicosidases na degradação de compostos cianogênicos

As β -glicosidases de origem microbiana representam uma solução para desintoxicação de alimentos que apresentam compostos cianogênicos (PADMAJA, 1995).

Os glicosídeos cianogênicos são resultantes do metabolismo secundário natural das plantas. Estes compostos são formados por uma aglicona do tipo α -hidroxinitrila unida por uma β -ligação a uma molécula de açúcar (geralmente, D-glicose), hidrolisável por β -glicosidases (VETTER, 2000). Quando o açúcar é removido a aglicona transforma-se em uma cianohidrina que por ser instável se degrada produzindo cianeto de hidrogênio e um composto carbonílico (Figura 3).

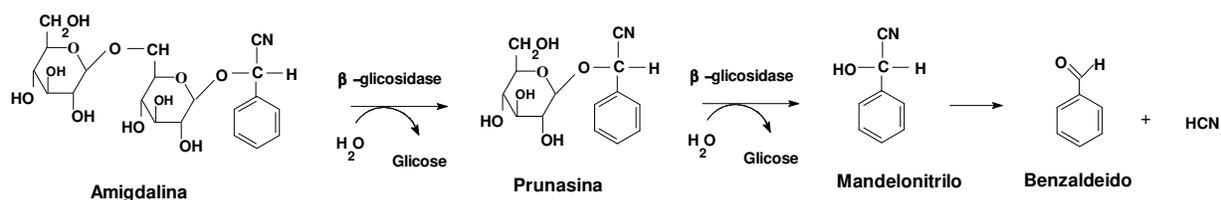


Figura 3. Reação de hidrólise da amigdalina até mandelonitrilo e posterior degradação

A aglicona dos compostos cianogênicos pode ser alifática, aromática ou ciclopentanóide, dependendo do aminoácido precursor (valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina ou leucina). A maioria destes glicosídeos são derivados de monossacarídeos, como linamarina, dhurrina, ou prunasina, nos quais a molécula instável cianohidrina é estabilizada por uma ligação glicosídica a um resíduo simples de açúcar. No entanto, derivados de dissacarídeos e trissacarídeos têm sido identificados, como amigdalina, vicianina e xerantina, onde duas ou três moléculas de açúcar, respectivamente, estão envolvidas na estabilização (POULTON, 1990; CONN, 1980; VETTER, 2000).

A distribuição de glicosídeos cianogênicos no reino vegetal é relativamente ampla. A produção de compostos cianogênicos tem sido detectada em cerca de 3.000 espécies de plantas de 110 famílias (POULTON, 1990) entre elas espécies de maracujá.

Plantas que contém glicosídeos cianogênicos são consideradas tóxicas, pois quando os tecidos das plantas cianogênicas são rompidos, pela ação de herbívoros, por exemplo, os compostos cianogênicos endógenos entram em

contato com β -glicosidases, que hidrolisam as moléculas, liberando cianeto de hidrogênio (HCN) no tecido danificado (MOLLER; SEIGLER, 1999; GLEADOW *et al.*, 2003).

Os glicosídeos cianogênicos são considerados perigosos à saúde, devido à produção de HCN por hidrólise (espontânea ou enzimática). Este processo é iniciado com o rompimento do tecido vegetal, onde as β -glicosidases endógenas do vegetal ou produzidas por microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos mamíferos promovem a clivagem das ligações β -glicosídicas dos compostos cianogênicos, produzindo a cianohidrina que libera HCN, aldeídos ou cetonas (GLEADOW; WOODROW, 2000).

Em animais, a toxicidade aos glicosídeos cianogênicos, difere conforme a sensibilidade da espécie animal, a dose do composto na planta e a taxa de produção de HCN a partir dos glicosídeos cianogênicos, entre outros (VETTER, 2000).

Devido à sua toxicidade, glicosídeos cianogênicos agem como um sistema de defesa da planta contra patógenos, parasitas e herbívoros, incluindo mamíferos, insetos e moluscos (KAKES, 1990).

A liberação de HCN por glicosídeos cianogênicos pode causar envenenamento crônico em humanos e animais (MLINGI *et al.*, 1992; OSUNTOK, 1994; TYLLESKÄR, 1994).

Diversos casos de envenenamento pelo consumo de alimentos que contêm compostos cianogênicos têm sido descritos. Os principais sintomas clínicos são dores abdominais, vômito, confusão mental, paralisia muscular e disfunção respiratória podendo ocasionar falência renal e parada cardíaca e respiratória (MONTGOMERY, 1969; JONES, 1998; VETTER, 2000). Várias mortes por intoxicação aguda também são relatadas. A intoxicação de animais por plantas contendo compostos cianogênicos provoca fraqueza, dispnéia, ansiedade, tremores musculares e descoordenação (RADI; STYER; THOMPSON, 2004; NOBREGA, 2006).

Devido ao poderoso efeito citotóxico dos compostos cianogênicos e ao grave problema do envenenamento agudo, existe uma constante e inevitável

especulação sobre os danos provocados por uma ingestão contínua em baixas concentrações destes compostos (MATSUURA, 2005).

Em geral, plantas que contém 20mg de HCN/100g de peso fresco são consideradas tóxicas (MORAN, 1954), no entanto uma quantidade de 10mg de HCN/100g em mandioca foi considerado perigosamente venenoso por BOLHUIS (1954). A dose letal de HCN em humanos foi estimada entre 0,5 mg/kg e 3,5 mg/kg de peso corpóreo (MONTGOMERY, 1969).

O cianeto de hidrogênio é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e produz sintomas característicos conforme a ingestão em doses subletais e letais. A ingestão em doses letais resulta em morte, devido à condição anóxica provocada pela inibição da citocromo oxidase pelo cianeto. Quando doses subletais de cianeto são consumidas, a inibição da respiração celular pode ser revertida devido às trocas respiratórias ou pelo processo de detoxificação, através da reação com tiosulfato para formação de tiocinato, que é excretado pela urina (EMINEDOKI *et al.*, 1994).

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para estudar estes compostos. O cianeto de hidrogênio e a glicose liberados por hidrólise enzimática podem ser determinados através de ensaios colorimétricos (LAMBERT, 1975; BRIMER; ROSLING, 1993) e titulação com nitrato de prata (BERENGUER-NAVARRO *et al.*, 2002). Métodos cromatográficos, principalmente HPLC, têm sido utilizados para determinação direta dos compostos cianogênicos (CAIRNS *et al.*, 1978; STOCHMAL; OLESZEK, 1994).

Aproximadamente 75 glicosídeos cianogênicos têm sido identificados em plantas, incluindo plantas comestíveis como mandioca brava, feijão de lima, sorgo e maracujá (CHASSAGNE *et al.*, 1996). Estão presentes especialmente em raízes, tubérculos, sementes e frutos, sendo consumidos como alimento em diversos locais do mundo (CONN, 1980). Nutricionalmente, o composto cianogênico mais importante e mais conhecido é a linamarina encontrada em *Manihot esculenta* (mandioca) (NOUT; TUNCEL; BRIMER, 1995).

Devido à toxicidade dos glicosídeos cianogênicos, métodos de processamento que hidrolisam ou removem estes compostos têm sido desenvolvidos. A

degradação enzimática e microbiológica de compostos cianogênicos durante o processamento de alimento tem se tornado de grande interesse, sendo o objetivo de diversas pesquisas (REDDY; PIERSON, 1994; NOUT; TUNCEL; BRIMER, 1995).

A distribuição e a atividade dos glicosídeos cianogênicos e das enzimas β -glicosidases podem variar entre as plantas e os diferentes órgãos e tecidos de uma mesma planta, além de poderem existir diferenças nos níveis de β -glicosidases em tecidos específicos de um mesmo órgão da planta, como é o caso da linamarase e linamarina da mandioca (BRADBURY *et al.*, 1991).

A compartimentalização nos tecidos celulares dos glicosídeos cianogênicos e das enzimas envolvidas em sua hidrólise previne a hidrólise em larga escala nos tecidos intactos da planta (VETTER, 2000), com a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos ocorrendo rapidamente após o tecido vegetal ser rompido por herbívoros, por ataque de fungos ou por meios mecânicos (POULTON, 1990). A atividade das enzimas β -glicosidases sobre os glicosídeos cianogênicos também pode ser controlada por inibidores endógenos, evitando-se a hidrólise desses glicosídeos (MIDIO; MARTINS, 2000).

A degradação da amigdalina pode ocorrer por diferentes mecanismos e envolver mais de uma β -glicosidase. A rota principal envolve a produção de prunasina como composto intermediário da reação e em uma segunda etapa, mais lenta, a prunasina é convertida em cianohidrina (Figura 3) (BRIMER; NOUT; TUNCEL, 1998; BRIMER *et al.*, 1998).

2.4 Glicosídeos cianogênicos no maracujá ácido amarelo

O maracujá ácido amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) pertence ao gênero *Passiflora* da família *Passifloraceae*. As espécies que pertencem a este gênero são originárias da América tropical e encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004).

Em particular, as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* têm sido amplamente estudadas pela sua utilização na alimentação humana,

encontrando-se diversos estudos científicos sobre seu conteúdo alimentício e os seus componentes químicos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Além da sua utilização como alimento, esta planta é também cultivada para fins medicinais pela extração de passiflorina, um calmante natural e para fins ornamentais por suas flores exóticas (MELETTI; MAIA, 1999).

Os frutos do maracujazeiro são principalmente utilizados para produção industrializada de suco concentrado, sendo o Brasil o principal produtor e exportador no mundo. Desta produção industrial sobram como resíduos grandes volumes de cascas e sementes. Cascas (epicarpo), albedo (pericarpo) e sementes de maracujá, resíduos industriais provenientes do processo de esmagamento da fruta para obtenção do suco, representam 65 a 70% do peso do fruto, que não são aproveitados normalmente, implicando na formação de resíduos agroindustriais constituindo um grande problema para o meio ambiente (OLIVEIRA, 2002). Atualmente, estes resíduos são utilizados por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda sem muita informação técnica adequada sobre a toxicidade dos compostos cianogênicos presentes nestes resíduos (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004).

As sementes, no maracujá, representam cerca de 6 a 12% do peso total do fruto e podem ser boas fontes de óleo, carboidratos, proteínas e minerais, apesar do alto conteúdo de celulose e lignina que podem limitar seu uso na alimentação animal. Em 2004, FERRARI *et al.*, estudaram o valor nutricional das sementes e sugeriram que estas podem ser transformadas em produtos de valor econômico, pois contêm fibras e ácidos graxos insaturados que permitem seu aproveitamento na alimentação humana e animal assim como na indústria de cosméticos.

O albedo corresponde cerca de 12 a 32% do peso total do fruto maduro (LIPITOA; ROBERTSON, 1977; MACHADO *et al.*, 2003) contém, em base seca, elevado teor de carboidratos e consideráveis quantidades de proteína e minerais, como potássio e cálcio (MATSUURA; 2005). A casca da fruta poderia ser utilizada como fonte de pectina altamente esterificada na indústria de alimentos.

Entre os constituintes químicos das espécies do gênero *Passiflora* encontram-se alcalóides, fenóis e glicosídeos flavonóides e cianogênicos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

A planta *Passiflora edulis* foi primeiramente identificada como cianogênica em 1919 por Rosenthaler, conforme SPENCER e SEIGLER (1983).

SPENCER e SEIGLER (1983) estudaram a cianogênese em plantas Passifloraceae e encontraram níveis significativos de compostos cianogênicos em todas as partes da planta (incluindo frutos maduros), exceto nas sementes. O fruto retém quantidades significativas de cianeto mesmo maduro, porém o teor de cianeto diminui com a maturação. Os métodos de processamento atuais trituram os tecidos das plantas e conseqüentemente misturam os compostos cianogênicos com as β -glicosidases, que hidrolisam estes compostos, liberando a maior parte do HCN produzido para a atmosfera. Os autores isolaram o composto prunasina [2 (R)-(β -D-glucolyloxy)-2-phenylacetonitrile] em *P. edulis* Sims. (maracujá roxo) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo).

Frutos não maduros do gênero são frequentemente tóxicos e seu consumo pode ser fatal (SAENZ; NASSAR, 1972). Estudos recomendam determinar os níveis de HCN presentes no maracujá, com o objetivo de determinar o potencial tóxico do HCN neste fruto.

CHASSAGNE *et al.* (1996, 1998, 1999) estudaram amplamente a presença de glicosídeos cianogênicos em varias espécies comestíveis de *Passiflora*; e identificaram além da prunasina, outros glicosídeos cianogênicos como amigdalina e sambunigrina. O composto mais importante encontrado na casca do fruto foi prunasina (285 mg/Kg em *P. edulis* f. *flavicarpa*), representando 80% dos glicosídeos cianogênicos (Tabela 1). A quantidade de prunasina encontrada no suco foi 5 vezes menor do que a encontrada na casca. A quantidade de amigdalina (31mg/Kg em *P. edulis*) e outros dois compostos isômeros, identificados como mandelonitrile rhamnopiranosil β - D-glucopiranosideo, foram maiores no suco (99mg/Kg em *P. edulis* f. *flavicarpa*) do que na casca. Foram encontradas diferentes quantidades de sambunigrina no suco e na casca, sendo

0,4 mg/Kg no suco de maracujá roxo (*P. edulis*) e 15,5 mg/Kg na casca de maracujá amarelo (azedo).

Tabela 1. Conteúdo de glicosídeos cianogênicos na casca de maracujá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (CHASSAGNE *et al.*, 1996)

Glicosídeo	Conteúdo na casca (mg/Kg)
Prunasina	286,9 ± 8,8
Mandelonitrilo rutinosídeo	62,1 ± 2,5
Sambunigrina	15,7 ± 0,2
Amigdalina	1,4 ± 0,2

CHASSAGNE *et al.* (1999) estudaram a hidrólise enzimática de glicosídeos de maracujá, demonstrando que a maioria dos glicosídeos voláteis presentes no maracujá, podem ser hidrolisados pelas seguintes enzimas: α -L-rhamnosidase; α -L-arabinofuranosidase; α -L-arabinopiranosidase e β -D-glucosidase.

2.5 β -glicosidases de origem microbiana

Diversos estudos têm associado à degradação de compostos cianogênicos por espécies do reino fungi, como *Mucor circinelloides*, *Penicillium aurantiogriseum* (BRIMER *et al.*, 1998) e *Rhizopus oligosporus* (TUNCEL; NOUT; BRIMER, 1998). O uso de enzimas de origem microbiana resulta em uma possível aceleração na desintoxicação de compostos cianogênicos (BRIMER *et al.*, 1998).

A habilidade de decomposição da amigdalina por diversos fungos, bactérias e leveduras foi testada por TUNCEL, NOUT e BRIMER (1998). *Bacillus* sp. B4 e B6 promoveram significativa remoção do cianeto e *Endomyces fibuliger* apresentou ótimos resultados, removendo completamente o cianeto após três dias de incubação.

PETRUCCIOLI *et al.* (1999) estudaram a otimização da produção e propriedades das β -glicosidases linamarase e amigdalase, extracelulares, de *Penicillium aurantiogriseum* P 35, que apresentaram elevada termoestabilidade, meia vida prolongada e ampla especificidade em relação aos glicosídeos cianogênicos, sugerindo a utilização nos processos de desintoxicação de raízes de mandioca e sementes de abricó.

As linhagens dos fungos *Mucor circinelloides* LU M 40 e *Penicillium aurantiogriseum* P 35 produzem β -glicosidases extracelulares que são ativas sobre o glicosídeo cianogênico amigdalina (BRIMER *et al.*, 1998).

Ruminantes são suscetíveis à intoxicação por compostos cianogênicos. Diversas bactérias presentes no rúmen possuem a habilidade de liberar o HCN de glicosídeos como amigdalina, prunasina e linamarina. WULFF-STROBEL e WILSON (1995) descreveram a clonagem, sequenciamento e caracterização de β -glicosidase de *Prevotella ruminicola*, uma bactéria gram-negativa e anaeróbica do trato gastrointestinal de animais ruminantes. A enzima apresentou alta atividade em dextrinas de celulose e p-nitrofenil β -D-glucosídeo e cerca de 70% da atividade sobre os substratos arbutina e prunasina e menor atividade sobre os substratos celobiose, amigdalina e gentobiose, indicando ação de outras enzimas do rúmen na hidrólise de compostos cianogênicos.

São conhecidas espécies de fungos que são eficientes produtores de β -glicosidase, alguns deles produzem múltiplas β -glicosidases. Por exemplo, o fungo *Aspergillus tubingensis* produz quatro delas e o fungo *Trichoderma reesei* produz sete isoenzimas (SONIA *et al.*, 2008).

2.5.1 β -glicosidases de *Trichoderma viride*

Fungo pertencente ao filo *Ascomycota*. O fungo *Trichoderma viride* é um bom produtor do complexo celulase sendo capaz de hidrolisar totalmente a celulose até glicose (LINARDI, 1998). As β -glicosidases produzidas pelos fungos do gênero

Trichoderma têm sido amplamente estudadas, principalmente a enzima do *Trichoderma reesei*, mas no complexo celulase produzem baixa atividade de β -glicosidase que são insuficientes para a sacarificação eficiente (FLACHNER; RÉCZEY, 2004).

Em um estudo desenvolvido por CHEN, HAYN e ESTERBAUER (1992), foram purificadas e caracterizadas duas β -glicosidases extracelulares do fungo *Trichoderma reesei*. Os autores verificaram-se a presença majoritária da isoenzima β -glicosidase I, que apresentou massa molecular 71 kDa, ponto isoelétrico igual a pH 8,7 e atividade ótima em pH 4,6 e na faixa de 65-70°C; enquanto a isoenzima minoritária, β -glicosidase II, apresentou 114 kDa, ponto isoelétrico em pH 4,8 e atividade ótima em pH 4,0 e a 60°C. Além da purificação e caracterização, foi também testado o efeito de inibidores e constatou-se que as duas isoenzimas foram inibidas competitivamente por glicose, *deoxynojirimycin* (3,4,5-piperidinetriol, 2-(hydroxymethyl); C₆H₁₃NO₄), um antibiótico inibidor de glucosidase e gluconolactona.

2.5.2 β -glicosidases de *Aspergillus* sp.

As espécies que pertencem ao gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos do filo *Ascomycota*. O *Aspergillus oryzae* produz α -amilases, proteases, celulases e outras enzimas e é utilizado na culinária japonesa, há mais de 1.000 anos, na produção de sakê, shoyo e missô. Assim, este fungo pode ser utilizado na produção em grande escala de proteínas e enzimas (TANIWAKI e Da SILVIA, 1996).

Encontram-se vários estudos sobre a produção de β -glicosidase por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, inclusive a enzima do *Aspergillus niger* é comercializada (Cellobiase – C6105 pela Sigma Aldrich). FLACHNER e RÉCZEY (2004) estudaram a produção da enzima por espécies deste gênero (*A. phoenicis*, *A. niger*, *A. foetidus*), e verificaram que a produção era 4,8 vezes maior que a do fungo *Trichoderma reesei* e que além disso as β -glicosidases de *Aspergillus*

estudadas hidrolisaram a celobiose mais eficientemente que a do *T. reesei*. Os pesquisadores estudaram a cinética das β -glicosidases de diferentes fungos e obtiveram os seguintes valores de K_m (mMol L⁻¹) para o substrato p-NPG: *A. phoenicus* ATCC-1315B: 2,18; *A. niger* BKM F-1305: 2,3; *A. foetidus* Biogal 39: 2,54; *A. phoenicis* QM 329: 2,29; *T. reesei* RUT C-30: 0,08.

JÄGER *et al.* (2001) estudaram a produção de β -glicosidase pelas espécies *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius* e verificaram que cada espécie produzia uma única β -glicosidase acídica, mas apresentavam diferenças quanto à produção da enzima. Os pesquisadores estudaram duas fontes de carbono diferentes: glicose e farelo de trigo. *A. phoenicis* apresentou-se como o melhor fungo produtor de β -glicosidase quando utilizou-se glicose como fonte de carbono e *A. niger* quando utilizou-se farelo de trigo. *A. carbonarius* teve a produção menos eficiente dos três fungos estudados. No entanto, as enzimas das três espécies apresentaram características similares; todas as enzimas apresentaram temperatura ótima de atividade a 60°C; pH ótimo de atividade entre 4,5 - 5,0 e ponto isoelétrico ácido. Não apresentaram diferenças no comportamento em relação à variação do pH e da temperatura, e todas hidrolisaram mais eficientemente o p-NPG do que a celobiose.

LANGSTON *et al.* (2006) verificaram que a β -glicosidase do fungo *Aspergillus oryzae* apresentou atividade ótima a 60°C e pH 5,0. No estudo de cinética enzimática a β -glicosidase apresentou comportamento tipo Michaelis-Menten até [pNPG] ~ 0,44 mMol/L, sendo que o aumento da concentração de substrato resultou em diminuição na velocidade. Foi obtido valor de K_m igual a $0,29 \pm 0,03$ mMol/L para p-NPG.

GÜNATA e VALLIER (1999) estudaram a produção de β -glicosidases tolerantes a altas concentrações de glicose por *Aspergillus niger* (CBS 55464 e 420) e *Aspergillus oryzae* (CBS 12559), induzida por quercetina. No estudo constatou-se a presença de duas isoenzimas no extrato de cada fungo. Apenas a isoenzima minoritária do *A. oryzae* apresentou elevada tolerância a altas concentrações de glicose. Esta enzima apresentou faixa de pH ótimo entre 4,5 -

6,0 e boa estabilidade ao pH sendo que não ocorreu perda na atividade após 24 horas de incubação a 20°C nos valores de pH 3,0; 6,0 e 7,0.

TSONG-RONG *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram a β -glicosidase II do fungo *A. niger*, com alta atividade de hidrólise e transglicosilação. A enzima apresentou ponto isoelétrico igual a 4,0 e atividade ótima em pH 4,5 e 60°C. A enzima apresentou-se estável na faixa de pH entre 4,0 – 6,5, diminuindo rapidamente a sua atividade em valores maiores de 7,0 e menores de 4,0. A enzima mostrou-se estável após tratamento térmico a 60°C, perdendo 50% após 10 minutos de tratamento a 70°C. No estudo de cinética enzimática utilizando-se p-nitrofenil- β -D-glicosídeo obteve-se valor de Vmax igual a 10,2 U/mg e Km igual a 2,2 mMol/L. Além disso, constatou-se que a enzima foi inibida completamente por 5,0 mMol/L de Fe²⁺, altamente inibida por excesso de 7,5 mMol/L de p-NPG e 50 mMol/L de substrato celobiose; enquanto que metanol (20% v/v) estimulou a atividade enzimática em 1,8 vezes.

ZHANG *et al.* (2007) caracterizaram e purificaram uma β -D-glicosidase da linhagem *Aspergillus oryzae* sp. 100 capaz de hidrolisar a ligação β -D-glicosídica do substrato *piceid* (2-[3-hidroxi – 5[(E)-2-2(4-hidroxifenil) etil] fenoxi] -6-(hidroximetil) oxane 3,4,5 – triol; C₂₀H₂₂O₈), um derivado de resveratrol encontrado em suco de fruta, e produzir resveratrol. A enzima apresentou atividade ótima a pH 5,0 e 60°C, mostrou-se estável até 60°C após tratamento térmico por 30 minutos e estável numa faixa estreita de pH de 4,0 - 5,0, após 30 minutos de incubação a 60°C. A enzima apresentou cinética tipo Michaelis-Menten e o valor de Km e Vmax utilizando-se o substrato *piceid* foi igual a 0,74 mMol/L e Vmax 323 nkat/mg respectivamente.

LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) purificaram e caracterizaram duas β -D-glicosidases de *Aspergillus niger*, e estudaram a sua afinidade e especificidade em relação à compostos glicosídicos encontrados em frutas. No estudo verificou-se que as enzimas β -D-glicosidase A e β -D-glicosidase B apresentaram, respectivamente, atividade ótima em pH 4 e 60°C e em pH 3 e 70°C, sendo estas características bioquímicas similares às descritas para β -D-glicosidase fúngicas. As duas enzimas mostraram-se estáveis na faixa de pH entre

2,0 e 9,0 perdendo, respectivamente, 70% e 80% da atividade inicial após incubação em pH 10 por 1 hora. Após tratamento térmico as enzimas apresentaram-se estáveis até 50°C, perdendo aproximadamente 80% da atividade inicial após incubação por 1 hora a 70°C. As β -D-glicosidases A e B apresentaram, respectivamente, valores de Km iguais a 0,43 mMol/L e 0,11 mMol/L de p-NPG. As enzimas foram inibidas competitivamente por glicose, gluconolactona e *deoxynojirimycin*.

RIOU *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, com tolerância à alta concentração de glicose. Os pesquisadores verificaram a presença de duas isoenzimas no extrato enzimático, mas só a isoenzima minoritária apresentou alta tolerância à glicose e ampla especificidade sobre substratos; conseguindo hidrolisar compostos glicosídicos precursores de aroma presentes em uvas e formar produto como geraniol, nerol e linalol, assim como hidrolisar outros precursores de aroma que contribuem para o sabor amargo de sucos de frutas cítricas. A enzima minoritária apresentou ponto isoelétrico igual a 4,2; atividade ótima a 50°C e pH 5,0 utilizando-se o substrato p-NPG, sendo que apresentou 50% e 25% da atividade inicial em pH 3,5 e 3,0, respectivamente. A enzima mostrou-se estável após 4 horas de incubação até 45°C e inativou-se em temperaturas superiores a 60°C. Assim mesmo, apresentou-se estável na faixa de pH entre 3,0 até 7,0, retendo 60% da atividade inicial após incubação por 24 horas a pH 2,5 e 20°C. A β -glicosidase estudada mostrou cinética tipo Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos, obtidos com o método Lineweaver-Burk, utilizando-se o substrato p-NPG foram Km igual a 0,55 mMol/L e Vmax igual a 3,040 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.3 β -glicosidases de *Mucor miehei*

As espécies que pertencem ao gênero *Mucor* crescem abundante e rapidamente no solo, plantas em decomposição e nas fezes de animais (TANIWAKI e Da SILVA, 1996). BRIMER *et al.* (1998) estudaram as β -glicosidases produzidas pelas espécies *Mucor circinelloides* e *Penicillium*

aurantiogriseum, e verificaram que a primeira produz uma única β -glicosidase, enquanto a segunda produz duas. Estas enzimas apresentaram a capacidade de degradar amigdalina até mandelonitrilo, pela mesma rota que ocorre naturalmente nas sementes das plantas da espécie *Prunus*, o que representa uma boa opção para acelerar a degradação de amigdalina, que é um composto cianogênico tóxico, mediante a mesma rota degradativa que a natural.

2.5.4 β -glicosidases de *Penicillium* sp.

Neste gênero existem espécies inócuas e outras perigosas para a saúde humana devido à produção de toxinas (TANIWAKI e Da SILVIA, 1996). As linhagens de *Penicillium roqueforti* são amplamente utilizadas na indústria alimentícia na produção de queijos e algumas outras espécies de *Penicillium* têm um papel importante na deterioração dos alimentos. Várias espécies deste gênero têm sido reportadas como boas produtoras do complexo celulase; por exemplo, o fungo *Penicillium occitanis* possui uma alta capacidade de produção de celulases e β -glicosidase, com uma alta eficiência para a degradação da celulose (BHIRI *et al.*, 2008).

BHIRI *et al.* (2008) purificaram e estudaram as características da β -glicosidase de *Penicillium occitanis*. As isoenzimas β -Glu 1 e β -Glu 2 apresentaram atividade ótima a 60°C e pH 4,5. As duas β -glicosidases mantiveram 80% da atividade após 30 minutos de tratamento térmico a 60°C. Contudo a estabilidade diminuiu rapidamente a 70°C. As enzimas apresentaram estabilidade em ampla faixa de pH (3 a 9) após 24 horas a 4°C. Os autores verificaram que as β -glicosidases de *Penicillium occitanis* são ativas em celobiose e p-NPG apresentando valores de K_m iguais a 1,43 e 0,37mMol/L, respectivamente.

KARBOUNE *et al.* (2008) estudaram as enzimas celulolíticas do complexo multienzimático de *Penicillium funiculosum* e verificaram que a β -glicosidase apresentou atividade ótima em pH 4,5 e a 60°C – 65°C. Após 2 horas de tratamento térmico a enzima manteve-se estável até 40°C, apresentando 51% de atividade residual a 60°C e 6% de atividade a 65°C após tratamento térmico. Além

disso, mostrou-se estável na faixa de pH entre 2,5 – 6,0, mantendo mais de 82% da atividade específica após duas horas de incubação a 25°C. Em pH 2,0 manteve 68% da atividade enquanto que em pH 9,0 manteve 41% da sua atividade inicial.

COPA-PATIÑO *et al.* (1990) purificaram e estudaram as propriedades de β -glicosidase de *Penicillium oxalicum* e constataram que a enzima hidrolisou diferentes substratos, apresentando maior afinidade com o substrato p-nitrofenil- β -D-glicosídeo com valor de K_m igual a 0,37 mMol/L. A enzima apresentou ponto isoelétrico em pH 4,0 e atividade ótima em pH 5,5 e 55°C.

MAMMA *et al.* (2004) estudaram as propriedades bioquímicas e catalíticas de duas β -glicosidase intracelulares de *Penicillium decumbens* (G_I e G_{II}), ambas ativas sobre glicosídeos flavonóides. As isoenzimas apresentaram atividade ótima em pH 7,0 e 65°C – 75°C. Hidrolisaram efetivamente a ligação β -glicosídica presente em glicosídeos flavonóides, sendo que a enzima G_{II} hidrolisou 5 vezes mais eficientemente esse tipo de substrato do que a enzima G_I . A isoenzima G_{II} hidrolisou quercetina-3-glicosídeo, enquanto a G_I não. As enzimas foram inibidas competitivamente por glicose e glucono- δ -lactona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens de fungos *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Trichoderma viride* e *Penicillium* sp. da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, foram utilizadas para a produção de β -glicosidase.

Os substratos celobiose, amigdalina e p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo e o padrão de albumina de ovo foram adquiridos da Sigma Aldrich.

3.1 Produção de β -glicosidase em meio semi-sólido

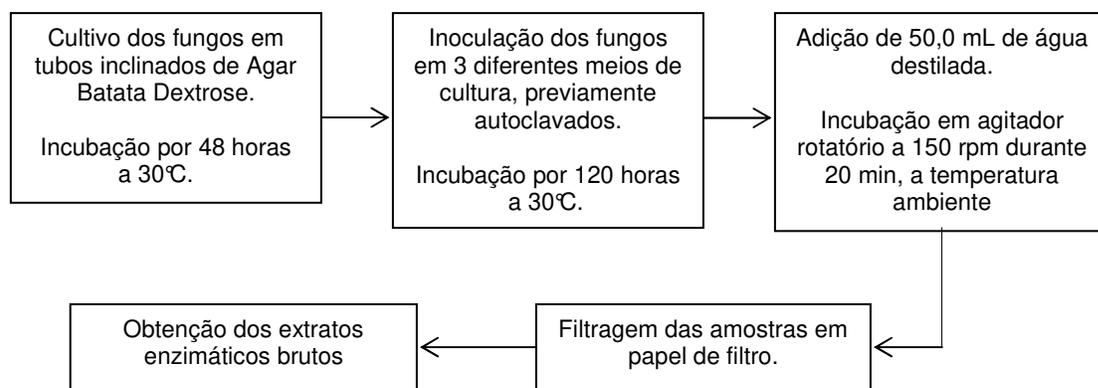
3.1.1 Preparo dos meios de cultura

Foi testada a produção de β -glicosidase utilizando-se três marcas de farelo de trigo: Pronatura (meio 1), Nutrilev (meio 2) e Natur's (meio 3) e casca de maracujá verde homogeneizada em liquidificador. Para a preparação dos meios de cultivo as amostras da mistura de farelo trigo: casca de maracujá: água (proporção 1:1:0,4) foram misturadas com bastão de vidro. Amostras de 10,0 g de meio foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL e os frascos esterilizados em autoclave por 20 min. a 121°C.

3.1.2 Fermentação e obtenção da enzima

As culturas dos fungos cultivadas em tubos inclinados de Ágar Batata Dextrose por 48 horas a 30°C foram inoculadas nos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10,0 g de meio de cultivo, descrito no item 3.1.1. Os frascos foram incubados durante 120 horas a 30°C. Após fermentação foi adicionado 50,0 mL de água destilada e os frascos agitados a 150 rpm por 20 min. à temperatura

ambiente. As amostras foram filtradas em papel de filtro e o filtrado foi utilizado como preparação enzimática bruta (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Produção da enzima β-glicosidase

3.2 Determinação da atividade da β-glicosidase em diferentes substratos

A atividade da β-glicosidase foi determinada utilizando-se os substratos p-nitrofenil-β-glucopiranosídeo (p-NPG), celobiose e amigdalina.

3.2.1 Determinação da atividade da β-glicosidase usando p-nitrofenil-β-glucopiranosídeo

A atividade da enzima β-glicosidase foi determinada segundo TURAN e ZHENG (2005) utilizando-se o substrato p-nitrofenil-β-glucopiranosídeo (p-NPG). Os extratos enzimáticos, obtidos no item 3.1.2 foram diluídos 1:550.

A mistura de 0,3 mL da solução 5mMol/L de p-nitrofenil-β-glucopiranosídeo (p-NPG) em tampão acetato pH 5,0 – 0,05 Mol/L e 0,3 mL de solução de enzima diluída foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após incubação foi adicionado 0,3 mL de solução Na₂CO₃ 0,5 Mol/L. O tubo branco foi preparado para cada diluição adicionando-se primeiro 0,3 mL de solução Na₂CO₃ 0,5 Mol/L; 0,3 mL de p-NPG 5 mMol/L e por último 0,3 mL da solução de enzima diluída. A quantidade de p-

nitrofenol liberada foi determinada espectrometricamente medindo a absorvância da solução a 410 nm contra o tubo branco. Uma unidade de atividade foi expressa como μmol de p-nitrofenol liberada por minuto por mL de enzima.

3.2.2 Determinação da atividade da β -glicosidase usando celobiose

A atividade da enzima β -glicosidase utilizando-se o substrato celobiose (Figura 2) foi determinada medindo-se a liberação de glicose usando o Kit de glicose oxidase – peroxidase da Laborlab.

A mistura de 50 μL da solução 3% de celobiose em tampão acetato 0,05Mol/L - pH 5,0 e 50 μL da solução da enzima diluída foi incubada a 50°C por 30 minutos. Alíquotas de 20 μL desta mistura foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL do reagente de trabalho de determinação de glicose por método enzimático e os tubos foram incubados por 10 minutos a 37°C.

Tubos brancos foram preparados para cada diluição da enzima adicionando-se 50 μL de solução de celobiose 3% em tampão acetato 0,05Mol/L - pH 5,0 e 50 μL de solução da enzima em tubos de ensaio e aquecendo-se imediatamente em banho maria em ebulição por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 μL desta mistura em tubos contendo 2,0 mL do reagente de trabalho de determinação de glicose pelo método enzimático. Os tubos foram incubados por 10 minutos a 37°C. A absorvância das soluções foi medida a 505 nm ajustando-se o espectrofotômetro com o tubo branco. Uma unidade de atividade foi expressa como μmol de glicose liberada por minuto por mL de enzima.

3.2.3 Determinação da atividade da β -glicosidase usando amigdalina

A atividade da enzima β -glicosidase utilizando-se o substrato amigdalina foi determinada como descrito no item 3.2.2.

Uma unidade de atividade foi expressa também como μmol de glicose liberada por minuto por mL de enzima.

3.3 Determinação da quantidade de proteínas presentes nos extratos enzimáticos

A concentração de proteína nos extratos enzimáticos brutos foi determinada pelo método de Lowry, utilizando-se albumina de ovo como padrão (LOWRY, 1951).

Uma unidade de atividade específica foi expressa como μmol de p-nitrofenol liberado por minuto por mL de proteína.

3.4 Caracterização da enzima β -glicosidase

Para a caracterização das β -glicosidases obtidas dos diferentes fungos, foram utilizados os meios de cultivo 3, composto por farelo de trigo Natur's, água e casca de maracujá, para os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e meio de cultivo 1, composto por farelo de trigo Pronatura, água e casca de maracujá, para os fungos *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma viride*. O extrato enzimático do fungo *Mucor miehei* não foi mais testado.

Os extratos enzimáticos foram diluídos de acordo com o Apêndice A para os testes de caracterização da enzima.

3.4.1 Determinação da temperatura ótima de atividade das β -glicosidases

As faixas de temperatura ótima de atividade das β -glicosidases dos microrganismos *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. foram determinadas usando p-NPG como substrato como descrito por TURAN e ZHENG (2005).

As misturas de 0,3 mL de solução 5mMol/L de substrato p-NPG em tampão acetato pH 5,0 - 0,05 Mol/L e 0,3 mL de solução da enzima diluída foram incubadas a 30°C; 40°C; 45°C; 47°C; 50°C; 55°C; 60°C e 70 °C durante 30

minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,3 mL de solução 0,5 Mol/L Na_2CO_3 , e a absorbância medida como descrito anteriormente.

Tubos brancos foram preparados para cada temperatura e cada extrato enzimático obtido dos diferentes microrganismos. Inicialmente as amostras de solução enzimática foram inativadas incubando-se os tubos em um banho maria em ebulição por 15 minutos. Alíquotas de 0,3 mL de solução de enzima inativada foram adicionadas em um tubo de ensaio contendo 0,3 mL de solução 5mMol/L de p-NPG em tampão acetato 0,05 Mol/L – pH 5,0. Os tubos foram incubados a cada temperatura por 30 minutos e em seguida foi adicionado 0,3 mL de solução de Na_2CO_3 0,5 Mol/L.

3.4.2 Determinação do pH ótimo de atividade das β -glicosidases

As faixas de pH ótimo de atividade das β -glicosidases dos microrganismos *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. foram determinadas usando como substrato p-NPG, como descrito por TURAN e ZHENG (2005).

As misturas de reação contendo 0,3 mL da solução de 5 mMol/L p-NPG em diferentes valores de pH (tampão citrato-fosfato: 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 – 5,5 – 6,0 – 6,5; tampão fosfato: 6,0 – 6,5 – 7,0 – 7,5 – 8,0 e tampão glicina-NaOH: 8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5 – 10,0 – 10,5) e 0,3 mL da solução enzimática diluída foram incubadas na temperatura ótima de atividade de cada enzima por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 0,3 mL de solução de Na_2CO_3 0,5 Mol/L para paralisar a reação.

Os tubos brancos foram preparados para cada valor de pH e cada solução enzimática de β -glicosidase. Inicialmente as amostras de solução enzimática foram inativadas colocando-se os tubos em um banho maria em ebulição por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, alíquotas de 0,3 mL da solução de enzima inativada foram adicionadas em um tubos de ensaio com 0,3 mL de solução 5 mMol/L p-NPG nos diferentes valores de pH. Os tubos foram incubados na temperatura ótima da enzima por 30 minutos. Depois foram adicionados 0,3 mL

de solução de Na₂CO₃ 0,5 Mol/L. A absorbância foi medida a 410 nm ajustando o espectrofotômetro com o tubo branco.

3.4.3 Determinação da temperatura de estabilidade das β-glicosidases

A temperatura de estabilidade das β-glicosidases dos microrganismos estudados foi determinada usando o substrato p-NPG como descrito por TURAN e ZHENG (2005). Tubos de ensaio contendo amostras de 2,5 mL de solução enzimática diluída no pH ótimo de atividade foram incubados a 7,5°C; 24,5°C; 30°C; 35°C; 40°C 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C e 80°C durante 30 minutos e a atividade residual foi determinada utilizando-se p-NPG 5 mMol/L em tampão acetato no pH e na temperatura ótima de atividade de cada β-glicosidase como descrito a seguir.

As misturas de reação contendo β-glicosidase de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. foram incubadas nas temperaturas de 60°C, 47°C; 45°C e 60°C, respectivamente, enquanto que as diluições das preparações de β-glicosidase e as soluções de substrato foram preparadas em pH 4,5; 5,0; 4,0; 5,0; respectivamente.

O tubo branco foi feito da mesma forma que para a determinação da temperatura ótima.

3.4.4 Determinação do pH de estabilidade das β-glicosidases

As faixas de pH de estabilidade das β-glicosidases dos microrganismos estudados foram determinadas usando o substrato p-NPG como descrito por TURAN e ZHENG (2005).

Tubos de ensaio contendo amostras de 2,5 mL de solução enzimática diluída em diferentes valores de pH utilizando tampão citrato-fosfato: 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 – 5,5 – 6,0 – 6,5; tampão fosfato: 6,0 – 6,5 – 7,0 – 7,5 – 8,0 e tampão glicina-NaOH: 8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5 – 10,0 – 10,5; foram incubados na temperatura ótima

de cada enzima durante 2 horas. As preparações de β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus sp.* em diferentes valores de pH foram incubadas a 47°C, 60°C, 45°C e 60°C, respectivamente. A atividade residual foi determinada na temperatura e pH ótimo de atividade de cada enzima. O tubo branco foi feito da mesma forma que para a determinação do pH ótimo.

3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima β -glicosidase de *Aspergillus sp.*

O efeito da concentração de substrato na atividade da β -glicosidase da linhagem *Aspergillus sp.*, melhor produtora da enzima, foi testada em diferentes valores de concentração do substrato p-NPG (0,50 – 3,5 mMol/L), utilizando a preparação enzimática bruta. A determinação da atividade enzimática foi realizada a 60°C e pH 4,5, nas condições ótimas de atividade da enzima.

A mistura de 0,3 mL de solução de p-NPG em diferentes concentrações em tampão acetato-ácido acético 0,05 Mol/L, pH 4,5 e 0,3 mL de solução enzimática diluída foi incubada a 60°C durante 30 minutos. Em seguida foi adicionado 0,3 mL de solução de Na_2CO_3 0,5Mol/L para paralisar a reação.

A quantidade de p-nitrofenol liberada foi determinada espectrofotometricamente e os valores de K_m e V_{max} foram determinados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

3.6 Fracionamento da enzima β -glicosidase de *Aspergillus sp.* com sulfato de amônio

A preparação enzimática bruta produzida por *Aspergillus sp.*, foi concentrada por fracionamento com sulfato de amônio com 80% de saturação. Após 12 horas de incubação a 10°C, o precipitado foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 5°C, ressuspenso e diluído com água destilada.

Após a diálise, determinou-se a atividade de β -glicosidase utilizando o substrato p-NPG, como descrito no item 3.2.1, e a concentração de proteína, como descrito no item 3.3.

3.7 Purificação da enzima β -glicosidase de *Aspergillus* sp. em coluna de DEAE-celulose.

A solução enzimática concentrada e dialisada foi aplicada em coluna de cromatografia iônica de DEAE-celulose, previamente equilibrada com solução tampão fosfato 50 mMol/L pH 7,0. Para eluição da enzima foi aplicado o mesmo tampão contendo gradiente de 0 a 1,5 Mol/L de NaCl a um fluxo de 6,4 mL/h. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm. A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato p-NPG, como descrito no item 3.2.1. Para determinação da concentração de proteína foi utilizado o método de Lowry, como descrito no item 3.3.

3.8 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese das amostras de β -glicosidase do extrato bruto, extrato obtido por precipitação com sulfato de amônio e parcialmente purificado de *Aspergillus* sp. obtidos como descrito nos itens 3,1.2, 3.6 e 3.7, respectivamente, em gel SDS (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970) usando 7,5% de acrilamida.

As amostras contendo os padrões, o extrato bruto e o extrato parcialmente purificado foram aplicadas no gel em quantidades aproximadas de 15 μ L. A cuba para eletroforese vertical foi então conectada a fonte e a corrida realizada com correntes de 120V durante aproximadamente 2 horas.

As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250. As proteínas miosina (202,44 kDa), β -galactosidase (116,58 kDa), albumina bovina (98,08 kDa) e ovalbumina (47,11 kDa) da Bio-Rad) foram utilizadas como padrões.

3.9 Planejamento experimental para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada.

Para determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^2 . Os níveis utilizados das variáveis independentes, temperatura e pH, estão apresentados na Tabela 2. A variável dependente foi a atividade residual de β -glicosidase determinada como descrito no item 3.2.1. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software Statistica, versão 7.0.

Tabela 2. Valores utilizados no planejamento experimental fatorial completo 2^2 para estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da β -glicosidase parcialmente purificada

Variáveis	Níveis				
Temperatura (°C)	50	53	60	67	70
pH	3,5	3,8	4,5	5,2	5,5

3.10 Planejamento experimental para a determinação do efeito do pH e temperatura na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada.

Para determinação da estabilidade da β -glicosidase parcialmente purificada, a enzima foi submetida a tratamento em diferentes temperaturas e pH conforme mostra a Tabela 3. Em seguida, alíquotas da enzima foram retiradas após 2 horas de incubação e ajustadas ao pH e temperatura ótima de atividade para determinação da atividade residual de β -glicosidase, como descrito no item 3.2.1. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software Statistica, versão 7.0.

Tabela 3. Valores utilizados no planejamento experimental fatorial completo 2² para estudo do efeito da temperatura e pH na estabilidade da β -glicosidase parcialmente purificada

Variáveis	Níveis				
Temperatura (°C)	30	35,8	50	64,2	70
pH	3,0	3,6	5,0	6,4	7,0

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da atividade das β -glicosidases sobre diferentes substratos

A Figura 4 e a Tabela 4 ilustram a produção de β -glicosidase, determinada utilizando o substrato p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo, pelas linhagens *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* fermentados nos meios de cultivo 1, 2 e 3. Observou-se que a linhagem de *Aspergillus* sp. apresentou maior produção de β -glicosidase, estimada utilizando-se substrato p-NPG, entre as linhagens testadas. Na fermentação da linhagem *Aspergillus* sp. em meio de cultivo 3 composto de mistura de 50g de farelo de trigo Natur's e casca de maracujá verde (1:1; m:m) e 20mL de água destilada após 5 dias a 30°C foi obtido atividade de β -glicosidase igual a 25,75 U/g.

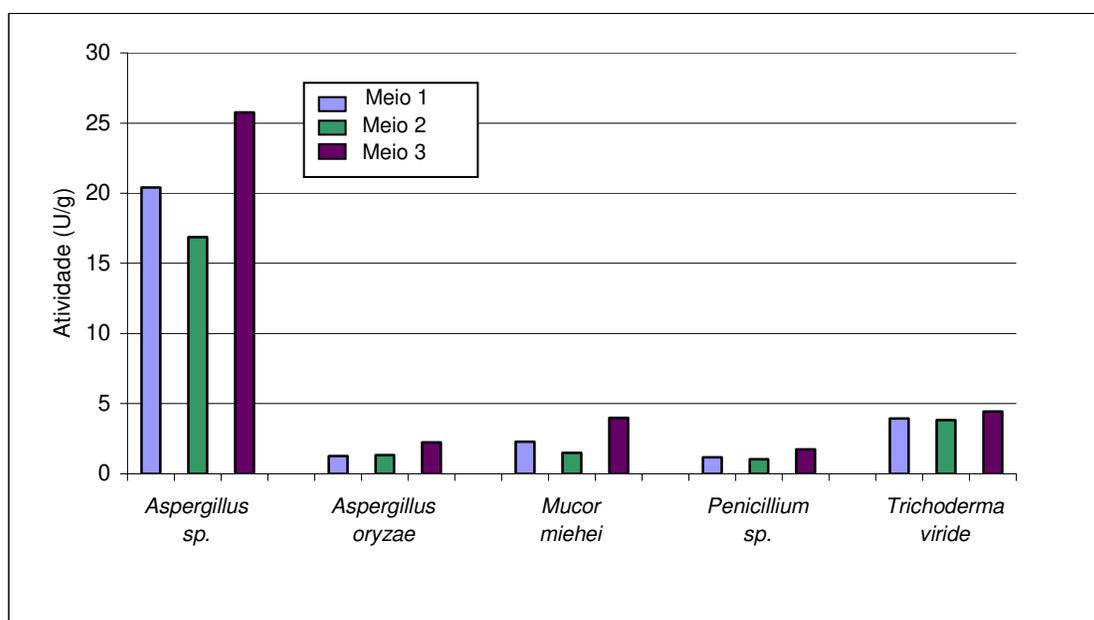


Figura 4. Produção de β -glicosidase pelas linhagens *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0 a 50°C)

Tabela 4. Produção de β -glicosidase pelos fungos *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática determinada utilizando-se p-NPG em pH 5,0 a 50°C)

Linhagem	β -glicosidase U/g (substrato p-NPG β -glucopiranosídeo)		
	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>Aspergillus</i> sp.	20,41 ^a	16,87 ^b	25,75 ^c
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,28 ^a	1,33 ^a	2,25 ^b
<i>Mucor miehei</i>	2,28 ^a	1,50 ^b	3,98 ^c
<i>Penicillium</i> sp.	1,19 ^a	1,05 ^a	1,75 ^b
<i>Trichoderma viride</i>	3,93 ^a	3,83 ^b	4,43 ^c

* as letras sobrescritas referem-se ao resultado do teste de Tukey (ns=0,05). Letras iguais significam que os resultados não diferem significamente.

As Figuras 5 e 6 e Tabela 5 ilustram a produção de β -glicosidase, determinada usando substrato celobiose, pelas linhagens *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus* sp., *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* fermentados nos meios de cultivo 1, 2 e 3. Entre os microrganismos estudados a linhagem *Aspergillus* sp., apresentou maior atividade de β -glicosidase 45,88 U/g (meio 3).

As preparações enzimáticas de β -glicosidase obtidas de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* apresentaram respectivamente atividade de 45,88 U/g (meio 3), 0,159 U/g (meio 2), 0,392 U/g (meio 3), 1,118 U/g (meio 3) e 0,51 U/g (meio 1) utilizando-se o substrato celobiose.

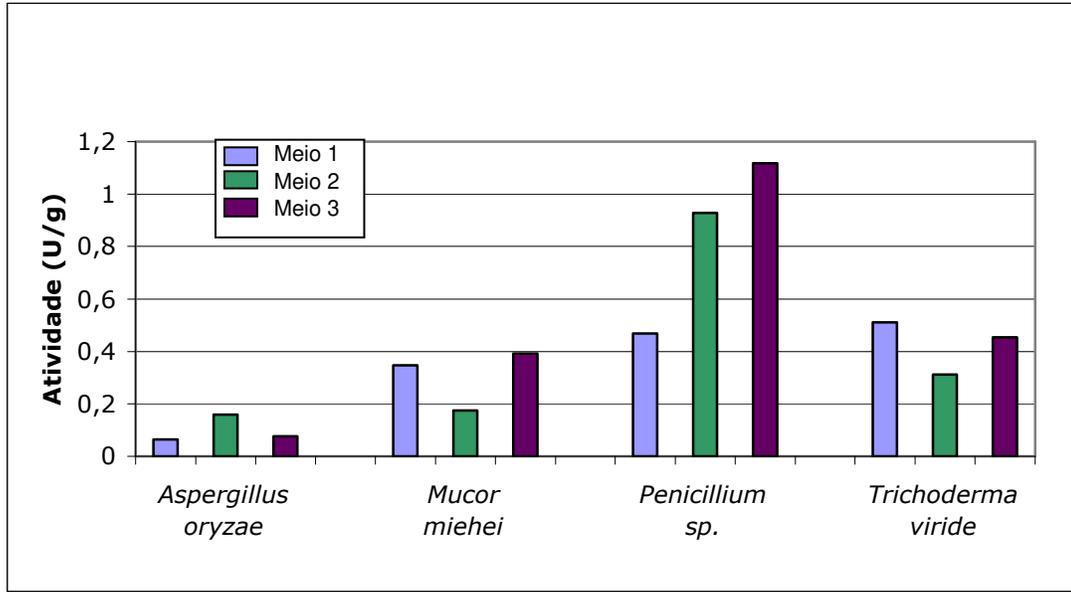


Figura 5. Produção de β - glucosidase pelas linhagens *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium sp.* e *Trichoderma viride* fermentadas nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C).

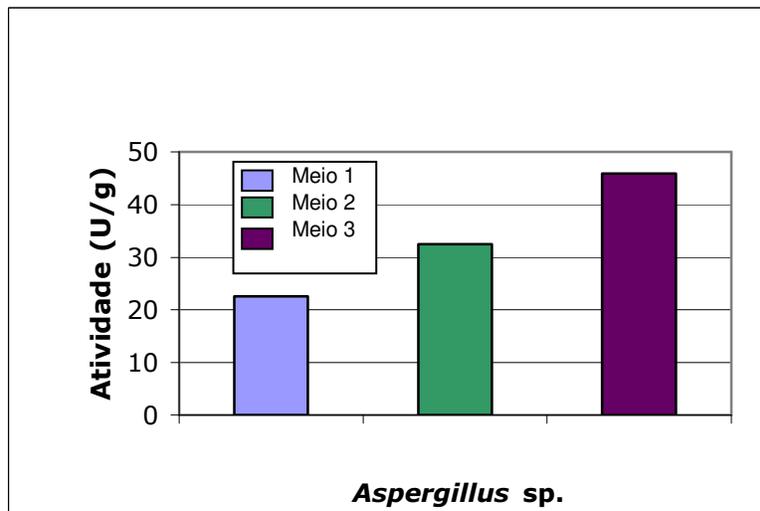


Figura 6. Produção da β -glucosidase pela linhagem *Aspergillus sp.* em meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C).

Tabela 5. Produção de β -glicosidase de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* nos meios 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato celobiose em pH 5,0 a 50°C)

Linhagem	β -glicosidase U/g (substrato celobiose)		
	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>Aspergillus</i> sp.	22,56 ^a	32,49 ^b	45,88 ^c
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,064 ^a	0,159 ^b	0,076 ^a
<i>Mucor miehei</i>	0,346 ^a	0,175 ^b	0,392 ^a
<i>Penicillium</i> sp.	0,468 ^a	0,929 ^b	1,118 ^c
<i>Trichoderma viride</i>	0,510 ^a	0,312 ^b	0,454 ^c

* as letras sobrescritas referem-se ao resultado do teste de Tukey (ns=0,05). Letras iguais significam que os resultados não diferem significamente.

A Figura 7 e Tabela 6 ilustram a produção de β -glicosidase, determinada usando substrato amigdalina, em pH 5,0 a 50°C, pelas linhagens *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* nos meios de cultivo 1, 2 e 3. Constatou-se que a linhagem de *Aspergillus* sp. apresentou maior atividade de β -glicosidase, estimada com o substrato amigdalina.

As preparações de β -glicosidase obtidas das linhagens de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* apresentaram, respectivamente, atividade de 9,29 U/g (meio 3), 0,39 U/g (meio 2), 0,85 U/g (meio 3), 0,78 U/g (meio 2) e 1,41 U/g (meio 1), utilizando-se o substrato a amigdalina para determinação da atividade enzimática.

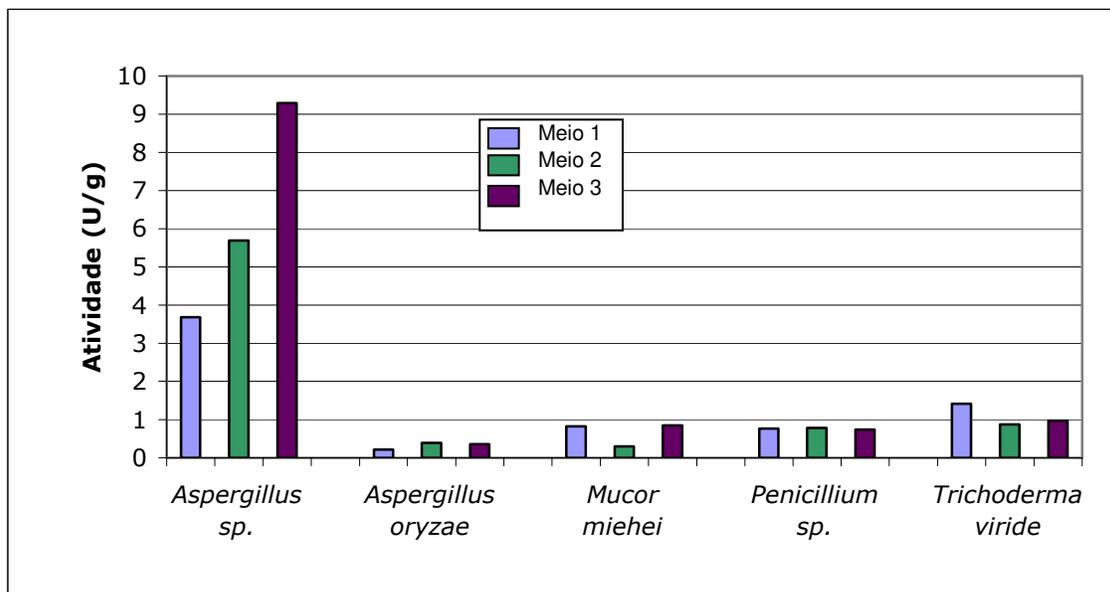


Figura 7. Produção de β -glicosidase de *Aspergillus sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium sp.* e *Trichoderma viride* nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se o substrato amigdalina em pH 5,0 a 50°C)

Tabela 6. Produção de β -glicosidase de *Aspergillus sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium sp.* e *Trichoderma viride* nos meios de cultivo 1, 2 e 3 (Atividade enzimática utilizando-se substrato amigdalina em pH 5,0 a 50°C)

Linhagem	β -glicosidase U/g (substrato amigdalina)		
	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>Aspergillus sp.</i>	3,68 ^a	5,69 ^b	9,29 ^c
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,22 ^a	0,39 ^b	0,35 ^c
<i>Mucor miehei</i>	0,83 ^a	0,30 ^b	0,85 ^a
<i>Penicillium sp.</i>	0,77 ^a	0,78 ^a	0,74 ^a
<i>Trichoderma viride</i>	1,41 ^a	0,87 ^b	0,97 ^b

* as letras sobrescritas referem-se ao resultado do teste de Tukey (ns=0,05). Letras iguais significam que os resultados não diferem significamente.

Entre os fungos testados a linhagem de *Aspergillus* sp. apresentou maior produção de β -glicosidase, testada usando os substratos celobiose, p-NPG e amigdalina, utilizando-se o meio de cultivo 3 para fermentação. Observou-se também que a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou maior atividade sobre o substrato celobiose, seguido por p-NPG e amigdalina. Sabe-se que fungos do gênero *Trichoderma* e *Penicillium* produzem elevadas quantidades do complexo celulase, no entanto, apresentam baixos níveis de β -glicosidase, necessárias para a conversão da celulose em glicose no processo de produção de etanol a partir de resíduos celulósicos (FLACHNER; RÉCZEY, 2004; BHIRI *et al.*, 2008; KÓVACS *et al.*, 2008, ABDEL-NABY *et al.*, 1999).

KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que a β -glicosidase de *Aspergillus japonicus* apresentou elevada atividade sobre substratos de baixo peso molecular, como celobiose e p-NPG (105 e 124 U/mg, respectivamente) e baixa atividade sobre polissacarídeos, como β -glucana (9 U/mg). Entretanto, a β -glicosidase de *Trichoderma reesei* e *Penicillium verruculosum* apresentaram maior atividade sobre polissacarídeos (39 e 52 U/mg sobre β -glucana, respectivamente) e menor atividade em substratos de baixa massa molecular (62 e 83 sobre p-NPG e 21 e 54 sobre celobiose, respectivamente).

4.2 Determinação da atividade específica dos extratos enzimáticos brutos de β -glicosidase obtidos das linhagens de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride*.

A Tabela 7 ilustra que o extrato enzimático bruto obtido da fermentação da linhagem de *Aspergillus* sp. em meio de cultivo 3 apresentou maior atividade específica (11,81 U/mg de proteína) do que os extratos enzimáticos obtidos das fermentações das linhagens de *Aspergillus oryzae* (1,14 U/mg de proteína), *Mucor miehei* (2,01 U/mg de proteína), *Penicillium* sp. (0,99 U/mg de proteína) e *Trichoderma viride* (2,09 U/mg de proteína) em meio de cultivo 3.

Tabela 7. Atividade específica dos extratos enzimáticos obtidos das fermentações das linhagens *Aspergillus* sp, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* no meio de cultivo 3

Linhagem	Meio	Atividade de β -glicosidase (U/g)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
<i>Aspergillus</i> sp.	3	25,75 ^c	2,18	11,81
<i>Aspergillus oryzae</i>	3	2,25 ^b	1,97	1,14
<i>Mucor miehei</i>	3	3,98 ^c	1,98	2,01
<i>Penicillium</i> sp.	3	1,75 ^b	1,76	0,99
<i>Trichoderma viride</i>	3	4,43 ^c	2,12	2,09

4.3 Caracterização da β -glicosidase do fungo *Aspergillus oryzae*

A β -glicosidase bruta de *Aspergillus oryzae* apresentou uma faixa de temperatura ótima de atividade em pH 5,0, entre 45°C – 50°C, com um máximo aparente a 47°C (Figura 8). Esta β -glicosidase apresenta temperatura ótima de atividade similar à isoenzima β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* altamente tolerante a glicose descrita por RIOU *et al.* (1998) que mostrou atividade ótima a 50°C.

JAGER *et al.* (2001) relataram que as β -glicosidasas do gênero *Aspergillus* geralmente apresentam atividade ótima a 60°C.

LANGSTON *et al.* (2006) verificaram que a β -glicosidase do fungo *Aspergillus oryzae* apresentou temperatura ótima a 60°C e ZHANG *et al.* (2006) também observaram que a β -D-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (sp. 100) mostrou temperatura ótima de atividade a 60°C. A β -glicosidase II do fungo *Aspergillus niger* estudada por TSONG-RONG *et al.* (1998) e as isoenzimas β -D-glicosidase A

e B de *A. niger* descritas por LE TRAON-MASSON E PELLERIN, (1998) apresentaram temperatura ótima de atividade a 60°C

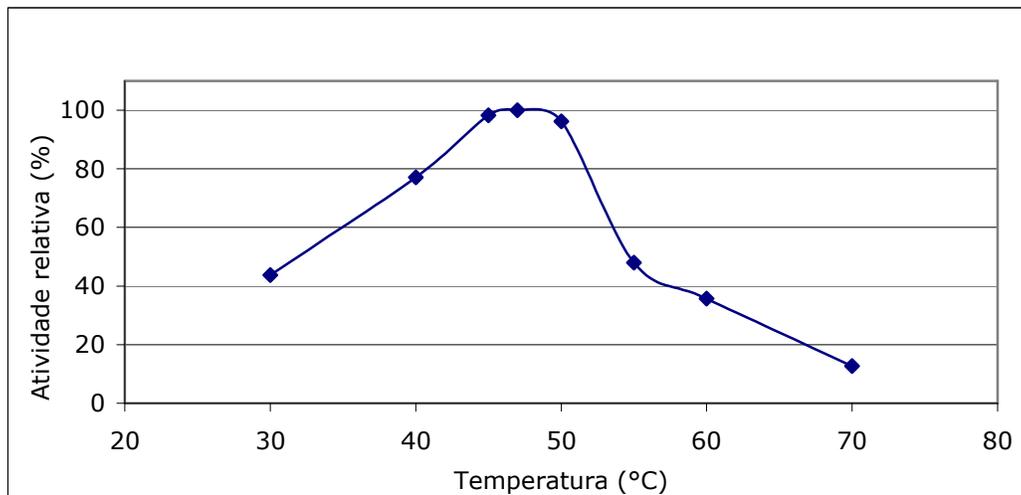


Figura 8. Temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, utilizando-se p-NPG a pH 5,0.

A Figura 9 ilustra que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* mostrou-se estável após 30 minutos de tratamento a 45°C retendo cerca de 90% da atividade inicial. A enzima foi inativada a 60°C, mostrando-se mais termossensível que a β -glicosidase de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* que apresentaram estabilidade após 30 minutos de tratamento a 60 °C (Figura 21) e a 55 °C (Figura 17), respectivamente.

A temperatura de estabilidade térmica da β -glicosidase da linhagem de *Aspergillus oryzae* encontrada neste estudo é inferior àquelas β -glicosidasas de diferentes espécies de *Aspergillus* descritas na literatura. JÄGER *et al.* (2001) reportaram que a β -glicosidase dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis* apresentou estabilidade até 50°C após incubação por 2 horas.

TSONG-RONG *et al.* (1998) verificaram que a β -glicosidase II do fungo *Aspergillus niger* permaneceu estável após tratamento térmico a 60°C, perdendo 50% da atividade após 10 minutos de tratamento a 70°C. Contudo, LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) verificaram que as duas isoenzimas de β -D-

glicosidase presentes no extrato enzimático de *Aspergillus niger*, apresentaram-se estáveis até 50°C após tratamento térmico, perdendo cerca de 80% da atividade inicial após incubação por 1 hora a 70°C.

ZHANG *et al.* (2006) verificaram que a β -D-glicosidase de *Aspergillus oryzae* 100 mostrou estabilidade até 60°C após tratamento térmico por 30 minutos. RIOU *et al.* (1998) relataram que a β -glicosidase do mesmo microrganismo, manteve-se estável após 4 horas de incubação até 45°C e inativou-se em temperaturas superiores a 60°C, resultado similar ao verificado nesta pesquisa.

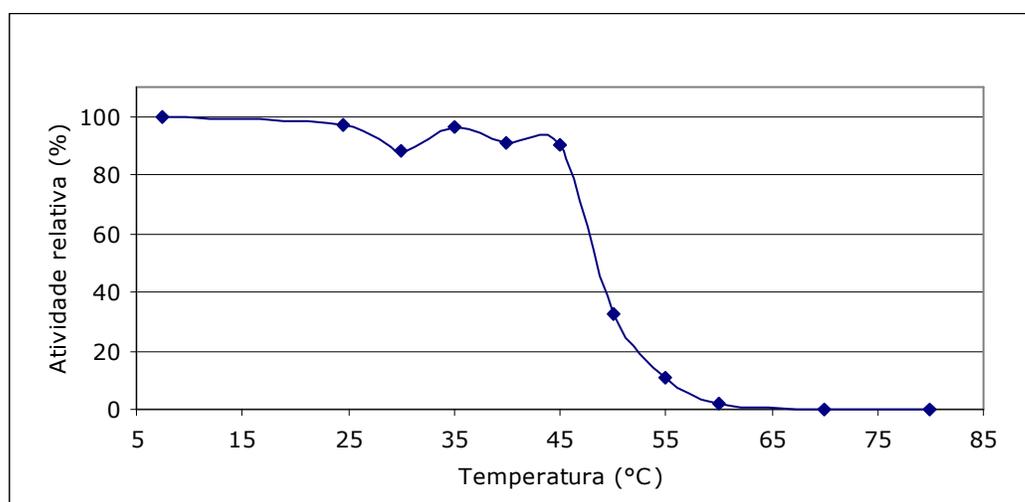


Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* em pH 5,0

A Figura 10 mostra que o extrato enzimático de *Aspergillus oryzae* apresentou β -glicosidases com atividade ótima em pH entre 5,0 – 5,5, e em pH 7,0, utilizando-se o substrato p-NPG. Esta última fração ativa em pH 7,0 apresentou cerca de 20% da atividade relativa comparada à fração que mostrou atividade ótima em pH 5,0 - 5,5. O resultado do pH ótimo de atividade está de acordo com o reportado na literatura para a espécie estudada assim como para β -glicosidases de espécies do mesmo gênero. JÄGER *et al.* (2001) reportaram uma faixa de pH ótimo de atividade entre 4,5 – 5,0 para β -glicosidases de espécies *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius*.

Para a isoenzima β -glicosidase II do fungo *Aspergillus niger*, TSONG-RONG *et al.* (1998) relataram atividade ótima em pH 4,5. Para o mesmo fungo, LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) relataram a presença de duas isoenzimas; a β -D-glicosidase A apresentou pH ótimo a 4,0; enquanto que a β -D-glicosidase B apresentou pH ótimo a 3,0.

De acordo com a literatura a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* pode apresentar diferentes valores de pH ótimo de atividade. LANGSTON *et al.* (2006) relataram que uma isoenzima altamente tolerante a glicose presente no extrato enzimático de *A. oryzae* apresentava atividade ótica em pH 5,0, enquanto que GÜNATA e VALLIER (1999) verificaram que a enzima mostrava pH ótimo de atividade na faixa de 4,5 - 6,0. Por outro lado ZHANG *et al.* (2006) isolaram uma β -glicosidase que apresentava pH ótimo de atividade em pH 5,0. RIOU *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma isoenzima β -glicosidase com alta tolerância à glicose que mostrava pH ótimo de atividade em 5,0.

A β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* do presente estudo apresentou pH ótimo de atividade próximo à faixa de pH dessas enzimas descritas na literatura.

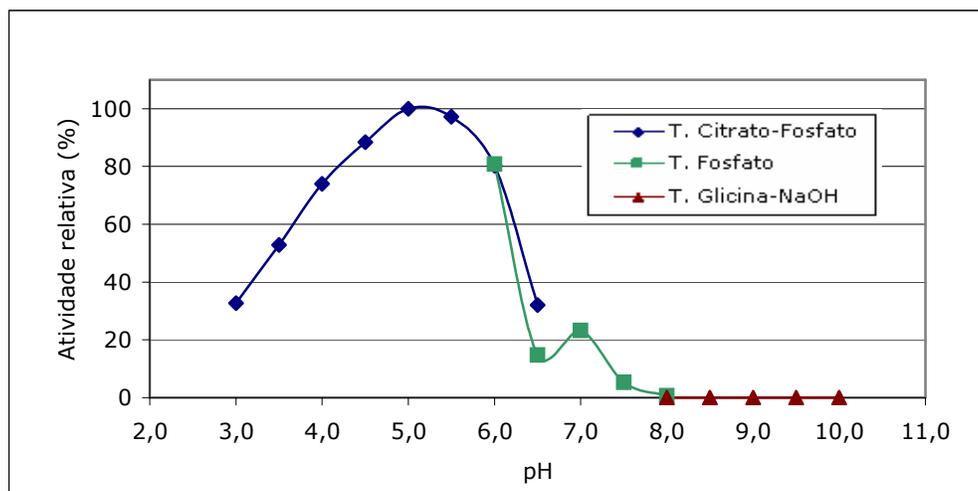


Figura 10. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, utilizando-se substrato p-NPG a 47°C.

A Figura 11 mostra que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* apresentou-se estável na faixa de pH 5,0 – 7,0 após 2 horas de incubação a 47°C. Em valores inferiores a 3,0 e superiores a 9,0 a enzima foi inativada. A enzima apresentou estabilidade ao pH de modo similar à β -glicosidase de *Trichoderma viride* que mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 - 7,0, após 2 horas a 45°C (Figura 14), e menos estável que a enzima do *Aspergillus* sp. que apresentou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,5 retendo mais que 80% da atividade inicial, após de 2 horas de incubação a 60°C (Figura 23).

A β -glicosidase do *Aspergillus oryzae* estudada nesta pesquisa apresentou faixa de estabilidade ao pH mais estreita que a maioria das β -glicosidases produzidas por fungos do mesmo gênero descritas na literatura. JÄGER *et al.* (2001) verificaram que as β -glicosidases dos fungos *A. niger* e *A. phoenicis* apresentaram pH de estabilidade na faixa pH de 4,0 até 8,0. Todavia, os autores citam resultados de outras pesquisas nas quais as β -glicosidases de *A. niger* apresentaram diferentes faixas de pH de estabilidade, pH 4,0 - 4,5 (DEKKER, 1986); pH 2,5 - 9,0 (MC CLEARY & HARRINGTON 1988); pH 4,5 - 7,0 (WATANABE *et al.*, 1992); pH 5,0 - 7,0 (GALAS & ROMANOWSKA, 1997) e β -glicosidases de *A. phoenicis* mostram estabilidade na faixa de pH 2,5 - 9,0 (STERNBERG *et al.*, 1997); pH 4,0 - 7,5 (ZENG & ZHANG, 1988). TSONG-RONG *et al.* (1998) observaram que a isoenzima β -glicosidase II de *Aspergillus niger* apresentou-se estável na faixa de pH entre 4,0 - 6,5; diminuindo rapidamente a sua atividade em valores maiores de 7,0 e menores de 4,0. Contudo LE TRAON-MASSON e PELLERIN, (1998) constataram uma faixa mais ampla para duas β -D-glicosidase de *Aspergillus niger*, verificando estabilidade desde pH 2,0 até 9,0, perdendo 70% e 80% respectivamente, da atividade inicial após incubação em pH 10 por 1 hora.

Conforme GÜNATA e VALLIER (1999), a isoenzima β -glicosidase minoritária de *A. oryzae* não apresentou perdas na atividade após 24 horas de incubação a 20°C nos valores de pH 3,0; 6,0 e 7,0. Contudo ZHAN G *et al.* (2006) verificou que a β -glicosidase do mesmo fungo apresentava uma faixa estreita de pH de estabilidade entre 4,0 até 5,0, após 30 minutos de incubação. No entanto, RIOU *et*

al. (1998) constataram uma faixa ampla de estabilidade entre pH 3,0 – 7,0 para β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, com alta tolerância à glicose.

As diferenças nos resultados podem ser devidas aos distintos métodos utilizados. Por exemplo, nesta pesquisa incubou-se a enzima por 2 horas na temperatura ótima de atividade (47°C) enquanto JÄGE R *et al.* (2001), incubaram as enzimas durante 24 horas a 4°C e RIOU *et al.* (1998) incubaram a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* a 20°C por 24 horas. A faixa mais estreita verificada neste estudo pode ser explicada em função da estabilidade desta enzima ser até 45°C e por ter sido incubada a 47°C, temperatura na qual ocorre perda na atividade.

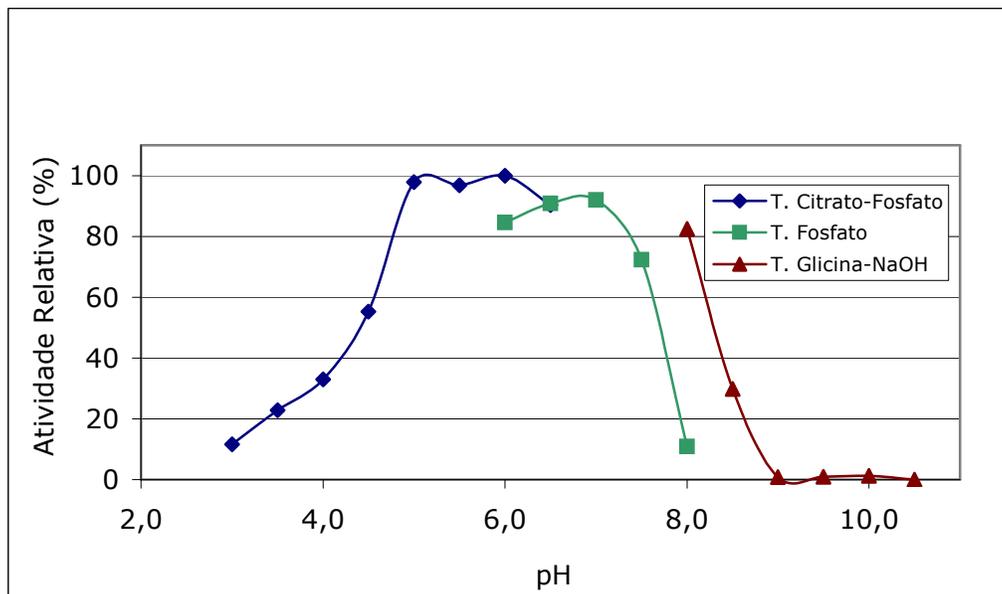


Figura 11. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* a 47°C

4.4 Caracterização da β -glicosidase do fungo *Trichoderma viride*

A Figura 12 ilustra o efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de *Trichoderma viride*, no qual verificou-se que a enzima apresenta temperatura

ótima de atividade em torno a 45°C e atividades relativas de 95% a 47°C e 89% a 50°C, utilizando-se o substrato p-NPG em pH 5,0.

CHEN *et al.* (1992) estudaram a purificação e caracterização de β -glicosidases extracelulares do fungo *Trichoderma reesei* e constataram a presença de duas isoenzimas, uma em maior proporção que outra, sendo que a β -glicosidase majoritária (β -glicosidase I) e minoritária (β -glicosidase II) apresentaram temperatura ótima de atividade a 65°C-70°C e 60°C, respectivamente. KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que a β -glicosidase produzida por *Trichoderma reesei* apresentou máximo de atividade a 70°C.

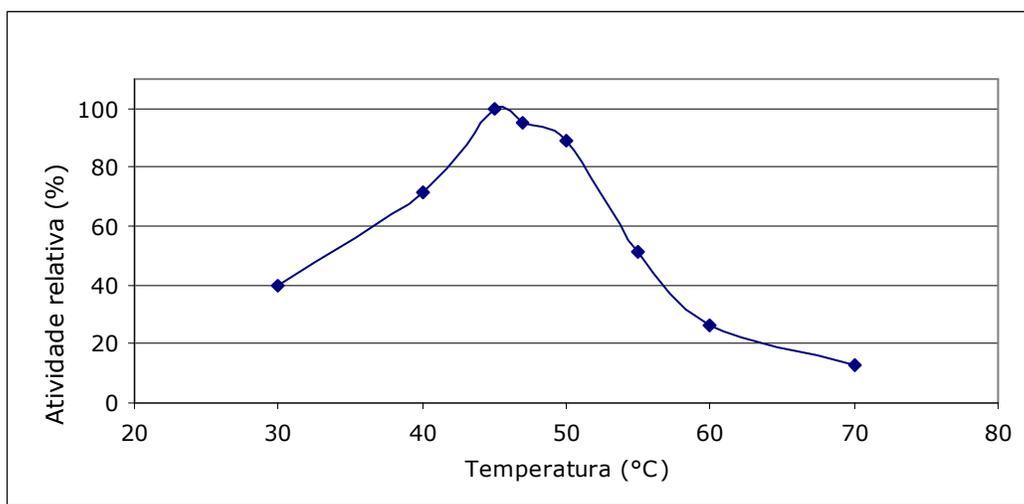


Figura 12. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de *Trichoderma viride*, utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0.

A Figura 13 ilustra o efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase do fungo *Trichoderma viride*. A enzima apresentou-se estável a 45°C após 30 minutos de tratamento em pH 5,0, retendo cerca de 90% da atividade inicial. A enzima foi inativada a 60°C, mostrando-se mais termossensível que as β -glicosidases de *Aspergillus* sp. (Figura 21) e *Penicillium* sp. (Figuras 17). A β -glicosidase de *Trichoderma viride* apresentou termoestabilidade similar à enzima

de *Aspergillus oryzae*, sendo que ambas apresentaram-se estáveis após tratamento a 45°C e foram inativadas a 60°C.

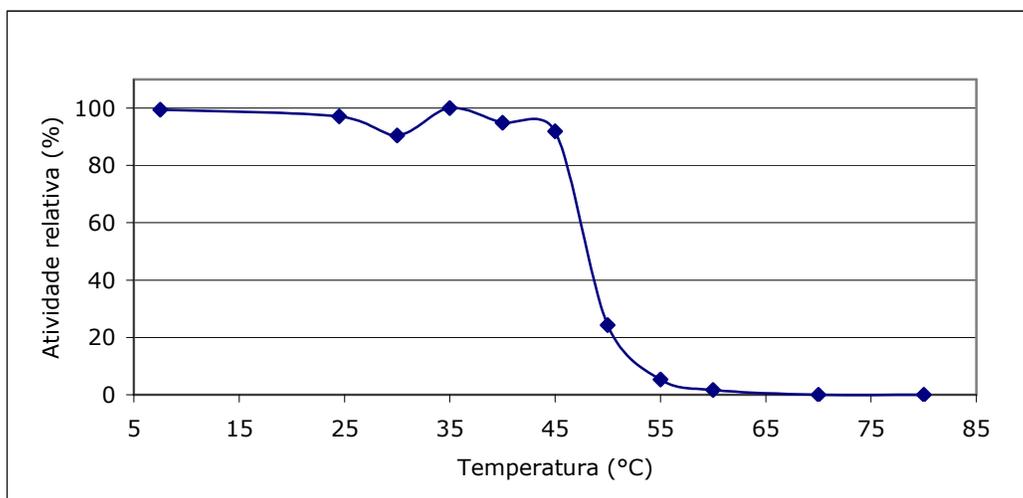


Figura 13. Efeito da temperatura na estabilidade da β-glicosidase de *Trichoderma viride* em pH 5,0.

A Figura 14 ilustra o efeito do pH na atividade da β-glicosidase do fungo *Trichoderma viride*. A enzima apresentou maior atividade em pH 5,0 – 5,5, utilizando-se o substrato p-NPG.

No estudo de purificação e caracterização de duas β-glicosidasas extracelulares de *Trichoderma reesei*, CHEN *et al.* (1992) constataram que as isoenzimas β-glicosidase I e β-glicosidase II apresentaram atividade ótima em pH 4,6 e pH 4,0, respectivamente, indicando que essas enzimas apresentam atividade ótima em pH mais ácido do que a β-glicosidase do presente estudo. No entanto, KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que β-glicosidase produzida por *Trichoderma reesei* apresentou máximo de atividade em pH 5,0.

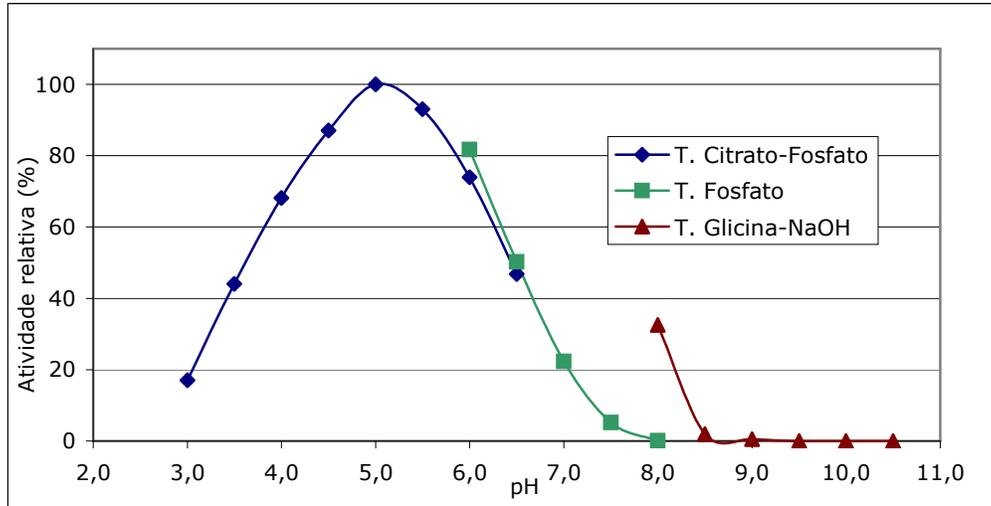


Figura 14. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de *Trichoderma viride*, utilizando-se p-NPG a 45°C

A Figura 15 mostra que a β -glicosidase do fungo *Trichoderma viride* apresentou-se estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, após 2 horas a 45°C. A enzima foi inativada em pH 3,0 e em valores de pH superiores a 9,0, apresentando estabilidade ao pH similar à β -glicosidase do fungo *Aspergillus oryzae*.

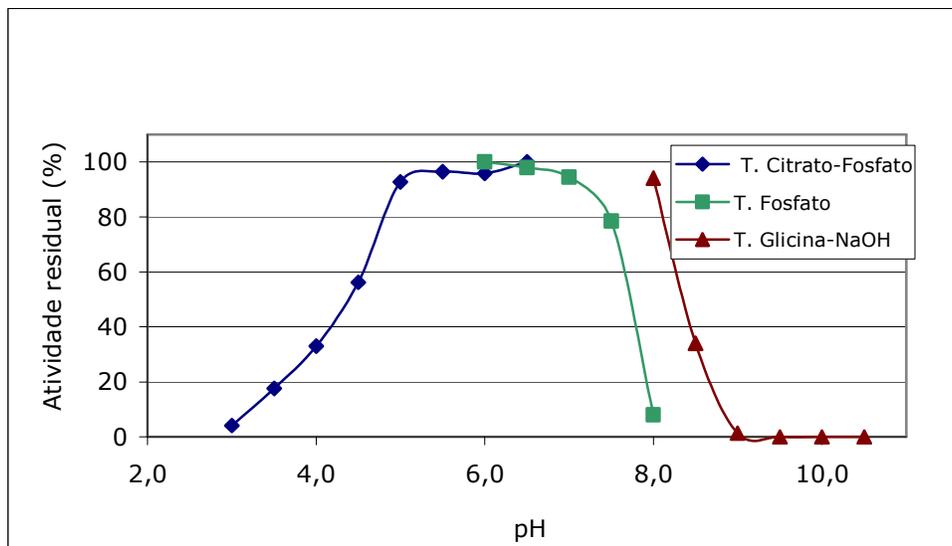


Figura 15. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de *Trichoderma viride* a 45°C

4.5 Caracterização da β -glicosidase do fungo *Penicillium* sp.

A Figura 16 mostra que a preparação de β -glicosidase de *Penicillium* sp. contem β -glicosidases que apresentam atividade ótima a 50°C e 60°C, utilizando-se o substrato p-NPG em pH 5,0.

BHIRI *et al.* (2008) verificaram a presença de duas isoenzimas β -glicosidases (β -Glu 1 e β -Glu 2), no sobrenadante da cultivo do fungo *Penicillium occitanis*, que apresentaram temperatura ótima de atividade a 60°C.

Na caracterização das enzimas celulolíticas do complexo multienzimático de *Penicillium funiculosum*, KARBOUNE *et al.* (2008) observaram que a β -glicosidase do fungo apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 60°C - 65°C, sendo que a 75°C reteve aproximadamente 78% de sua atividade inicial.

COPA-PATIÑO *et al.* (1990) relataram que a β -glicosidase purificada de *Penicillium oxalicum*, apresentou maior atividade a 55°C.

KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que β -glicosidase produzida por *Penicillium verruculosum* apresentou atividade ótima a 65°C.

Apesar do extrato enzimático de *Penicillium* sp. apresentar atividade ótima de β -glicosidase a 50°C e 60°C, as demais caracterizações foram feitas a 60°C por apresentar uma maior atividade.

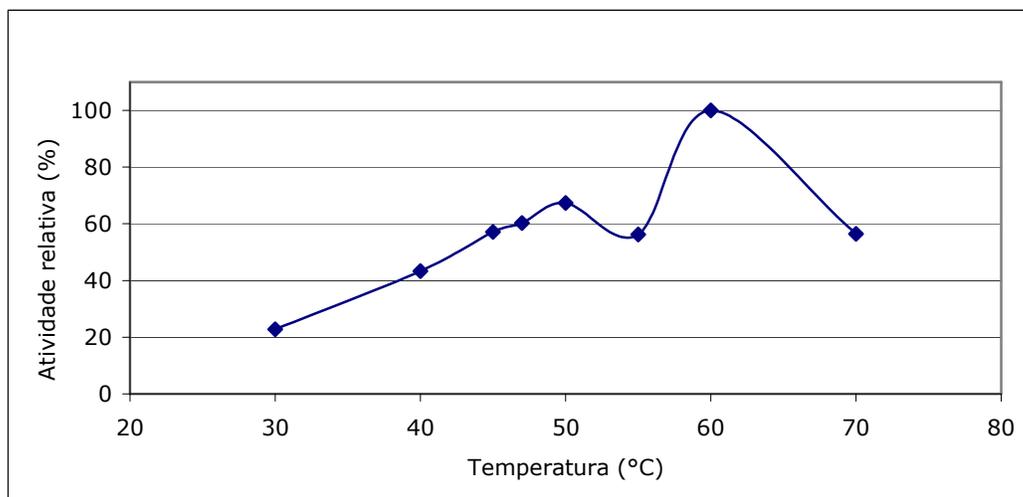


Figura 16. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de *Penicillium* sp., utilizando-se p-NPG em pH 5,0.

A Figura 17 mostra que a β -glicosidase do fungo *Penicillium* sp. apresentou-se estável a 55°C após 30 minutos de tratamento em pH 5,0, sendo inativada a 70°C. A enzima mostrou-se mais termoestável que as β -glicosidasas de *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma viride*, e apresentou menor estabilidade que a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. que mostrou-se estável a 60°C após 30 minutos de tratamento em tampão acetato 0,05 M pH 4,5, restando cerca de 80% de atividade inicial (Figura 21).

A estabilidade térmica da β -glicosidase, do fungo *Penicillium* sp., a 55°C constatado nesta pesquisa é similar às faixas de estabilidade de β -glicosidase descritas na literatura. BHIRI *et al.* (2008) purificaram e estudaram as características da β -glicosidase de *Penicillium occitanis*. As isoenzimas β -Glu 1 e β -Glu 2 mantiveram 80% de atividade após 30 minutos de tratamento térmico a 60°C, contudo a estabilidade diminuiu rapidamente a 70°C. Os autores verificaram também que a β -glicosidase de *Penicillium* sp. reteve 62% de atividade a 60°C. KARBOUNE *et al.* (2008) relataram que a β -glicosidase de *Penicillium funiculosum* mostrou-se estável a 40°C, mantendo 51% da atividade residual a 60°C e 6% da atividade a 65°C após 2 horas de tratamento térmico. A β -glicosidase de *Penicillium brasilianum* manteve-se estável por 24 horas a 60°C na faixa de pH entre 4,0 e 6,0, sendo que a atividade residual a 65°C foi de 50% (KROUH *et al.*, 2010).

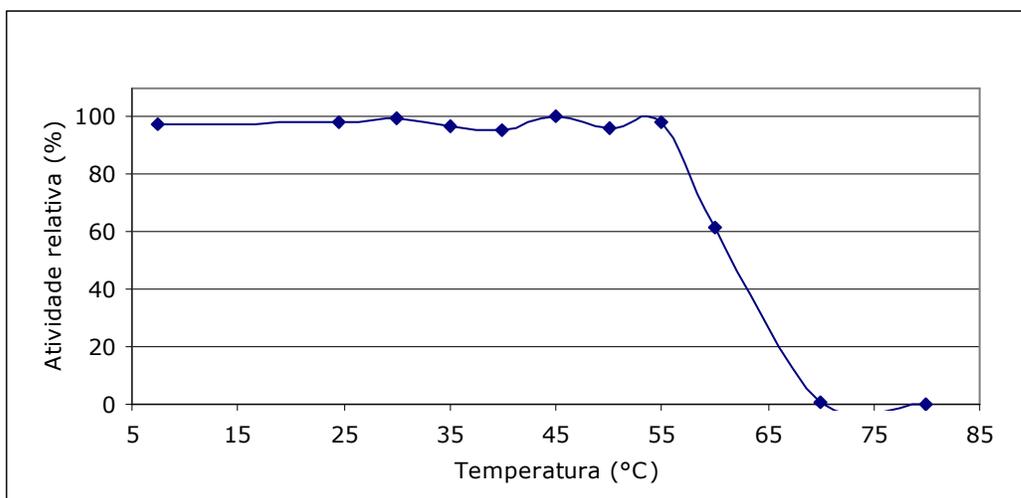


Figura 17. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de *Penicillium* sp., utilizando-se p-NPG em pH 4,0

A Figura 18 mostra que a β -glicosidase de *Penicillium* sp. apresentou atividade ótima em pH 4,0 a 60°C.

O resultado encontra-se próximo aos valores relatados por BHIRI *et al.* (2008) que verificaram que as isoenzimas β -glicosidasas de *Penicillium occitanis* apresentaram pH ótimo de atividade a 4,5 assim como o valor descrito por KARBOUNE *et al.* (2008) para a enzima do *Penicillium funiculosum*. COPA-PATIÑO *et al.* (1990) relatou um pH ótimo em 4,0 para a β -glicosidase de *Penicillium oxalicum*. KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que a β -glicosidase produzida por *Penicillium verruculosum* apresentou máximo de atividade em pH 5,0.

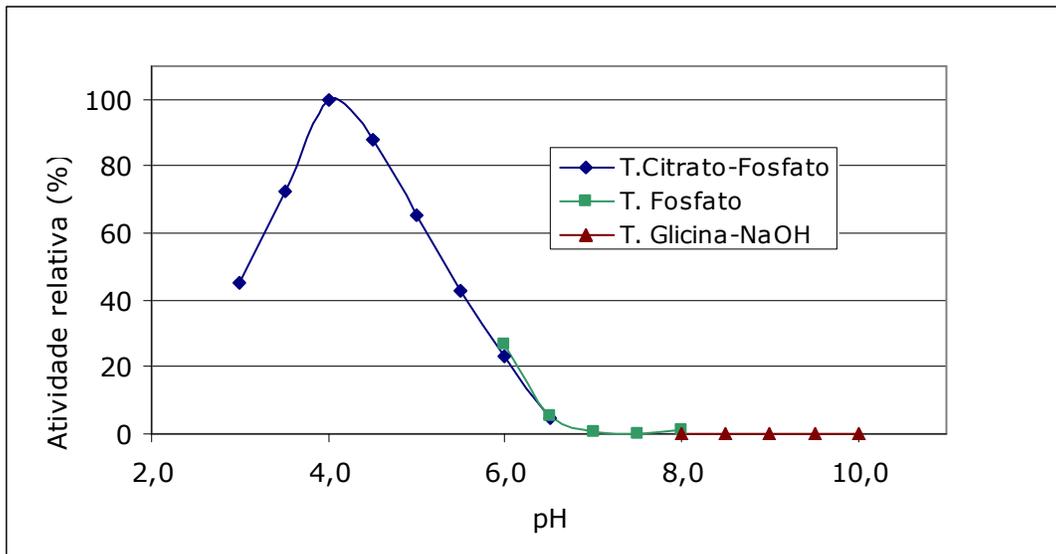


Figura 18. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de *Penicillium* sp., utilizando-se substrato p-NPG a 60°C

A Figura 19 ilustra o efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de *Penicillium* sp. A enzima apresentou-se estável na faixa de pH 3,0 até 7,0 após 2 horas de incubação a 60°C. Em valores de pH superiores a 9,0 a enzima foi inativada. A β -glicosidase de *Penicillium* sp. apresentou estabilidade ao pH similar à β -glicosidase de *Aspergillus* sp.

BHIRI *et al.* (2008) verificaram que as isoenzimas de *Penicillium occitanis* (β -Glu 1 e β -Glu 2) apresentaram estabilidade em ampla faixa de pH desde pH 3,0 até 8,0 após incubação durante 24 horas a 4°C. Enquanto que a β -glicosidase estudada por KARBOUNE *et al.* (2008) apresentou estabilidade entre 2,5 a 6,0 após incubação por 2 horas a 25°C. A β -glicosidase de *Penicillium funiculosum* mostrou estabilidade na faixa de pH entre 2,5 e 6,0, mantendo 82% da atividade após 2 horas de incubação a 25°C, sendo que em pH 2,0 e a pH 9,0 manteve, respectivamente, 68% e 41% da sua atividade inicial (KARBOUNE *et al.*, 2008).

KROUH *et al.* (2010) verificaram que a β -glicosidase de *Penicillium brasilianum* apresentou estabilidade entre pH 4 a 6,0, retendo 100% de atividade residual em pH 4,8 após 24 horas de incubação a 60°C.

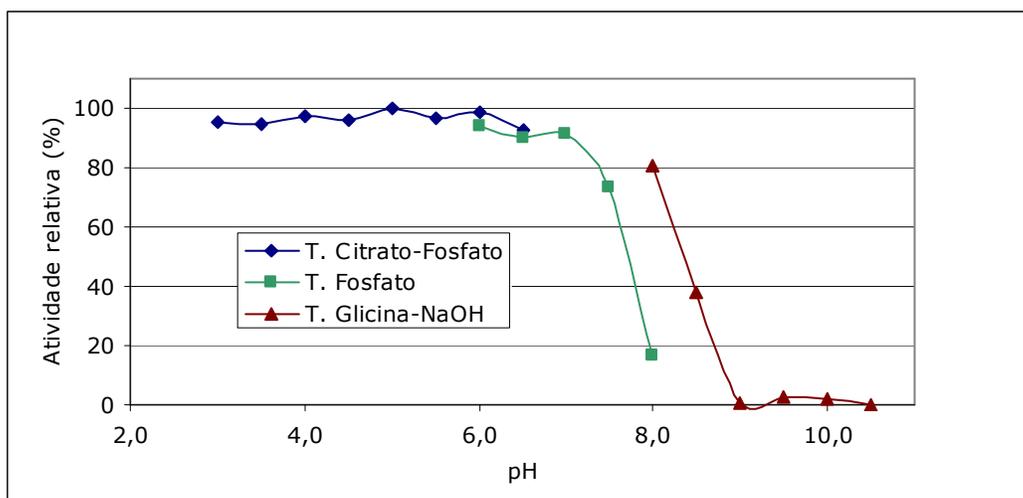


Figura 19. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de *Penicillium sp.* a 60°C

4.6 Caracterização da β -glicosidase do fungo *Aspergillus sp.*

A Figura 20 mostra que a enzima β -glicosidase do fungo *Aspergillus sp.* apresentou atividade ótima aparente a 60°C em tampão acetato 0,05 M pH 5,0. O valor obtido está de acordo com a temperatura ótima de atividade a 60°C descrita na literatura para β -glicosidasas de fungos do mesmo gênero (JÄGER *et al.* 2001; LANGSTON *et al.* 2006; TSONG-RONG *et al.* 1998; ZHANG *et al.* 2006; LE TRAON-MASSON e PELLERIN, 1998).

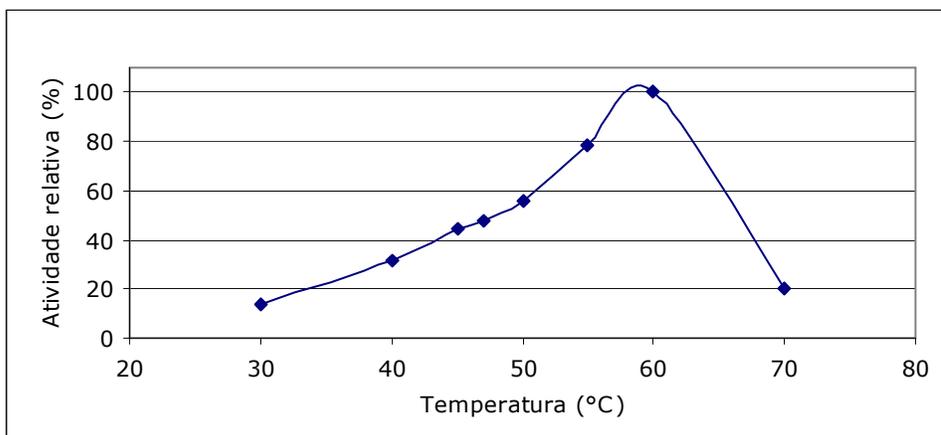


Figura 20. Efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp., utilizando-se substrato p-NPG em pH 5,0.

A Figura 21 mostra que a enzima β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. apresentou-se estável a 60°C após 30 minutos de tratamento em tampão acetato 0,05 M pH 4,5, retendo cerca de 80% da atividade inicial. A β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou ampla faixa de estabilidade (7,5°C a 60°C), e um comportamento de termoestabilidade similar à enzima do fungo *Penicillium* sp.

A faixa de estabilidade da β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. verificada nesta pesquisa é similar às descritas em estudos anteriores para β -glicosidasas de diferentes espécies do gênero *Aspergillus* que apresentam geralmente estabilidade até 50 ou 60°C.

Por exemplo, JÄGER *et al.* (2001) relataram que β -glicosidasas dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis* apresentam estabilidade até 50°C após incubação por 2 horas em pH 4,0.

A β -glicosidase do fungo *Aspergillus niger* apresentou estabilidade a 60°C, perdendo 50% da atividade inicial após 10 minutos de tratamento a 70°C (TSONG-RONG *et al.*, 1998). LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) verificaram que isoenzimas obtidas do mesmo fungo mostraram estabilidade após tratamento térmico a 50°C, perdendo cerca de 80% da atividade inicial após incubação por 1 hora a 70°C.

A β -glicosidase do fungo *Aspergillus oryzae* apresentou-se estável após tratamento térmico a 60°C por 30 minutos (ZHANG *et al.*, 2006), enquanto que uma β -glicosidase do mesmo fungo, descrita por RIOU *et al.* (1998) mostrou-se estável a 45°C após 4 horas de incubação e inativou-se em temperaturas superiores a 60°C.

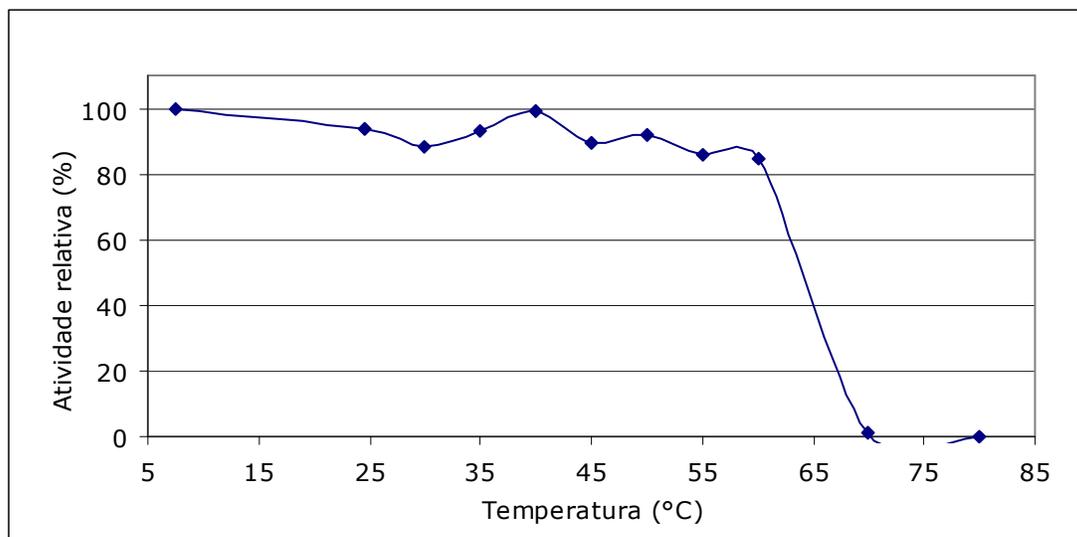


Figura 21. Efeito da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. em pH 4,5.

A Figura 22 ilustra o efeito do pH na atividade da β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. A enzima apresentou maior atividade em pH 4,5 utilizando-se o substrato p-NPG, e não apresentou atividade em pH superiores ou igual a 7,0.

O resultado é similar aos valores de pH ótimo de atividade descritos na literatura para β -glicosidasas de espécies do gênero *Aspergillus*. Por exemplo, JÄGER *et al.* (2001) estudaram β -glicosidasas das espécies *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. phoenecis* e constataram uma faixa de pH ótimo de atividade entre 4,5 – 5,0 para as enzimas estudadas. TSONG-RONG *et al.* (1998) relataram que uma β -glicosidase extracelular do fungo *Aspergillus niger* apresentou atividade ótima em pH 4,5.

Como foi mencionado anteriormente, as β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* apresentam pH ótimo de atividade na faixa de 4,5 – 6,0 (GÜNATA; VALLIER, 1999) e 5,0 (LANGSTON *et al.* 2006; ZHANG *et al.* 2006; RIOU *et al.* 1998). Desta forma o resultado obtido neste estudo é similar aos descritos em pesquisas desenvolvidas previamente para β -glicosidase de fungos do mesmo gênero.

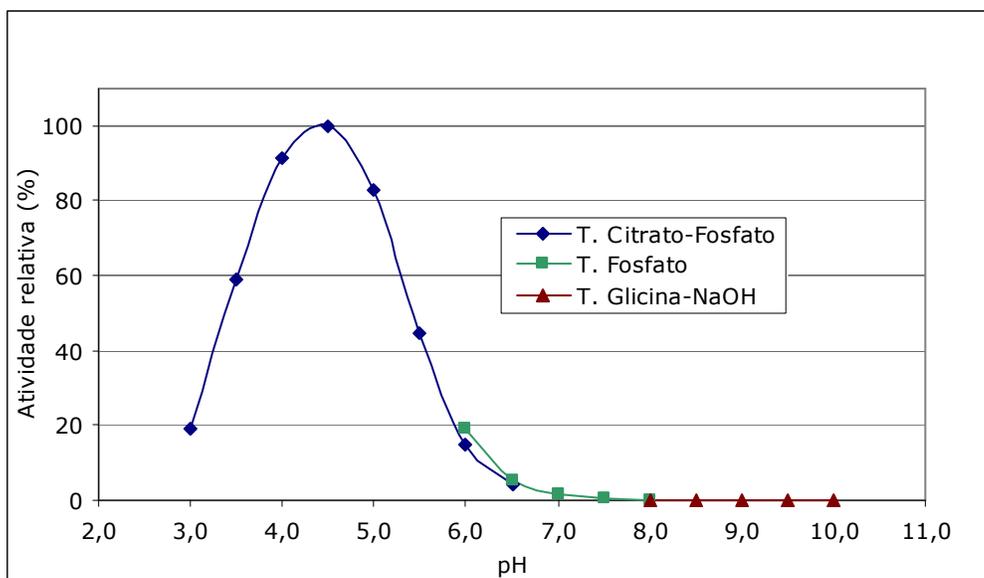


Figura 22. Efeito do pH na atividade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp., utilizando-se substrato p-NPG a 60°C

A Figura 23 mostra que a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,5 retendo mais que 80% da atividade inicial, após de 2 horas de incubação a 60°C. A enzima foi inativada em pH 10,0 e apresentou estabilidade ao pH similar à β -glicosidase de *Penicillium* sp. (Figura 19) e às β -glicosidases de *Aspergillus niger*, estudadas por LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) que apresentaram ampla faixa de estabilidade desde pH 2,0 até 9,0; perdendo 70% e 80%, respectivamente, da atividade inicial após incubação em pH 10,0 por 1 hora a 40°C. Contudo, a isoenzima β -glicosidase II, do mesmo fungo, estudada por TSONG-RONG *et al.* (1998) apresenta uma faixa de estabilidade mais estreita de pH 4,0 até 6,5. ZHANG *et al.* (2006) verificaram que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* mostrou uma faixa estreita de pH de

estabilidade entre 4,0 até 5,0 após 30 minutos de incubação enquanto que RIOU *et al.* (1998) constataram uma faixa de estabilidade entre pH 3,0 e 7,0 para a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, com alta tolerância à glicose. JÄGER *et al.* (2001) constataram que as β -D-glicosidasas dos fungos *A. niger* e *A. phoenicis* apresentam estabilidade na faixa de pH entre 4,0 e 8,0.

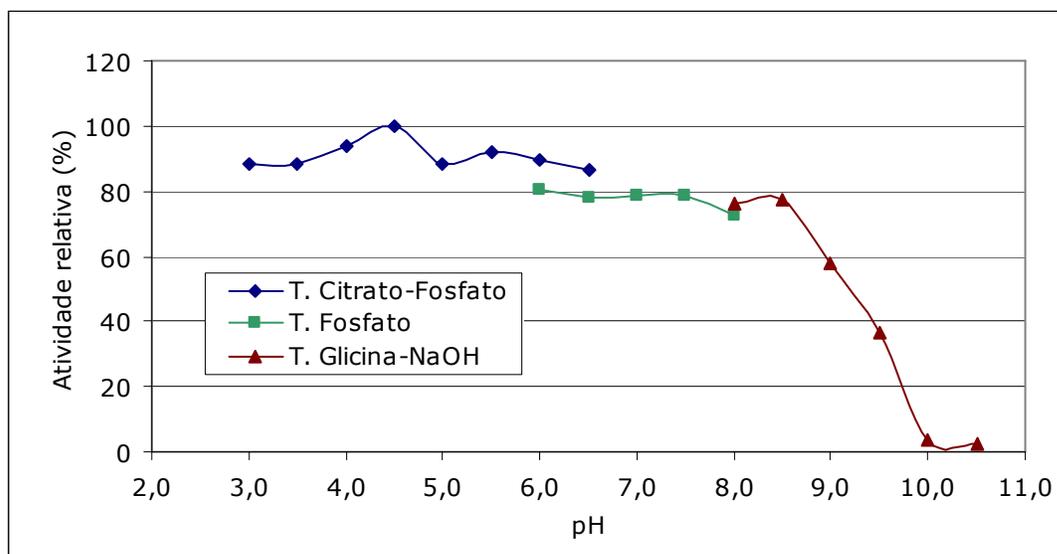


Figura 23. Efeito do pH na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus sp.* a 60°C

4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima β -glicosidase do fungo *Aspergillus sp.*

A Figura 24 mostra o efeito da concentração de p-NPG na atividade da β -glicosidase de *Aspergillus sp.* determinado na temperatura e pH ótimo de atividade da enzima (60°C e 4,5). A enzima apresentou cinética do tipo Michaelis-Menten e os resultados obtidos ajustaram-se numa linha reta no sistema gráfico de Lineweaver-Burk.

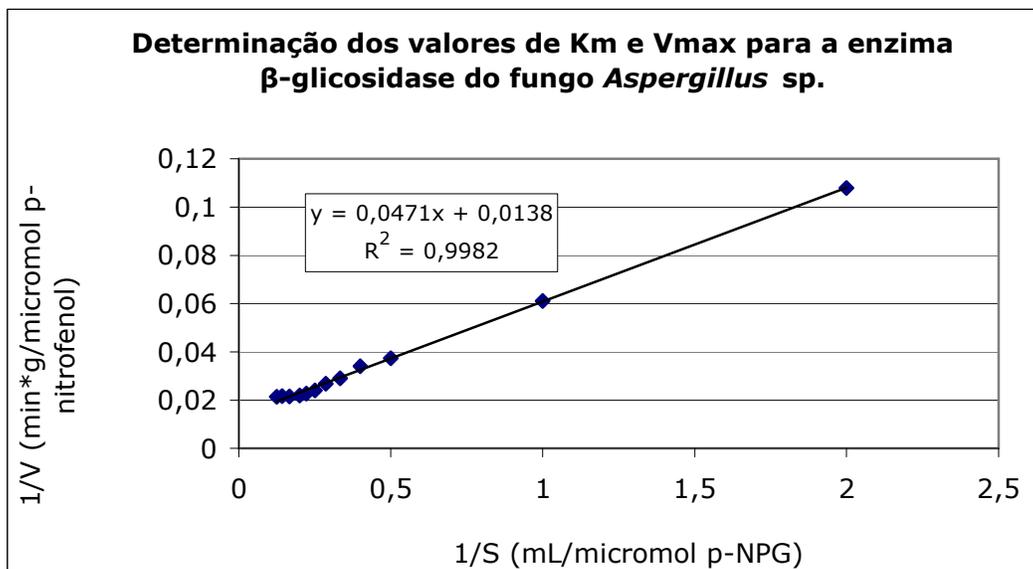


Figura 24. Efeito da concentração de p-NPG na atividade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. a 60°C e pH 4,5.

Verificou-se que a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou valor de Km igual a 3,41 mM e de Vmax igual a 33,21 μ mol p-nitrofenol por min por mg de proteína ou 72,46 μ mol p-nitrofenol por mL por min. O valor de Km obtido para a β -glicosidase de *Aspergillus* sp. foi maior que os valores de Km de β -glicosidases das linhagens *Aspergillus phoenicus* ATCC 1315B, *Aspergillus phoenicus* QM 329 e *Aspergillus niger* BKM F-135, estudadas por FLACHNER e RECZEY (2004) que apresentaram, respectivamente, 2,18 mM; 2,29 mM e 2,3 mM de p-NPG e também β -glicosidases de *Aspergillus niger* estudada por TSONG-RONG *et al.* (1998) que apresentou valor de Km igual a 2,2 mM de p-NPG.

As β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* estudadas por LANGSTON *et al.* (2006), ZHANG *et al.* (2006) e RIOU *et al.* (1998) apresentaram valores de Km iguais a 0,29 mM; 0,74 mM e 0,55 mM de p-NPG, respectivamente.

4.8 Características das β -glicosidases dos fungos estudados

As características das β -glicosidases dos fungos *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* encontram-se resumidos na Tabela 8.

As β -glicosidases de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. apresentaram maior temperatura de estabilidade e faixa mais ampla de pH de estabilidade do que as β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma viride*.

A β -glicosidase de *Penicillium* sp. apresentou atividade ótima em pH mais ácido (pH 4,0 a 60°C), comparada com as β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma viride* que apresentaram atividade ótima em torno de pH 5,0-5,5.

Tabela 8. Características bioquímicas das β -glicosidases de *Aspergillus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma viride* testadas utilizando-se p-NPG.

Linhagem fúngica	pH ótimo de atividade	Temperatura ótima (°C)	Temperatura de estabilidade (°C)	pH de estabilidade
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0 – 5,5 e 7,0	40 - 45	45	5,0 – 7,0
<i>Trichoderma viride</i>	5,0 – 5,5	45	45	5,0 – 7,0
<i>Penicillium</i> sp.	4,0	50 e 60	55	3,0 – 7,0
<i>Aspergillus</i> sp.	4,5	60	60	3,0 – 8,5

4.9 Purificação da β -glicosidase de *Aspergillus* sp.

A enzima β -glicosidase foi parcialmente purificada através de fracionamento com sulfato de amônio e adsorção em coluna DEAE-celulose equilibrada com

tampão fosfato 50 mMol/L pH 7,0. A Figura 25 mostra o perfil da eluição cromatográfica da enzima em coluna DEAE-celulose.

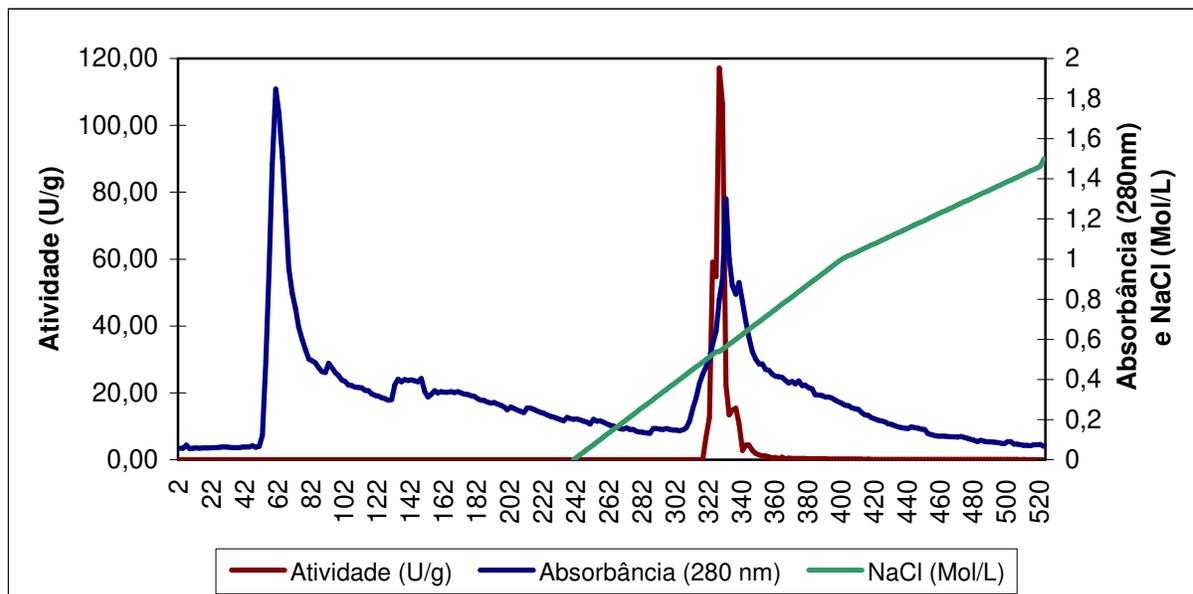


Figura 25. Purificação de β -glicosidase de *Aspergillus* sp. através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose

O pico principal de atividade de β -glicosidase, correspondente às frações de 324 a 328, foi eluído com tampão contendo aproximadamente 0,5 Mol/L de NaCl. A fração 327 e 328 foram as mais ativas correspondendo à 117,17 U/g e 106,5 U/g. Para a caracterização bioquímica da β -glicosidase parcialmente purificada foram selecionadas estas frações.

A recuperação da enzima foi de 2,5% e a β -glicosidase foi purificada cerca de 38 vezes, após precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e cromatografia em DEAE-celulose, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Purificação da β -glicosidase de *Aspergillus* sp.

Etapa	Vol. (mL)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Total (U/mL)	Atividade Específica (U/ mg de proteína)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato Bruto	475	760,44	13612,68	17,90	100,00	1,00
Sulfato de Amônio	35	197,72	13424,40	67,90	98,61	3,79
DEAE-Celulose	3,2	0,50	340,81	681,62	2,5	38,08

Diversos métodos de purificação de β -glicosidase tem sido descritos na literatura. DECKER *et al.* (2001) isolaram quatro β -glicosidasess de *Aspergillus tubingensis* após quatro etapas de purificação, incluindo cromatografia de troca iônica, onde foram utilizadas colunas de DEAE-Sephadex A-50 e DEAE-Sepharose Fast Flow e filtração em gel, resultando em fatores de purificação das β -glicosidasess que variaram de 13,2 a 114,2 e recuperação de 0,5% a 33,9%.

ABDEL-NABY *et al.* (1998) purificaram três celobiasess do extrato produzido por *Aspergillus niger*, resultando em um fator de purificação de 23,0; 14,9 e 17,5 para as isoenzimas A, B e C, respectivamente, através de concentração por ultrafiltração e sulfato de amônio a 80% de saturação e cromatografia em colunas de Sephadex G-75 e DEAE-celulose.

ZHANG *et al.* (2007) purificaram a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* através de concentração com sulfato de amônio a 80% de saturação e cromatografia de troca-iônica DEAE-celulose resultando em um fator de purificação de 12,6 com recuperação de 12,9%.

4.10 Eletroforese SDS-PAGE da β -glicosidase de *Aspergillus* sp.

A Figura 26 mostra a eletroforese SDS-PAGE das amostras de β -glicosidase do extrato bruto, do extrato precipitado com sulfato de amônio e parcialmente purificado de *Aspergillus* sp. Pode-se observar que o extrato bruto (b) e o extrato precipitado com sulfato de amônio (c) apresentaram diversas bandas de proteínas. A β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. (d) apresentou uma banda com massa molecular estimada em 138 kDa (Figura 27).

Esse resultado é similar aos resultados descritos por RIOU *et al.* (1998) em que a β -glicosidase purificada de *Aspergillus oryzae* apresentou massa molecular estimada em 130 kDa por eletroforese SDS-PAGE e por IWASHITA *et al.* (1998) em que as β -glicosidasas purificadas de *Aspergillus kawachii* mostraram massa molecular estimada em 145 kDa e 130 kDa.

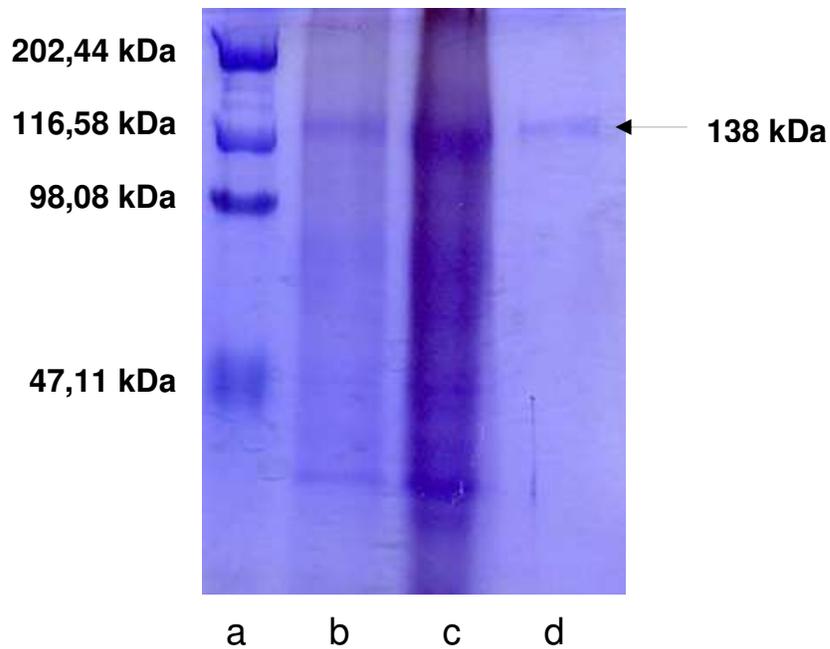


Figura 26. Gel de eletroforese SDS-PAGE da β -glicosidase do extrato bruto, extrato obtido por precipitação com sulfato de amônio e parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

- a) Mistura de padrões de massas moleculares: miosina (202,44 kDa); β -galactosidase (116,58 kDa); soro albumina bovino (98,08 kDa); ovoalbumina (47,11 kDa).
- b) Extrato bruto de *Aspergillus* sp.
- c) Extrato precipitado com sulfato de amônio a 80% de saturação
- d) β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada

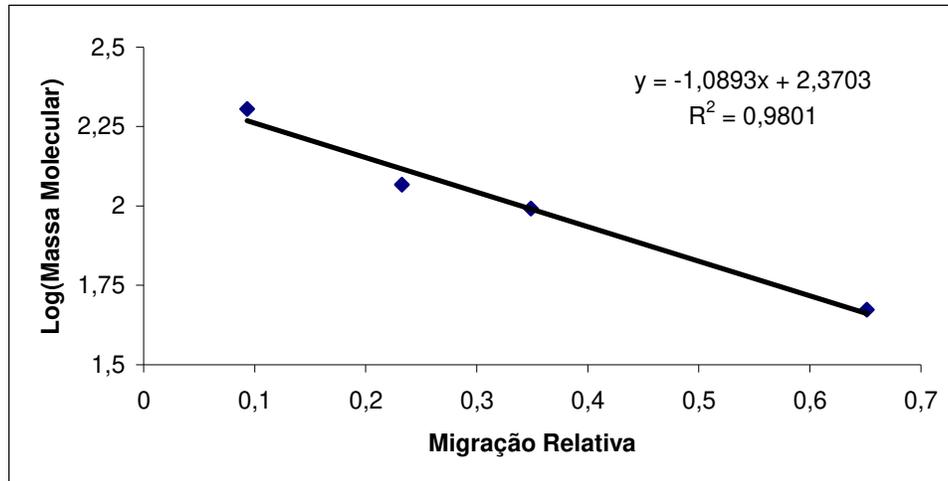


Figura 27. Determinação da massa molecular da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. por eletroforese SDS-PAGE

4.11 Determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada

Os resultados dos ensaios realizados para o planejamento experimental completo 2² para a determinação do pH e temperatura ótima estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Planejamento experimental fatorial 2² para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β-glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

Ensaio	T	pH	Temperatura (°C)	pH	Atividade residual (%)
1	-1	-1	53	3,8	32,05
2	+1	-1	67	3,8	13,09
3	-1	+1	53	5,2	54,55
4	+1	+1	67	5,2	35,64
5	0	0	60	4,5	100
6	0	0	60	4,5	98,23
7	0	0	60	4,5	98,41
8	-1,41	0	50	4,5	53,68
9	+1,41	0	70	4,5	4,05
10	0	-1,41	60	3,5	18,82
11	0	+1,41	60	5,5	53,95

No estudo da determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β-glicosidase, observou-se que foram obtidos os valores máximos de atividade de β-glicosidase nas condições de ponto central, ou seja, temperatura de 60°C e pH 4,5.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 11. Com exceção da interação entre o pH e a temperatura, todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a atividade enzimática em função dos parâmetros estatisticamente significativos a 5% de significância, está ilustrado pela equação abaixo:

Atividade residual (%) = 98,88 -13,51T + 11,84pH - 34,71T² - 30,95pH², onde pH representa o valor codificado do pH e T o valor codificado da temperatura.

Tabela 11. Coeficientes de regressão a partir do modelo codificado para a atividade de β -glicosidase

Fatores	Coef. de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	Lim. de conf. - 95%	Lim. de conf. +95%
Média	98,88	3,04	32,58	0,000001	91,08	106,68
Temperatura (L)	-13,51	1,86	-7,27	0,000771	-18,29	-8,73
Temperatura(Q)	-34,71	2,21	-15,69	0,000019	-40,39	-29,02
pH (L)	11,84	1,86	6,37	0,001409	7,06	16,62
pH (Q)	-30,95	2,21	-13,99	0,000034	-36,63	-25,26
pH x Temperatura *	0,01	2,63	0,004	0,996718	-6,75	6,77

*Parâmetro não estatisticamente significativo.

A ANOVA (Tabela 12) demonstra que houve um bom ajuste do modelo, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 98,86%.

Tabela 12. Análise de variância do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	12041,9731	4	3010,493	130,08	0,000005
Resíduos	138,1775	6	23,030		
Falta de Ajuste	136,28	3	34,069	35,82	
Erro Puro	1,90	2	0,951		
Total	12180,15	10			

$$R^2 = 0,9886; F_{4; 6; 0,05} = 4,53$$

Como podemos observar na Figura 28, a maior atividade de β -glicosidase corresponde aos pontos centrais, onde podemos notar a inflexão da curva na superfície de resposta. Foram obtidas atividades elevadas quando a reação ocorreu em temperaturas entre 53 a 60 °C e pH entre 3,8 e 5,2.

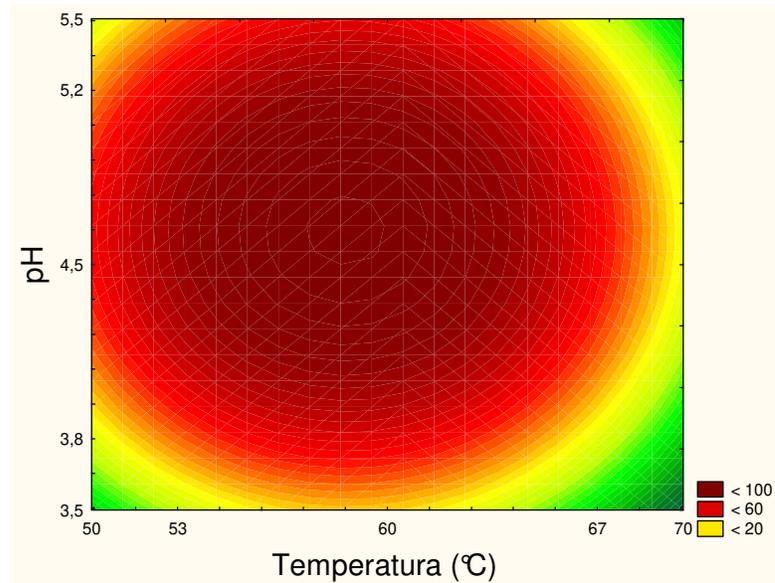
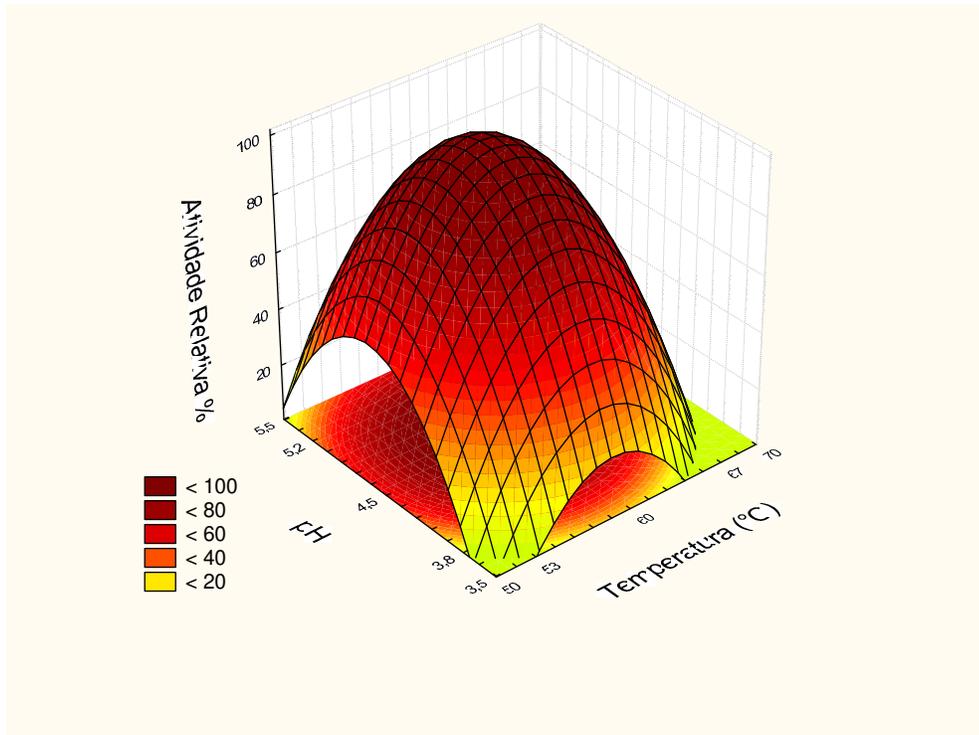


Figura 28. Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da temperatura e pH na atividade de β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

Os valores de pH e temperatura ótima de atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. determinados através de planejamento experimental foram similares aos obtidos por ensaios univariáveis utilizando-se extrato enzimático bruto.

JÄGER *et al.* (2001) verificaram que as β -glicosidases purificadas e produzidas pelas espécies *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius* apresentaram temperatura ótima de atividade a 60°C e pH ótimo de atividade entre 4,5 - 5,0.

TSONG-RONG *et al.* (1998), purificaram e caracterizaram a β -glicosidase II do fungo *Aspergillus niger*. A enzima apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C.

As β -glicosidases purificadas de linhagens de *Aspergillus oryzae* estudadas por LANGSTON *et al.* (2006) e ZHANG *et al.* (2007) apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e 60°C.

LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) purificaram e caracterizaram duas β -D-glicosidases de *Aspergillus niger*, e verificaram que as enzimas β -D-glicosidase A e β -D-glicosidase B apresentaram respectivamente atividade ótima em pH 4 e 60°C e em pH 3 e 70°C.

RIOU *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* e verificaram a presença de duas isoenzimas no extrato enzimático. A enzima minoritária apresentou atividade ótima a 50°C e pH 5,0 utilizando-se o substrato p-NPG.

A β -glicosidase purificada de uma linhagem de *Aspergillus niger* apresentou atividade ótima a 50°C e pH 4,5 (WATANABE *et al.*, 1992).

KOROTKOVA *et al.* (2009) verificou que a β -glicosidase produzida por *Aspergillus japonicus* apresentou máximo de atividade em pH ácido, 4,5 a 5,0 e temperatura de 65°C.

4.12 Determinação do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada

Os resultados dos ensaios realizados para o planejamento experimental completo 2^2 para a determinação do pH e temperatura na estabilidade da β -glicosidase estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Planejamento experimental fatorial 2^2 para a determinação do pH e temperatura de estabilidade da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. parcialmente purificada.

Ensaio	T	pH	Temperatura (°C)	pH	Atividade residual (%)
1	-1	-1	35,8	3,6	66,04
2	+1	-1	64,2	3,6	0,16
3	-1	+1	35,8	6,4	10,31
4	+1	+1	64,2	6,4	0,22
5	0	0	50	5,0	97,14
6	0	0	50	5,0	97,70
7	0	0	50	5,0	99,45
8	-1,41	0	30	5,0	100
9	+1,41	0	70	5,0	0
10	0	-1,41	50	3,0	0,93
11	0	+1,41	50	7,0	0

A β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. manteve cerca de 97% de sua atividade após tratamento por 2 horas em pH 5,0 e temperaturas 30 a 50°C. A enzima apresentou apenas 0,22% de atividade residual à temperatura de 64,2°C e foi totalmente inativada a 70°C. Em pH 3,0 a enzima apresentou menos de 1,0% de atividade residual e foi totalmente inativada em pH 7,0 após incubação por 2 horas a 50°C (Tabela 13, Figura 29).

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 14. Os parâmetros pH (L) e interação entre o pH e a temperatura não foram considerados estatisticamente significativos, sendo adicionados aos resíduos.

Tabela 14. Coeficientes de regressão a partir do modelo codificado para a atividade de β -glicosidase.

Fatores	Coef. de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	Lim. de conf. - 95%	Lim. de conf. +95%
Média	17,88	1,47	12,14	0,000067	14,10	21,67
Temperatura (L)	-4,95	0,90	-5,49	0,002735	-7,27	-2,63
Temperatura(Q)	-4,66	1,07	-4,34	0,007430	-7,42	-1,90
pH (L) *	-1,30	0,90	-1,44	0,209895	-3,62	1,02
pH (Q)	-9,17	1,07	-8,54	0,000362	-11,94	-6,41
pH x Temperatura *	2,54	1,28	1,99	0,102902	-0,74	5,82

*Parâmetros não estatisticamente significativos.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a atividade residual em função dos parâmetros estatisticamente significativos a 5% de significância, está ilustrado pela equação abaixo:

Atividade residual (%) = $17,88 - 4,95T - 4,66T^2 - 9,17pH^2$, onde pH representa o valor codificado do pH e T o valor codificado da temperatura.

A partir do modelo obtido foi possível calcular a ANOVA para a atividade residual de β -glicosidase (Tabela 15). A partir da análise de variância verificou-se que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi cerca de 91%. Concluiu-se que o modelo é significativo e preditivo.

Tabela 15. Análise de variância do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura de estabilidade da β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{cal}	p-valor
Regressão	695,4734	3	231,824	22,57	0,00056
Resíduos	71,8865	7	10,270		
Falta de Ajuste	71,7925	5	14,359	305,51	
Erro Puro	0,0940	2	0,047		
Total	767,3599	10	76,736		

$R^2 = 0,9063$; $F_{3; 7; 0,05} = 4,35$

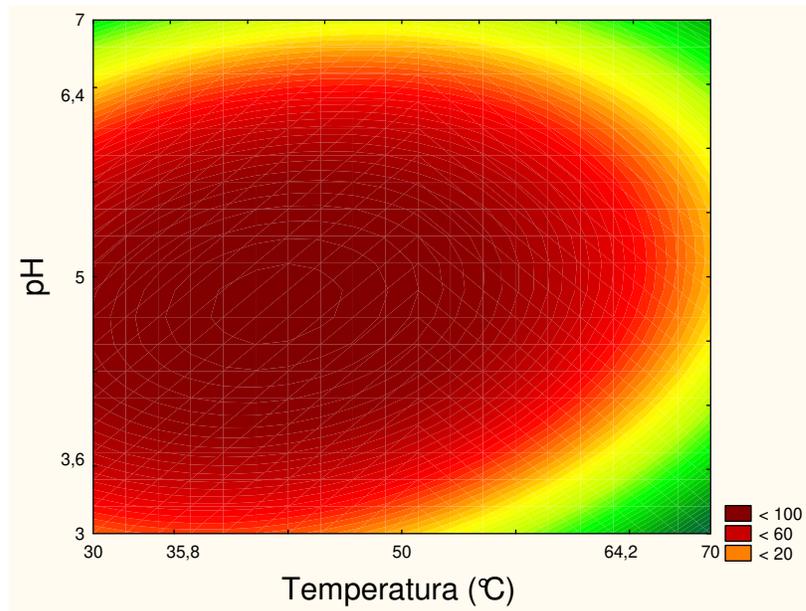
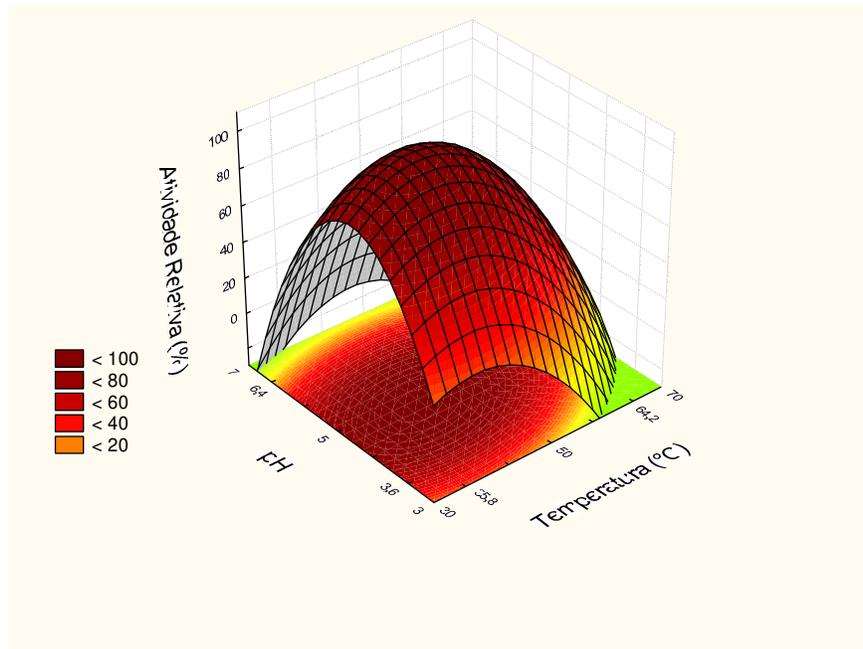


Figura 29. Superfície de resposta e curvas de contorno do efeito da temperatura e pH na estabilidade de β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp.

A β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. apresentou menor estabilidade comparada à enzima do extrato bruto. Em estudo univariável a β -glicosidase do extrato bruto de *Aspergillus* sp. mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,5 após 2 horas a 60°C e estável até 60°C por 30 minutos em pH 4,5, enquanto que a β -glicosidase purificada apresentou maior estabilidade em pH 5,0 após 2 horas na faixa de 30°C - 50°C em estudo utilizando planejamento experimental.

A β -glicosidase parcialmente purificada deste estudo apresentou estabilidade semelhante ao encontrado por TSONG-RONG *et al.* (1998), para a β -glicosidase purificada produzida por *Aspergillus niger* que apresentou estabilidade na faixa de pH entre 4,0 – 6,5, diminuindo rapidamente a sua atividade em valores maiores que 7,0 e menores que 4,0. Os autores verificaram em estudo univariável que a β -glicosidase de *Aspergillus niger* mostrou-se estável após tratamento térmico a 60°C, perdendo 50% após 10 minutos de tratamento a 70°C.

A isoenzima β -glicosidase minoritária purificada por GÜNATA e VALLIER (1999) de *Aspergillus oryzae* apresentou estabilidade na faixa de 3,0 – 7,0, sendo que não ocorreu perda na atividade após 24 horas de incubação a 20°C.

ZHANG *et al.* (2007) verificaram em estudo univariável que a β -D-glicosidase purificada da linhagem *Aspergillus oryzae* mostrou-se estável até 60°C após tratamento térmico por 30 minutos e estável numa faixa estreita de pH de 4,0 - 5,0, após 30 minutos de incubação a 60°C.

As duas β -D-glicosidases de *Aspergillus niger* purificadas e caracterizadas por LE TRAON-MASSON e PELLERIN (1998) mostraram-se estáveis na faixa de pH entre 2,0 e 9,0 perdendo respectivamente 70% e 80% da atividade inicial após incubação a pH 10 por 1 hora. Após tratamento térmico as enzimas apresentaram-se estáveis até 50°C, perdendo aproximadamente 80% da atividade inicial após incubação por 1 hora a 70°C.

RIOU *et al.* (1998) verificaram que as β -glicosidases purificadas de *Aspergillus oryzae*, apresentaram estabilidade após 4 horas de incubação até 45°C e foram inativadas em temperaturas superiores a 60°C. Em estudo univariável a β -

glicosidase apresentou-se estável na faixa de pH entre 3,0 até 7,0, retendo 60% da atividade inicial após incubação por 24 horas a pH 2,5 e 20°C.

WATANABE *et al.* (1992) constatou que a β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* apresentou estabilidade na faixa de pH de 5,0 - 8,0 quando incubada a 20°C por 20 horas e em temperaturas inferiores a 45°C em pH 4,5 por 30 minutos.

4.13 Determinação da atividade da β -glicosidase bruta e parcialmente purificada de *Aspergillus sp.* sobre diferentes substratos.

A β -glicosidase parcialmente purificada apresentou maior atividade sobre os substratos p-NPG β -glucopiranosídeo, celobiose e amigdalina em comparação a β -glicosidase presente no extrato bruto produzido pelo fungo *Aspergillus sp.* (Tabela 16). O incremento da atividade da β -glicosidase parcialmente purificada sobre os substratos testados, pode ser explicado pela maior pureza da enzima, maior quantidade de proteínas e remoção de interferentes durante as etapas de purificação.

Verificou-se que a β -glicosidase de *Aspergillus sp.* apresentou maior atividade sobre o dissacarídeo celobiose (4-o- β -D-glicopiranosil-D-glicose), seguido pelo substrato sintético p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo e menor atividade sobre o substrato cianogênico amigdalina (D-mandelonitrile 6-o- β -D-glicosídeo β -D-glucosídeo).

Tabela 16. Atividade da β -glicosidase de *Aspergillus sp.* do extrato bruto e do extrato parcialmente purificado sobre os substratos p-NPG, celobiose e amigdalina

Substrato	β -glicosidase bruta (U/g)	β -glicosidase parcialmente purificada (U/g)
p-NPG	25,75	117,17
Celobiose	45,88	107,79
Amigdalina	9,29	24,12

5 CONCLUSÕES

A linhagem *Aspergillus* sp. produziu, entre as linhagens testadas, maior atividade de β -glicosidase utilizando os substratos celobiose (45,88 U/g), p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (25,75 U/g) e amigdalina (9,20 U/g), em meio 3.

A β -glicosidase bruta de *Aspergillus* sp. apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C, mostrou-se estável até 60°C após 30 minutos de tratamento em pH 4,5 e na faixa de pH entre 3,0 - 8,5 após 2 h a 60°C. A β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou valor de Km 3,41 mM e Vmax 33,21 μ mol p-nitrofenol por min. por mg de proteína ou 72,46 μ mol p-nitrofenol por mL por min. utilizando-se o substrato p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo.

O extrato enzimático bruto de *Penicillium* sp. apresentou duas isoenzimas com atividade de β -glicosidase ótima a 50°C e 60°C em pH 4,0. As β -glicosidases de *Penicillium* sp. apresentaram estabilidade após tratamento térmico a 55°C durante 30 minutos em pH 5,0 e na faixa de pH de 3,0 - 7,0 após 2 h a 60°C.

A β -glicosidase de *Trichoderma viride* apresentou atividade ótima a 45°C e pH 5,0 – 5,5 e mostrou-se estável após tratamento a 45°C durante 30 minutos em pH 5,0 e estável na faixa de pH 5,0 - 7,0 após 2 h a 45°C.

O extrato enzimático bruto obtido de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade ótima de β -glicosidase em pH 5,0 – 5,5 e 7,0, sugerindo a existência de duas isoenzimas. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 40 – 45°C e mostrou-se estável após tratamento térmico a 45°C durante 30 minutos em pH 5,0 e estável na faixa de pH 5,0 – 7,0 após 2 h a 47°C.

A β -glicosidase de *Aspergillus* sp. apresentou maior estabilidade à temperatura e pH em relação às β -glicosidases de *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma viride*.

A β -glicosidase de *Aspergillus* sp. foi purificada cerca de 38 vezes com recuperação de 2,5% após fracionamento com sulfato de amônio 80% e cromatografia em coluna DEAE-celulose.

Utilizando-se estudo de planejamento experimental a β -glicosidase parcialmente purificada apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 60°C e

estabilidade na faixa de pH de 3,6 - 5,0 e temperatura de 30 - 50 °C após 2 h de incubação.

A β -glicosidase bruta e parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. hidrolisa os substratos celobiose e amigdalina, podendo ser utilizada em processos biotecnológicos como na hidrólise de materiais celulósicos em combinação com enzimas celulolíticas para produção de glicose e posterior obtenção de etanol e também na degradação de compostos cianogênicos de plantas e resíduos agroindustriais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo do efeito da aplicação de β -glicosidase de *Aspergillus* sp. na hidrólise de bagaço de cana pré tratada com calor e pressão, com enzimas celulotíticas comerciais.
- Aplicação da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. na hidrólise de compostos cianogênicos e glicosilados de frutas e vegetais.
- Aplicação da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. na transformação de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas.
- Imobilização da β -glicosidase de *Aspergillus* sp.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M.A.; OSMAN, M.Y.; ABDEL-FATTAH, A. F. Purification and properties of three cellobiases from *Aspergillus niger* A 20. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v.76, p. 33- 44, 1999.
- BERENQUER-NAVARRO, V.; GINER-GALVÁN, R.M.; GRANÉ-TERUEL, N. Chromatographic determination of cyanoglycosides prunasin and amygdalin in plant extracts using a porous graphitic carbon column. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 50, p. 6960 – 6963, 2002.
- BHIRI, F.; CHAABOUNI, S.E.; LIMAN, F.; GHRIR, R.; MARZOUKI, N. Purification and biochemical characterization of extracellular β -glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 149, p. 169-182, 2008.
- BOLHUIS, G. G. The toxicity of cassava roots. ***Netherlands Journal of Agricultural Science***, Wageningen, v. 2, n. 3, p. 176- 185, 1954.
- BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA, N.J. Enzimas na produção de etanol. In: BON E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.A. (Org.). ***Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado***. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.
- BRADBURY, J.H.; EGAN, S.V.; LYNCH, M.J. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 5, p. 277-290, 1991.
- BRIMER, L.; CICALINI, A.R.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. ***Archives of Microbiology***. v. 169, p. 106-112, 1998.
- BRIMER, L.; NOUT, M.J.R.; TUNCEL, G. β -glicosidase (amygdalase and linamarase) from *Endomyces fibuliger* (LU677): formation and crude enzyme properties. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 49, p. 182-188, 1998.

- BRIMER, L.; ROSLING, H. A microdiffusion method with solid state detection of cyanogenic glycosides from cassava in human urine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, p. 599-603, 1993.

- CAIRNS, T.; FROBERG, J. E.; GONZALES, S.; LANGHAM, W. S.; STAMP, J. J.; HOWIE, J. K.; SAWYER, D. T.. Analytical chemistry of amygdalin. **Analytical Chemistry**, v. 50, p. 317-322, 1978.

- CHASSAGNE, D.; BOULANGER, R.; CROUZET, J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. **Food Chemistry**, v. 66, p. 281-288, 1999.

- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A Cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 757-759, 1998.

- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.C.; BAYONOVE, C. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3817-3820, 1996.

- CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-8, 2010.

- CHEN, H. HAYN, M. ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*. **Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1121, p. 54-60, 1992.

- CHUM, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. **Food Chemistry**, v.109, p. 278-284, 2008.

- CONN, E. Cyanogenic compounds. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 433-451, 1980.

- COPA-PATIÑO, J.; RODRIGUEZ, J.; PÉREZ-LEBLIC, M. Purification and properties of a β -glucosidase from *Penicillium oxalicum autolysates*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, p. 191 – 196, 1990.

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

- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 94, p. 1-23, 2004.

- EMINEDOKI, D.G.; MONANN, M.O.; ANOSIKE, E.O. Thiocyanate levels of mainly dietary origin in serum and urine from a human population sample in Port Harcourt, Nigeria. ***Plant Foods for Human Nutrition***, v. 46, p.277-285, 1994.

- FERRARI, R.; COLUSSI, F.; AYUB, R. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – Aproveitamento das sementes. ***Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP***, v.. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

- FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. ***Chemical and Biochemistry Engineering***, v. 18, n. 3, p. 303-307, 2004.

- GLEADOW, R.; VECCHIES, A.; WOODROW, I. Cyanogenic *Eucalyptus nobilis* is polymorphic form both prunasin and specific β -glucosidases. ***Phytochemistry***, v. 63, p. 699-704, 2003.

- GLEADOW, R.M.; WODDROW, I.E. Polymorphism in cyanogenic content and cyanogenic β -glycosidase activity in natural populations of *Eucalyptus cladocalyx*. ***Australian Journal of Plant Physiology***, v.27, p. 693-699, 2000.

- GÜNATA, Z.; DUGELAY, I.; SAPIS, J.; BAUMES, R Y BAYOONOVE, C. ***Progress in Flavor Precursor Studies***. Editorial Schereirer, P y Witnrelhalter, P. Allured Publishers, Carol Stream, 1L, p. 219-234, 1993.

- GÜNATA, Z.; VALLIER, M. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidases by three *Aspergillus* strains. ***Biotechnology Letters***, v. 21, p. 219-223, 1999.

- IWASHITA, K. *et al.* Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n^o10, p. 1938-1946, 1998.

- JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHÉR, E.; RÉCZEY, K.; KISS, L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 455-461, 2001.

- JONES, D.A. Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochemistry**, v. 47, p. 155-162, 1998.

- KAKES, P. Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants. **Euphytica**, v. 48, n^o1, p. 25-43, 1990.

- KARBOUNE, S.; GERAERT, P.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 903 – 909, 2008.

- KAYA, M.; ITO, J.; KOTAKA, A.; MATSUMURA, K.; BANDO, H.; SAHARA, H.; OGINO, K.; SHIBASAKI, S.; KURODA, K.; UEDA, M.; KONDO, A.; HATA, Y. Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 51-60, 2008.

- KOVÁCS, K.; MEGYERI L.; SZAKACS G.; KUBICEK, C.P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glycosidase on pretreated willow. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 48-55, 2008.

- KOROTKOVA, O.G. ; SEMENOVA, M.V.; MOROZOVA, V.V.; ZOROV, I.N.; SOKOLOVA, L.M.; BUBNOVA, T.M.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of fungal β -glucosidases. **Biochemistry**, v. 74, n.5, p. 569-577, 2009.

- KROUH, K.B.R.M.; HARRIS, P.V.; OLSEN, C.L.; JOHANSEN, K.J.; HOJER-PEDERSON, J.; BORJESSON, J.; OLSSON, L. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 143-154, 2010.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n^o 15, p. 685-689, 1970.

- LAMBERT, J.L.; RAMASAMY, J.; PAUKSTELIS, J.V. Stable reagents for colorimetric determination of cyanide by modified Konig reactions. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 916-918, 1975

- LANGSTON, J.; SHEEHY, N.; XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 972-978, 2006.

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

- LINARDI, V. R. Produção de Celulases pelo *Trichoderma viride* QM 9414 (*T. reesei*, Simmons, 1977) frente à variação de meios de cultura, substratos celulósicos e pH. **Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1998.

- LIPITOA, S.; ROBERTSON, G.L. The enzymatic extraction of juice from yellow passion fruit pulp. **Tropical Science**, v. 19, n^o 2, p. 105-112, 1977.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265 – 275, 1951.

- MACHADO, S.S. et al. Caracterização físico-química de frutos de maracujá amarelo provenientes da região de Jabaquara, Bahia. **Magistra**, v. 15 n^o 2, p. 229-233, 2003.

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

- MATSUURA, F.C.A.U. Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais, 2005. 138p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- MELETTI, L.; MAIA, M. Maracujá: produção e comercialização. ***Boletim Técnico, Campinas: Instituto Agrônomo***, v. 181, p. 64, 1999.

- MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. ***Toxicologia de Alimentos***. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 295p.

- MLINGI, N.; POULTER, N.; ROSLING, H. An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. ***Nutrition Research***, v. 12, p. 677-687, 1992.

- MOLLER, B.L.; SEIGLER, D.S. Biosynthesis of cyanogenic glycosides, cyanolipids, and related compounds. In: Singh, B.K. (Ed.), ***Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology***. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1999, p.563-609.

- MONTGOMERY, R.D. Cyanogens. In: LIENER, I.W. (ed.), ***Toxic Constituents of Plant Foodstuffs***. New York: Academic Press, 1969, p.143-157.

- MORAN, E.A. Cyanogenetic compounds in plants and their significance in animal industry. ***American Journal of Veterinary Research***, v. 15, nº 54, p. 6-171, 1954.

- NAM, K.H.; SUNG, M.W.; HWANG, K.Y. Structural insights into the substrate recognition properties of β -glucosidase. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 391, p. 1131-1135, 2010.

- NÓBREGA, J.E.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.T.; DANTAS, F.M. Intoxicação por *Sorghum halepense* (POACEA) em bovinos no semi-árido. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v.26, nº 4, p.201-204, 2006.

- NOUT, M.J.R.; TUNCEL, G.; BRIMER, L. Microbial degradation of amygdalin of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*). ***International Journal of Food Microbiology***, v. 24, p. 407-412, 1995.

- OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Degener) para produção de doces em calda. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, v.22, nº 3, p. 259-262, 2002.

- OSUNTOKUN, B.O. Chronic cyanide intoxication of dietary origin and a degenerative neuropathy in Nigerians. ***Acta Horticulturae***, v. 375, p. 311-321, 1994.

- PADMAJA, G. Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v. 35, p. 299-339, 1995.

- PARRY, N.J. ; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDENBERGH, 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, nº 1, p.117-127, 2001.

- PETRUCCIOLI, M.; BRIMER, L.; CICALINI, A.R.; PULCI, V.; FEDERICO, F. Production and properties of the linamarase and amygdalase activities of *Penicillium aurantiogriseum* P 35. ***Bioscience, Biotechnology and Biochemistry***, v.63, nº 5, p. 805-812, 1999.

- POGORZELSKI, E.; WILKOWSKA, A. Flavour enhancement through enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. ***Flavor and Fragrance Journal***, v. 22, p. 252-254, 2007.

- POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. ***Plant Physiology***, v. 94, p. 401-405, 1990.

- QIN, Y.; HE, H.; LI, N.; LING, M.; LIANG, Z. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, p. 1-7, 2010.

- RADI, Z.A.; STYER, E.L.; THOMPSON, L.J. *Prunus* spp. Intoxication in ruminants: A case in a goat and diagnosis by identification of leaf fragments in rumen contents. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n° 6, p. 593-599, 2004.

- REDDY, N.R.; PIERSON, M.D. Reduction in antinutritional and toxic compounds in plant foods by fermentation. **Food Research International**, v. 27, p. 281-290, 1994.

- RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, M.J.; GUNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n° 10, p. 3607-3614, 1998.

- SÁENZ, J.A.; NASSAR, M. Toxic effect of the fruit of *Passiflora adenopoda* D.C. on humans: phytochemical determination. **Revista de Biología Tropical**, v. 20, n° 1, p. 40-137, 1972.

- SATHISHKUMAR, M.; JEONG, E.S.; YUN, S.E.; MUN, S.P.; RUSLING, J.F. Biocontinuous microemulsion as reaction medium for the β -glucosidase-catalyzed synthesis of *n*-hexyl- β -D-glucopyranoside. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 252-258, 2008.

- SHEN, Y.; ZHANG, Y.; MA, T.; BAO, X.; DU, F.; ZHUANG, G.; QU, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5099-5103, 2008.

- SILVA, L.A.D.; LOPES, F.C.; SILVEIRA, S.T.; BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n° 2, p. 295-305, 2009.

- SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 599-604, 2008.

- SPENCER, K.C.; SEIGLER, D.S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.31, p. 794-796, 1983.

- STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Determination of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) by high performance liquid chromatography. **Phytochemistry Analytical**, v.5, p. 271-272, 1994.

- TANIWAKI, M.; DA SILVA, N. Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. 74 p.

- TODARO, A.; PALMERI, R.; BARBAGALHO, R.N.; PIFFERI, P.G.; SPAGNA, G. Increase of *trans*-resveratrol in typical Sicilian wine using β -glucosidase from various sources. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1570-1575, 2008.

- TSONG-RONG, Y.; YI-HUI, L.; CHUN-LEIH, L. Purification and characterization of an extracellular β -Glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, nº 2, p. 431-437, 1998.

- TUNCEL, G.; NOUT, M.J.R.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. **Food Chemistry**, v. 63, p. 65-69, 1998.

- TURAN, Y.; ZHENG, M. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, nº12, p.1363-1368, 2005.

- TYLLESKÄR, T. The association between cassava and the paralytic disease Kongo. **Acta Horticulturae**, v. 375, p. 331-339, 1994.

- VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.

- ZHANG, C.; LI, D.; YU, H.; ZHANG, B.; JIN, F. Purification and characterization of piceid- β -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 83 -88, 2007.

- WATANABE, T.; SATO, T.; YOSHIOKA, S.; KOSHIMA, T.; KUWAHARA, M. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 651-659, 1992.

- WULF-STROBEL, C.R.; WILSON, D.B. Cloning, sequencing and characterization of a membrane-associated *Prevotella ruminicola* β -1,4-glucosidase with cellodextrinase and cyanoglycoside activities. **Journal of Bacteriology**, v.177, p. 5884-5890, 1995.

APÊNDICE A. Diluições dos extratos enzimáticos para os testes de caracterização da β -glicosidase bruta dos diferentes microrganismos

Microrganismo produtor	Diluições utilizadas em cada teste			
	Temp. Ótima	pH ótimo	Temp. estabilidade	pH estabilidade
<i>Aspergillus</i> sp.	1:1500	1:2000	1:1500	1:1500
<i>Aspergillus oryzae</i>	1:500	1:500	1:50	1:100
<i>Trichoderma viride</i>	1:300	1:100	1:200	1:200
<i>Penicillium</i> sp.	1:50	1:100	1:100	1:100