

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DE UMA BETA-GLICOSIDASE
DE *Monascus purpureus*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIEL JONER DAROIT

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DE UMA BETA-GLICOSIDASE
DE *Monascus purpureus*

DANIEL JONER DAROIT

(Biólogo - Centro Universitário UNIVATES)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2007

AGRADECIMENTOS

- Ao Orientador Prof. Adriano Brandelli pela oportunidade, disponibilidade, postura, confiança, respeito, atenção e amizade;
- Ao Co-orientador Prof. Plinho Francisco Hertz da mesma forma, pela inestimável contribuição em todas as etapas deste trabalho;
- À coordenação, professores e funcionários do PPGMAA;
- Ao CNPq pela bolsa de estudos fornecida;
- Às colegas Ana Carolina, Daniele, Fernanda, Luiza e Tais pela amizade e parceria, que só fez crescer e fortalecer ao longo destes dois anos;
- Aos amigos do laboratório: Amanda, Bacana, Deoni, Florência, Janice, Juliana, Lisana, Lucas, Manuela, Márcia, Mário, Roberta, Rodrigo, Rosiele, Voltaire e tantos outros, pelo convívio enriquecedor;
- De forma especial à Silvana pelo auxílio nas análises estatísticas e estudos cinéticos, e à Ana Paula pela ajuda na preparação de géis;
- À Marina e Aline pelo engajamento voluntário e enorme colaboração na realização deste trabalho;
- Aos meus pais, Dario e Helena, e à minha irmã, Dariele, incansáveis batalhadores, pelos valiosos exemplos de vida, caráter, dignidade e afeto, e por atuarem como verdadeiros alicerces para esta caminhada;
- À minha namorada Roberta pelo amor, carinho, paciência, compreensão e apoio incondicionais.

CARACTERIZAÇÃO DE UMA BETA-GLICOSIDASE DE *Monascus purpureus*¹

Autor: Daniel Joner Daroit

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-orientador: Prof Dr. Plinho Francisco Hertz

RESUMO

β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas, e diversas aplicações biotecnológicas são postuladas para β -glicosidases microbianas. Este estudo apresenta a triagem de substratos para a produção de uma β -glicosidase extracelular por *Monascus purpureus* NRRL1992 em cultivo submerso, bem como a purificação parcial e a caracterização da enzima. A produção da enzima demonstrou ser indutível e controlada por repressão catabólica. A maior produção de β -glicosidase foi observada com a utilização de resíduo de uva e peptona como substratos. A purificação parcial da β -glicosidase envolveu a precipitação com acetona e etapas de cromatografia líquida (gel-filtração e interação hidrofóbica), resultando em fator de purificação de 92 vezes e recuperação de 23% a partir do extrato bruto. A enzima apresentou atividade ótima em amplas faixas de temperaturas e pHs frente ao substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G), sendo selecionadas as condições de 50 °C e pH 5,5. A β -glicosidase demonstrou ser moderadamente termoestável, apresentando atividade residual de 78% após 120 minutos a 60 °C. Os íons Hg²⁺ e Cr³⁺ inibiram a atividade β -glicolítica, provavelmente através de modificações estruturais da enzima. β -mercaptoetanol, SDS, entre outros reagentes não afetaram a catálise. Etanol ou metanol em baixas concentrações estimularam a atividade enzimática, possivelmente devido à atuação da enzima como glicosiltransferase; contudo, o aumento na concentração destes álcoois reduziu a atividade enzimática. A hidrólise de pNP β G, celobiose, maltose, salicina e *n*-octil- β -D-glicopiranosídeo indica a ampla especificidade da enzima frente à diferentes substratos. As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram definidas para pNP β G, celobiose e maltose, sendo observados valores intermediários para β -glicosidases. Glicose e celobiose inibiram competitivamente a hidrólise de pNP β G.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (125p.). Março, 2007.

CHARACTERIZATION OF A *Monascus purpureus* BETA-GLUCOSIDASE¹

Author: Daniel Joner Daroit

Orientation: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-orientation: Prof Dr. Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

β -glucosidases are enzymes that catalyse the hydrolysis of β -glycosidic linkages, and various biotechnological applications are proposed for microbial β -glucosidases. This study presents the screening of substrates for extracellular β -glucosidase production by *Monascus purpureus* NRRL1992 in submerged cultivations, as well as the enzyme partial purification and characterization. The enzyme production showed to be inducible and controlled by catabolic repression. The higher β -glucosidase production was observed with grape residue and peptone as substrates. The β -glucosidase partial purification involved acetone precipitation and liquid chromatography steps (gel-filtration and hydrophobic interaction), resulting in a 92-fold purification factor and a recovery of 23% from the crude extract. The enzyme showed optimal activity in a wide range of temperatures and pH values for *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNP β G) hydrolysis. The optimal conditions selected were 50 °C and pH 5.5. β -glucosidase was moderately thermostable showing 78% residual activity after 120 minutes at 60 °C. Hg²⁺ and Cr³⁺ ions inhibited β -glucolytic activity, probably due to structural modifications of the enzyme. β -mercaptoethanol, SDS, among other reagents had not affected catalysis. Low concentrations of ethanol or methanol have stimulated enzyme activity, possibly due to the action of the enzyme as a glucosyltransferase. However, the increase on these alcohols concentration had diminished the enzyme activity. The hydrolysis of pNP β G, cellobiose, maltose, salicin and *n*-octyl- β -D-glucopyranoside indicate that the enzyme have a wide substrate specificity. The kinetic constants K_m and V_{max} were determined for pNP β G, cellobiose and maltose, and intermediary values were obtained. Glucose and cellobiose had competitively inhibited pNP β G hydrolysis.

1/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (125p.). March, 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIÇÕES	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 β -glicosidases (BGLs)	3
2.1.1 Aplicações biotecnológicas	6
2.1.1.1 Hidrólise enzimática de celulose	7
2.1.1.2 Otimização de aromas em sucos e vinhos	11
2.1.1.3 Liberação de compostos fenólicos	14
2.1.1.4 Outras aplicações biotecnológicas	16
2.2 Fungos filamentosos	19
2.2.1 Gênero <i>Monascus</i>	21
2.3 Resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas ...	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Microrganismo	28
3.2 Inóculo	28
3.3 Seleção de substratos para produção de BGL	29
3.4 Ensaio enzimático	29
3.5 Influência de substratos na produção de BGL extracelular	30
3.6 Repressão da produção de BGL	31
3.7 Produção de BGL extracelular	32
3.8 Purificação parcial da BGL extracelular de <i>M. purpureus</i>	32
3.8.1 Precipitação de proteínas com acetona	32
3.8.2 Cromatografia líquida de gel-filtração	33
3.8.3 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica	33
3.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis	34
3.10 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	34
3.11 Eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida e zimograma	35
3.12 Caracterização da enzima parcialmente purificada	36
3.12.1 Temperatura e pH ótimos	36
3.12.2 Estabilidade térmica	37
3.12.3 Efeito de sais, reagentes, álcoois e carboidratos sobre a atividade enzimática	38
3.12.4 Especificidade da enzima em relação a diferentes substratos	39
3.12.5 Constantes cinéticas	40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Produção de BGL extracelular por <i>M. purpureus</i> NRRL1992	42
4.2 Repressão da produção de BGL.....	47
4.3 Efeitos de componentes do meio de cultivo na produção de BGL extracelular	48
4.4 Purificação parcial da BGL extracelular produzida por <i>M. purpureus</i>	51
4.5 Caracterização da BGL parcialmente purificada	58
4.5.1 Temperatura e pH ótimos.....	58
4.5.2 Estabilidade térmica.....	66
4.5.3 Efeito de sais, reagentes, álcoois e carboidratos sobre a atividade enzimática	70
4.5.3.1 Sais	71
4.5.3.2 Reagentes.....	73
4.5.3.3 Álcoois.....	78
4.5.3.4 Carboidratos.....	82
4.5.4 Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos	85
4.5.5 Constantes cinéticas	91
5 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
VITA	125

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Produção de BGL extracelular por <i>M. purpureus</i> pós 9 dias de cultivo submerso com diferentes substratos	43
TABELA 2. Produção de BGL extracelular por <i>M. purpureus</i> utilizando diferentes concentrações de resíduo de uva e peptona (experimento fatorial 2 ²)	49
TABELA 3. Efeitos principais de variáveis independentes, e interações, na produção de BGL por <i>M. purpureus</i>	50
TABELA 4. Quadro de purificação parcial de BGL extracelular produzida por <i>M. purpureus</i> NRRL1992.....	52
TABELA 5. Atividade da BGL parcialmente purificada, frente ao substrato pNPβG, em diferentes combinações de temperatura e pH	59
TABELA 6. Efeitos de variáveis independentes (temperatura e pH), e suas interações, sobre a atividade da BGL parcialmente purificada	60
TABELA 7. Análise de variância.....	61
TABELA 8. Localização, temperatura e pH ótimos de BGLs microbianas	64
TABELA 9. Efeito de sais sobre a atividade enzimática.....	72
TABELA 10. Efeito de reagentes sobre a atividade enzimática	74
TABELA 11. Efeito de carboidratos sobre a atividade enzimática.....	83
TABELA 12. Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos cromogênicos	86
TABELA 13. Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos não-cromogênicos	89
TABELA 14. Constantes cinéticas da BGL de <i>Monascus purpureus</i>	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Produção e produtividade de BGL por <i>M. purpureus</i> em meio mineral contendo resíduo de uva (20 g/L) e peptona (5 g/L)	44
FIGURA 2. Perfil da produção de BGL por <i>M. purpureus</i> em meio mineral contendo glicose (20 g/L) e peptona (5 g/L)	48
FIGURA 3. Padrão de eluição em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração com a resina Sephadex G-100.....	53
FIGURA 4. Padrão de eluição em coluna de cromatografia líquida de interação hidrofóbica com a resina Phenyl Sepharose	55
FIGURA 5. SDS-PAGE de amostra do processo de purificação parcial.....	56
FIGURA 6. Zimograma realizado com o substrato 4-MUG após PAGE	57
FIGURA 7. Superfície de contorno para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular parcialmente purificada	62
FIGURA 8. Superfície de resposta para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular parcialmente purificada	62
FIGURA 9. Estabilidade térmica da BGL parcialmente purificada	66
FIGURA 10. Estabilidade da BGL parcialmente purificada após diferentes períodos de armazenamento a 5 °C ou -15 °C.....	70
FIGURA 11. Efeito de concentrações de etanol e metanol sobre a atividade da BGL parcialmente purificada.....	79
FIGURA 12. Hidrólise do substrato pNPβCb pela BGL parcialmente purificada	88
FIGURA 13. Efeito da concentração do substrato pNPβG sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada.....	92
FIGURA 14. Efeito da concentração do substrato celbiose sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada	93
FIGURA 15. Efeito da concentração do substrato maltose sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada.....	93
FIGURA 16. Representação de Lineweaver-Burk para a inibição da hidrólise de pNPβG por glicose	96

FIGURA 17. Representação de Lineweaver-Burk para a inibição da hidrólise de pNPβG por celobiose	96
FIGURA 18. Representação dos valores de K_m/V_{max} para o substrato pNPβG <i>versus</i> concentração de glicose	97
FIGURA 19. Representação dos valores de K_m/V_{max} para o substrato pNPβG <i>versus</i> concentração de celobiose	98

LISTA DE ABREVIATURAS

4-MUG: 4-metilumbeliferil- β -D-glicosídeo
BGL: β -glicosidase
CMC: carboximetilcelulose
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
Glc: glicose
kDa: quilodalton
oNP: *orto*-nitrofenol
PAGE: eletroforese (não-desnaturante) em gel de poliacrilamida
pNP: *para*-nitrofenol
pNP β G: pNP- β -D-glicopiranosídeo
pNP α G: pNP- α -D-glicopiranosídeo
pNP β Xyl: pNP- β -D-xilopiranosídeo
pNP α Xyl: pNP- α -D-xilopiranosídeo
pNP β Fuc: pNP- β -D-fucopiranosídeo
pNP α Fuc: pNP- α -D-fucopiranosídeo
oNP β Gal: oNP- β -D-galactopiranosídeo
pNP α Gal: pNP- α -D-galactopiranosídeo
pNP β Man: pNP- β -D-manopiranosídeo
pNP α Man: pNP- α -D-manopiranosídeo
pNPNA β G: pNP-N-acetil- β -D-glicosaminídeo
pNPNA β Gal: pNP-N-acetil- β -D-galactosaminídeo
pNPNA α Gal: pNP-N-acetil- α -D-galactosaminídeo
pNP β AG: pNP- β -glicuronídeo
pNP β AGal: pNP- β -galacturonídeo
pNP β Lac: pNP- β -D-lactopiranosídeo
pNP β Cb: pNP- β -D-celobiosídeo
pNP β Ct: pNP- β -D-celotriosídeo
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TCA: ácido tricloroacético
Tris: hidroximetilaminometano
UV: ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Enzimas de origem microbiana são utilizadas em inúmeros processos nas mais diversas áreas tecnológicas. A utilização da diversidade e capacidade metabólica de microrganismos, resultante de sua diversidade genética, coloca-se como um enorme potencial a ser explorado, ampliado pelo advento da engenharia genética.

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolases; E.C. 3.2.1.21) formam uma classe de enzimas biologicamente importantes que ocorrem em inúmeros organismos, tanto procarióticos quanto eucarióticos, desempenhando diversas funções. Em condições fisiológicas, tais enzimas geralmente catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas. Sob certas condições, entretanto, estas enzimas podem catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas.

As β -glicosidases microbianas têm recebido grande atenção devido à sua importância biotecnológica. Possíveis aplicações na liberação de compostos ricos em aroma em sucos e vinhos, liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de resíduos vegetais, síntese de oligossacarídeos e glicoconjugados, entre outras, vêm despertando crescente interesse.

Entre as possibilidades de aplicação das β -glicosidases, a principal talvez seja sua utilização em processos de hidrólise enzimática de celulose.

Neste sentido, a biomassa lignocelulósica surge como matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo para este processo de conversão, que tem por objetivo a produção de açúcares fermentáveis, visando a posterior produção de combustíveis, alimentos e compostos químicos.

Esta biomassa lignocelulósica, representada, por exemplo, por resíduos agroindustriais, pode também ser utilizada como substrato para a produção de enzimas microbianas (celulases, hemicelulases, ligninases, entre outras) em larga escala, contribuindo para a diminuição do custo de produção destas enzimas e, por conseguinte, diminuindo os custos finais dos processos nos quais tais enzimas são empregadas.

Os fungos filamentosos, neste sentido, desempenham papel fundamental na reciclagem da matéria orgânica na biosfera através da utilização destes materiais como substratos para seu desenvolvimento. Estes microrganismos são amplamente utilizados industrialmente na produção de antibióticos, pigmentos, enzimas, entre outros metabólitos. Especificamente, ascomicetos do gênero *Monascus* são microrganismos considerados seguros, sendo utilizados há séculos em países orientais na produção de pigmentos para uso culinário. Pesquisas envolvendo representantes deste gênero enfatizam, principalmente, a otimização da produção de pigmentos, visando sua utilização na indústria de alimentos em substituição a pigmentos sintéticos.

Este estudo tem como objetivos a purificação parcial e a caracterização de uma β -glicosidase extracelular produzida por *Monascus purpureus* NRRL1992 em cultivo submerso utilizando resíduos agroindustriais como substratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -glicosidases (BGLs)

Devido à ampla variedade de ligações glicosídicas que ocorrem naturalmente, existe uma vasta diversidade de enzimas, denominadas glicosidases, cuja função é a clivagem destas ligações. Esta diversidade é, presumivelmente, conseqüência da natureza diversa de seus substratos, e também das diferentes soluções evolucionárias para o problema da construção de sítios ativos capazes de hidrolisar ligações glicosídicas (WITHERS, 2001).

Especificamente, as BGLs formam um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas (BHATIA et al., 2002). Tais enzimas são encontradas em diversos organismos, como bactérias (KATAYEVA et al., 1992; PAAVILAINEN et al., 1993; SESTELO et al., 2004), fungos (RICCIO et al., 1999; JÄGER et al., 2001; YUN et al., 2001; BELANCIC et al., 2003), plantas (SUE et al., 2000; CAMERON et al., 2001; GERARDI et al., 2001) e animais (MARANA et al., 1995; HAYS et al., 1998; PONTOH & LOW, 2002), incluindo o homem (GRACE et al., 1994; DAY et al., 1998; NEMETH et al., 2003).

A principal reação catalisada por estas enzimas é a hidrólise de ligações β -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular. Desta forma, o nome β -glicosidase é dado a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e

glicosídeos conjugados (COULON et al., 1998; SANZ-APARICIO et al., 1998; BHATIA et al., 2002), sendo que a afinidade por um substrato específico depende da origem, e também da função fisiológica e da localização da enzima (WOODWARD & WISEMAN, 1982). Entretanto, sob certas condições, como baixa atividade de água, alta concentração de substrato, ou a presença de nucleófilos diferentes da água, as β -glicosidases podem catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas entre diferentes moléculas (BHATIA et al., 2002).

As funções desempenhadas *in vivo* pelas β -glicosidases são diversas, podendo ser destacadas a hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose em bactérias e fungos (BHATIA et al., 2002; FAURE, 2002; ARO et al., 2005). Em plantas, β -glicosidases podem atuar na hidrólise de precursores de hormônios (BRZOBOHATY et al., 1993; COENEN & LOMAX, 1997; LEXA et al., 2003; SARRY & GÜNATA, 2004), na degradação de componentes da parede celular em processos de amadurecimento de frutos (GERARDI et al., 2001; FAURE, 2002), germinação de sementes e desenvolvimento de embriões (LEAH et al., 1995; AKIYAMA et al., 1998; OPASSIRI et al., 2003), na emissão de aromas (fragrâncias) em flores (REUVENI et al., 1999; HAYASHI et al., 2004), e participar no controle de movimentos foliares (UEDA et al., 1999; KATO et al., 2005). β -glicosidases estão envolvidas também em interações patógeno-planta (DORI et al., 1995; STAPLES & MAYER, 1995; ASHBY, 2000; HAERTER & VOEGELE, 2004) e herbívoro-planta (VETTER, 2000; VAN POECKE et al., 2001; GLEADOW & WOODROW, 2002; ZAGROBELNY et al., 2004), além de exercerem outras funções (WOODWARD & WISEMAN, 1982; BHATIA et al., 2002). Em

humanos, β -glicosidases realizam a hidrólise de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) e de outros glicosídeos conjugados (GRABOWSKI et al., 1996; DAY et al., 1998; ZHAO & GRABOWSKI, 2002; NEMETH et al., 2003; GERMAIN, 2004).

As BGLs são geralmente classificadas por métodos baseados (1) na especificidade em relação ao substrato, ou (2) na similaridade entre suas seqüências de aminoácidos e conformação. O último método é o mais aceito atualmente, uma vez que pode refletir características estruturais, relações evolucionárias e o mecanismo catalítico destas enzimas (BHATIA et al., 2002).

Em alguns microrganismos, diferentes BGLs são codificadas por genes distintos. Entretanto, formas múltiplas de uma enzima podem também originar-se através de degradação proteolítica de uma enzima única, ou através de diferentes graus de modificações pós-traducionais, como glicosilação (MCHALE & COUGHLAN, 1981b; LO et al., 1990; LI & CALZA, 1991; CHEN et al., 1992; GUEGUEN et al., 1995a; IWASHITA et al., 1998, 1999; DE-PAULA et al., 1999; WALLECHA & MISHRA, 2003; YAZDI et al., 2003). Fungos, por exemplo, são conhecidos por secretar diversas formas de uma mesma enzima, dependendo da linhagem e de condições ambientais (RIOU et al., 1998). Neste aspecto, a diversidade das BGLs pode ser utilizada como uma ferramenta para traçar um determinado evento evolucionário, ou para prognosticar a possível localização de sítios ativos (LI & LEE, 1999). Por outro lado, a proteólise pode dificultar a identificação dos verdadeiros componentes de um sistema enzimático produzido, por exemplo, para a degradação de determinado polissacarídeo (WARREN, 1996).

2.1.1 Aplicações biotecnológicas

Enzimas são comumente utilizadas em diversas aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas vem crescendo rapidamente, com vários produtores comerciais disponibilizando preparações enzimáticas feitas “sob medida”, adequadas à biotecnologia (BHAT, 2000). Os principais impedimentos para a exploração comercial de enzimas são seu baixo rendimento, baixa estabilidade, baixa especificidade e alto custo de produção. Desta forma, novas enzimas comercialmente importantes, com desejáveis características bioquímicas, físicas e químicas, e com baixo custo de produção devem ser focos de pesquisa (BHAT & BHAT, 1997; IEMBO et al., 2002).

Microrganismos são muito atrativos como fontes potenciais de enzimas, pois sua concentração celular pode ser potencialmente induzida ou aumentada através de diversas modificações no ambiente ou manipulações genéticas (BUSTO et al., 1995).

Particularmente, a aplicação de BGLs requer a produção destas enzimas em larga escala, bem como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de reação (BHATIA et al., 2002). Neste sentido, a clonagem molecular de genes codificantes para BGLs tem sido estudada (HASHIMOTO et al., 1998; SPIRIDONOV & WILSON, 2001; BHATIA et al., 2002; JANG & CHEN, 2003; MURRAY et al., 2004; LI et al., 2005), não representando apenas uma poderosa ferramenta para a produção de proteínas em grande escala, mas também oferecendo a possibilidade da aplicação de métodos de engenharia de proteínas na análise da atividade enzimática e no melhoramento

de suas funções (LI & LEE, 1999). Técnicas de mutagênese, visando o incremento da produção de β -glicosidases, bem como a obtenção de enzimas com características desejáveis, também vêm sendo exploradas (JANBON et al., 1994; KANG et al., 1999; RAJOKA, 2005; SOLOV'EVA et al., 2005).

Além disso, diversos estudos vêm sendo realizados visando a utilização de BGLs imobilizadas em vários suportes, com diversos propósitos, uma vez que este processo oferece vantagens em relação ao uso de enzimas não imobilizadas, como reutilização das enzimas, possibilidade de operação contínua, controle da formação do produto, processamento simples, entre outras (MARTINO et al., 1996; GUEGUEN et al., 1996; 1997a; ABDEL-FATAH et al., 1997; GALLIFUOCO et al., 1998, 1999; GARGOURI et al., 2004; SHEN & XIA, 2004; NAGAMOTO et al., 2005).

2.1.1.1 Hidrólise enzimática de celulose

O interesse inicial no estudo das BGLs surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZANOELO et al., 2004). Estima-se que aproximadamente $4 \cdot 10^9$ toneladas de celulose sejam formadas anualmente (ARO et al., 2005). A celulose, principal componente de paredes celulares vegetais, é a biomassa mais abundante no planeta, representando uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de combustíveis, alimentos, entre outros produtos. Neste sentido, materiais lignocelulósicos naturais têm sido considerados promissores devido à sua abundância, baixo custo e enorme disponibilidade potencial (RYU &

MANDELS, 1980; SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002; ARO et al., 2005).

A hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis é um processo que envolve a ação de um complexo multienzimático denominado celulase. Microrganismos produtores de celulases são encontrados em diversos grupos taxonômicos, em sua maioria eubactérias e fungos, desempenhando papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono através da reciclagem da celulose (BÉGUIN & AUBERT, 1994). Em fungos, a capacidade de utilizar celulose está distribuída por todo o reino (LYND et al., 2002).

Em microrganismos celulolíticos, postula-se que a hidrólise de celulose necessite de três classes de enzimas: endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases. As endoglicanases atacam, de forma randômica, ligações glicosídicas em regiões internas da molécula de celulose, gerando oligossacarídeos de diversos comprimentos. As exoglicanases (celobiohidrolases) atuam nas extremidades dos oligossacarídeos produzidos pela ação das endoglicanases, formando principalmente moléculas de celobiose, que por sua vez são clivadas por BGLs, liberando glicose (BÉGUIN & AUBERT, 1994; BHAT & BHAT, 1997; NG, 2004). A atividade das enzimas do complexo celulases é geralmente sinérgica, ou seja, a atividade combinada das enzimas é maior do que a soma da atividade individual de cada componente (ORTEGA et al., 2001; GALBE & ZACCHI, 2002; LYND et al., 2002).

A atividade de endoglicanases e exoglicanases é geralmente inibida por celobiose. As BGLs, neste sentido, não só produzem glicose a partir de celobiose, mas também reduzem o efeito inibitório da celobiose, permitindo a maior eficiência tanto das endo quanto das exoglicanases (BÉGUIN & AUBERT, 1994; LEE et al., 1996; SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; LAU & WONG, 2001; SUN & CHENG, 2002). A hidrólise eficiente da celobiose em glicose é, desta forma, crítica para a completa digestão da celulose (BUSTO et al., 1997), e as BGLs têm importante função no mecanismo de regulação da degradação enzimática da celulose (BERGHEM & PETTERSSON, 1974), podendo ser consideradas como limitantes para a celulólise microbiana (BUSTO et al., 1995).

Apenas poucos microrganismos produzem o conjunto completo de enzimas necessárias para degradar eficientemente a celulose nativa, contrastando com o maior número de espécies capazes de produzir sistemas celulase incompletos (BÉGUIN & AUBERT, 1994; SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996). A presença de várias BGLs parece ser comum tanto entre microrganismos celulolíticos (GUEGUEN et al., 1995a) quanto entre espécies de microrganismos incapazes de degradar celulose (GONZÁLEZ-CANDELAS et al., 1989). Contudo, diversos fungos celulolíticos (como linhagens de *Trichoderma reesei*, por exemplo) produzem celulases deficientes em BGLs. Caso celulases comerciais com esta deficiência sejam utilizadas em reatores de hidrólise, possivelmente ocorra o acúmulo de celobiose e celooligossacarídeos, com a conseqüente diminuição da eficiência do processo. Neste sentido, a adição (ou suplementação) de BGLs pode atuar

aumentando a taxa de conversão de celulose em glicose (WOODWARD & WISEMAN, 1982; DUFF & MURRAY, 1996; KANG et al., 1999; ORTEGA et al., 2001; TENGBORG et al., 2001; IRWIN et al., 2003; SHEN & XIA, 2004).

No entanto, a glicose geralmente atua como inibidora da atividade de BGLs, problema que necessita ser superado caso a hidrólise enzimática de celulose venha a ser realizada comercialmente (WOODWARD & WISEMAN, 1982). Isto vem aumentando a procura por BGLs insensíveis à inibição pelo produto (glicose) e de alta estabilidade térmica (ZANOELO et al., 2004). Entre as alternativas para superar a inibição provocada pela glicose destaca-se também a conversão da glicose em frutose, utilizando a enzima glicose isomerase (WOODWARD & WISEMAN, 1982); remoção dos açúcares através de ultrafiltração; fermentação dos açúcares a etanol através de processo denominado sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); entre outras (SUN & CHENG, 2002).

Para a conversão enzimática de biomassa (ligno)celulósica em açúcares fermentáveis em escala comercial são necessários, portanto, todos os componentes celulolíticos em níveis e condições ótimos, sendo essencial que enzimas altamente efetivas estejam disponíveis a baixos custos (MCHALE & COUGHLAN, 1981a; SADDLER, 1982; BUSTO et al., 1995; BHAT & BHAT, 1997; ORTEGA et al., 2001). Entretanto, além da inibição pelo produto final, o alto custo de produção do complexo celulase, o baixo rendimento, a baixa estabilidade e a baixa especificidade impedem a exploração do potencial comercial das celulases para este fim (RYU & MANDELS, 1980; DUFF & MURRAY, 1996; BHAT & BHAT, 1997; YANG et al., 2001; KANG et al., 2004).

Desta forma, a utilização bem sucedida de materiais lignocelulósicos como fontes renováveis de carbonos depende do desenvolvimento de tecnologias economicamente praticáveis para a produção de celulases, da hidrólise microbiana e/ou enzimática de materiais celulósicos em produtos de baixo peso molecular (como hexoses e pentoses), e da conversão química e/ou biológica dos produtos da hidrólise em outros produtos úteis que possam ser empregados como combustíveis líquidos, materiais alimentícios e outros produtos (RYU & MANDELS, 1980). A redução do custo de produção de celulases é, particularmente, um ponto crucial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (SUN & CHENG, 2002).

Embora a celulose possa também ser hidrolisada por ácidos, o processo enzimático deverá ser preferível à longo prazo, uma vez que apresenta diversas vantagens, como maior rendimento em glicose pura, menor impacto ambiental e condições moderadas de reação. As tecnologias químicas, mais comumente aplicadas, são caras e originam resíduos adicionais (RYU & MANDELS, 1980; DUFF & MURRAY, 1996; SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; WEN et al., 2004).

2.1.1.2 Otimização de aromas em sucos e vinhos

Com o objetivo de aumentar o caráter aromático de vinhos, glicosidases microbianas vêm sendo amplamente estudadas, tanto em microrganismos relacionados quanto não relacionados ao vinho e aos processos de vinificação (MATTHEWS et al., 2004).

As BGLs, particularmente, vêm despertando interesse quanto ao seu potencial em liberar compostos ricos em aroma em sucos e vinhos (GUEGUEN et al., 1996; MARTINO et al., 2000; MATEO & JIMÉNEZ, 2000; BELANCIC et al., 2003; SARRY & GÜNATA, 2004; MAICAS & MATEO, 2005), uma vez que além das formas voláteis, uvas e várias outras frutas e vegetais contêm diferentes precursores (não-voláteis) de aroma (WILLIAMS et al., 1982a; GÜNATA et al., 1985; KRAMMER et al., 1991; WU et al., 1991; PÉREZ et al., 1997). Os terpenos estão entre os principais compostos que contribuem para o aroma de vinhos, além de compostos norisoprenóides, compostos derivados do benzeno, e álcoois alifáticos (CABAROGLU et al., 2003; HERNÁNDEZ et al., 2003; SARRY & GÜNATA, 2004). Na forma não-volátil, o terpeno encontra-se ligado geralmente a um dissacarídeo (WILLIAMS et al., 1982a; GÜNATA et al., 1985), não contribuindo para o aroma, a não ser que seja liberado (FERREIRA et al., 2001; LIU, 2002; MAICAS & MATEO, 2005).

Embora a liberação dos terpenos a partir de seus precursores não-voláteis possa ser realizada tanto por enzimas quanto por ácidos (WILLIAMS et al., 1982b; GÜNATA et al., 1990; CABAROGLU et al., 2003), a hidrólise enzimática é considerada um método mais apropriado por não modificar o padrão de distribuição natural do aroma (MATEO & JIMÉNEZ, 2000; BELANCIC et al., 2003; MAICAS & MATEO, 2005).

Pelo mecanismo enzimático de liberação, primeiramente a ligação que mantém o dissacarídeo é clivada por uma enzima específica e, em um segundo estágio, a ligação β -glicosídica entre o terpeno e a molécula de glicose é hidrolisada por BGLs (GÜNATA et al., 1988). Glicose também é

formada neste processo, não apresentando efeito no aroma uma vez que as quantidades formadas pela hidrólise (tipicamente mg/kg) estão abaixo do limiar de gustação (tipicamente g/kg) (HEMINGWAY et al., 1999). Alternativamente, endo- β -glicosidases podem clivar a ligação entre a aglicona e o resíduo de glicose, liberando diretamente a aglicona e o dissacarídeo (SHOSEYOV et al., 1990).

A fração de terpenos não-voláteis em uvas é geralmente maior do que a fração volátil (GÜNATA et al., 1985), permanecendo relativamente estável durante o processo de vinificação e também em vinhos jovens (MATEO & JIMÉNEZ, 2000; MAICAS & MATEO, 2005). Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade demonstrada por BGLs endógenas sob condições de vinificação (LECAS et al., 1991; BARBAGALLO et al., 2004a), e também à baixa (ou mesmo nula) atividade β -glicolítica de importantes leveduras envolvidas no processo de vinificação, principalmente *Saccharomyces* sp. (MCMAHON et al., 1999; FERREIRA et al., 2001; MATTHEWS et al., 2004).

Neste sentido, torna-se atrativa a possível utilização de BGLs exógenas na otimização do aroma de sucos e vinhos (DEQUIN, 2001; CABAROGLU et al., 2003; BARBAGALLO et al., 2004a; SARRY & GÜNATA, 2004), bem como a triagem de espécies de leveduras e/ou bactérias lácticas que exibam atividades enzimáticas convenientes durante o processo de vinificação (MCMAHON et al., 1999; UGLIANO et al., 2003; GRIMALDI et al., 2005), e mesmo a utilização de microrganismos modificados por técnicas de clonagem molecular (GÜNATA et al., 1996).

Além disso, com o amadurecimento (envelhecimento) do vinho os precursores aromáticos passam por um processo de lenta hidrólise química onde diversos produtos aromáticos (como linalol, nerol e geraniol) são convertidos em produtos menos aromáticos (α -terpineol, dióis, óxidos, entre outros). A adição de glicosidases ao mosto, ou vinho, permite a otimização do aroma sem esta desvantagem (MARTINO et al., 2000). Nas vinícolas, BGLs são geralmente adicionadas ao vinho durante os processos de maturação (MANZANARES et al., 2000).

Entretanto, para que enzimas possam ser utilizadas na liberação de aromas sob as condições restritivas que o vinho oferece, estas devem satisfazer alguns pré-requisitos como especificidade, pH ótimo, e tolerância a glicose e etanol (GÜNATA et al., 1990; RIOU et al., 1998; MATTHEWS et al., 2004).

2.1.1.3 Liberação de compostos fenólicos

BGLs vêm sendo estudadas quanto à possibilidade de liberar compostos fenólicos a partir de suas formas glicosiladas em resíduos do processamento de vegetais (ZHENG & SHETTY, 2000; VATTEM & SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004a, 2004b). Tais compostos ocorrem amplamente em frutas e outros vegetais, podendo ser utilizados como antioxidantes, nutracêuticos e agentes flavorizantes (ZHENG & SHETTY, 2000; HEIM et al., 2002; TAPIERO et al., 2002; VATTEM & SHETTY, 2003; ERLUND, 2004).

Espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (HEIM et al., 2002). Neste contexto, a atividade

antioxidante de compostos fenólicos tem recebido interesse especial de pesquisas, uma vez que os compostos oxidativos podem atuar na progressão de diversas doenças, incluindo câncer e arterosclerose (HEIM et al., 2002; TAPIERO et al., 2002; CORREIA et al., 2004b). Acredita-se que a efetividade de compostos fenólicos na proteção contra o estresse oxidativo depende da sua reatividade com espécies reativas de oxigênio, além da possibilidade de estes compostos atuarem quelando metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídios (MEYER et al., 1998; HEIM et al., 2002; CORREIA et al., 2004a; RANDHIR et al., 2004). A conjugação, ou seja, a glicosilação destes compostos fenólicos apresenta influência em suas propriedades químicas, físicas e biológicas (TAPIERO et al., 2002), geralmente reduzindo a habilidade de atuarem como bons antioxidantes, uma vez que a disponibilidade de grupos hidroxil livres nos anéis fenólicos é potencialmente importante para a estabilização da ressonância dos radicais livres (VATTEM & SHETTY, 2003). Logo, se compostos fenólicos livres forem obtidos a partir de suas formas glicosiladas, então a funcionalidade antioxidante – e com isso a funcionalidade na saúde humana – destes fitoquímicos pode ser melhorada (VATTEM & SHETTY, 2003; HEIM et al., 2002).

Os flavonóides, especificamente, são uma ampla classe de compostos polifenólicos derivados do metabolismo secundário de vegetais, reconhecidos por sua atividade antioxidante e quelante. Assim como outros compostos fenólicos presentes na dieta, os flavonóides existem quase que exclusivamente na forma de β -glicosídeos, sendo que as agliconas são geralmente consideradas antioxidantes mais potentes do que os

correspondentes glicosídeos (DAY et al., 1998; LAMBERT et al., 1999; HEIM et al., 2002; TAPIERO et al., 2002; NEMETH et al., 2003; ERLUND, 2004). Acredita-se que a deglicosilação destes compostos naturais através de BGLs citosólicas em humanos – e em outros mamíferos (LAMBERT et al., 1999) – representa uma etapa fundamental para a sua absorção, metabolismo, atividade biológica e excreção, independentemente da microbiota do cólon (DAY et al., 1998; NEMETH et al., 2003; WALLE, 2004).

Como variações significativas na atividade de BGLs entre indivíduos podem ser determinantes para a biodisponibilidade destes flavonóides (NEMETH et al., 2003), BGLs microbianas podem atuar como úteis ferramentas na alteração da forma e propriedades destes compostos, de forma a afetar positivamente sua biodisponibilidade e/ou sua atividade biológica em humanos (HEIM et al., 2002; MAMMA et al., 2004; YANG et al., 2004a). Bactérias lácticas produtoras de BGLs podem, por exemplo, ser utilizadas como culturas iniciadoras no enriquecimento de isoflavonas bioativas na fermentação de leite de soja (PYO et al., 2005; CHIEN et al., 2006).

2.1.1.4 Outras aplicações biotecnológicas

As BGLs podem hidrolisar antocianinas, importantes agentes de cor encontrados em alimentos de origem vegetal (SPAGNA et al., 2000). Em uvas tintas e em mostos e vinhos derivados destas uvas, as antocianinas são os principais pigmentos (SÁNCHEZ-TORRES et al., 1998; LIU, 2002). Logo, a atividade de BGLs (antocianases) pode afetar adversamente estes vinhos, provocando perda da coloração (MANZANARES et al., 2000; LIU, 2002;

BARBAGALLO et al., 2004b). Em indústrias de sucos de frutas, particularmente, BGLs são utilizadas em processos de maceração ou liquefação, participando da celulólise e da liberação de aromas através da hidrólise de precursores glicosilados. Entretanto, a presença destas enzimas em preparações enzimáticas fúngicas pode induzir a perda da cor de sucos de frutas vermelhas quando da hidrólise de antocianidinas glicosiladas (antocianidina-3- β -D-glicosídeo) em antocianidinas instáveis (LE TRAON-MASSON & PELLERIN, 1998). Assim, um dos desafios no melhoramento de preparações enzimáticas utilizadas no processamento de frutas vermelhas, particularmente para produção de vinhos tintos e sucos, é a obtenção de preparações enzimáticas contendo BGLs ativas sobre substratos-alvo, como celobiose e terpenil- β -D-glicosídeos, mas com baixo efeito descorante (LE TRAON-MASSON & PELLERIN, 1998; MANZANARES et al., 2000).

Por outro lado, antocianases podem ser utilizadas na produção de vinhos brancos com reduzida coloração vermelha, ou na produção de vinhos rosados a partir de variedades de uvas tintas, onde o processo de maceração pode ser prolongado, e o excesso de cor removido através de tratamento enzimático. Além disso, antocianases podem ser empregadas em processos de vinificação visando prevenir a sedimentação durante a estocagem em garrafas (SÁNCHEZ-TORRES et al., 1998).

BGLs podem ser também utilizadas na diminuição do amargor de sucos cítricos através da hidrólise de prunina (RIOU et al., 1998). Por outro lado, a presença de BGLs em sementes de limões pode afetar negativamente a indústria. O esmagamento das sementes durante o processamento para a

produção de sucos pode aumentar a atividade desta enzima no suco, liberando limonina a partir de sua forma glicosilada, contribuindo para o aumento do amargor no suco (RONNEBERG et al., 1995).

As BGLs podem ser empregadas na hidrólise de compostos tóxicos (cianogênicos) presentes em vegetais utilizados em alimentação humana e animal, como na mandioca (GUEGUEN et al., 1997b; BRIMER et al., 1998; LEI et al., 1999; PETRUCCIOLI et al., 1999a, 1999b; OKAFOR, 2005); na obtenção de goma gelana de baixa viscosidade, para uso na indústria alimentícia (HASHIMOTO et al., 1998); na extração de vanilina a partir de glicovanilina em vagens de baunilha, substituindo processos microbianos tradicionais (RANADIVE, 1992; RUIZ-TERÁN et al., 2001); além de diversas outras aplicações biotecnológicas (BHATIA et al., 2002).

A propriedade de sintetizar ligações β -glicosídicas permite que estas enzimas sejam também empregadas na síntese de vários compostos, como oligossacarídeos e glicoconjugados (GUEGUEN et al., 1995b; PANINTRARUX et al., 1996; PRADE et al., 1998; YAN & LIAU, 1998; KOBAYASHI et al., 2000; WYMER & TOONE, 2000; GARGOURI et al., 2004). Recentemente, os oligossacarídeos estabeleceram sua condição de componentes funcionais no aperfeiçoamento do valor de alimentos. Os galactooligossacarídeos, por exemplo, são utilizados por grupos benéficos de bactérias, como as bifidobactérias. Tais oligossacarídeos são adicionados a alimentos nutritivos (iogurte, entre outros) como ingredientes funcionais para o melhoramento da microbiota intestinal (AKIYAMA et al., 2001). Os soforooligossacarídeos e gentiooligossacarídeos, por sua vez, são úteis em alimentos de baixa caloria e

também em produtos farmacêuticos (BHATIA et al., 2005). Quanto à síntese de glicoconjugados, os alquil- β -D-glicosídeos, grupo de surfactantes não-iônicos, podem ser utilizados na produção de cosméticos, produtos farmacêuticos e detergentes de cozinha, entre outros (PANINTRARUX et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2000; WALLECHA & MISHRA, 2003). A síntese enzimática destas moléculas é atraente, uma vez que a síntese tradicional, utilizando rotas químicas, é geralmente lenta e inespecífica, resultando na formação de produtos secundários indesejáveis (BHATIA et al., 2002; WALLECHA & MISHRA, 2003; PERUGINO et al., 2004).

2.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, vegetais, grãos, animais, e usualmente crescem na superfície destes materiais ou seres (IWASHITA, 2002). Estes microrganismos apresentam morfologia complexa, exibindo diferentes formas estruturais durante seus ciclos de vida. A estrutura vegetativa básica de crescimento consiste em um filamento tubular denominado hifa, originado da germinação de um esporo reprodutivo. Com o crescimento da hifa, esta se ramifica repetidamente, formando uma massa de hifas denominada micélio. Quando em cultivo submerso, estes fungos exibem diferentes formas morfológicas, variando de filamentos miceliais dispersos até massas miceliais densamente entrelaçadas (PAPAGIANNI, 2004).

A utilização microbiana da celulose é responsável por um dos maiores fluxos de matéria na biosfera (LYND et al., 2002). Os fungos

filamentosos exercem papel fundamental na degradação dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza (como a celulose) e são, portanto, essenciais para a manutenção do ciclo do carbono. A capacidade de fungos filamentosos em degradar eficientemente polímeros vegetais fornece tópicos interessantes para estudos relativos, por exemplo, à ecologia microbiana e aos mecanismos básicos de regulação nutricional, bem como estabelece diversas possibilidades de aplicações industriais (ARO et al., 2005).

Além do papel significativo desempenhado pelos fungos filamentosos na reciclagem de compostos orgânicos, estes microrganismos apresentam outras propriedades importantes, participando da produção de alimentos e produtos relacionados à saúde humana (HAJJAJ et al., 2000). A utilização de fungos na produção de produtos comerciais é antiga, e a produção de bebidas alcoólicas, biomassa e a manufatura de compostos terapêuticos, juntamente com a produção de compostos orgânicos simples, ainda continuam sendo os principais campos nos quais os fungos são utilizados (PAPAGIANNI, 2004).

Entretanto, vem crescendo o número de produtos comercialmente importantes produzidos por fungos. Diversos fungos filamentosos são utilizados como eficientes produtores de inúmeras enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e outros metabólitos comercialmente importantes. Estes microrganismos têm sido amplamente explorados na produção de proteínas homólogas e, mais recentemente, proteínas heterólogas, devido à alta capacidade de seus mecanismos de secreção de proteínas (SUTO & TOMITA, 2001; IWASHITA, 2002; NG et al., 2004; PAPAGIANNI, 2004).

Na produção industrial de enzimas, cultivos submersos são normalmente utilizados, devido à facilidade de manejo e controle do processo (IWASHITA, 2002). Contudo, o acúmulo de produtos finais inibe o crescimento celular e a formação do produto desejado na maioria destes processos (SRINIVASAN et al., 2001).

2.2.1 Gênero *Monascus*

O gênero *Monascus* pertence ao grupo dos Ascomicetos, particularmente à família Monascaceae, possuindo três espécies: *M. pilosus*, *M. purpureus* and *M. ruber* (SABATER-VILAR et al., 1999; DUFOSSÉ et al., 2005). Espécies de *Monascus* produzem pigmentos, agentes antimicrobianos, álcoois, ácidos orgânicos, compostos com atividade terapêutica e enzimas como proteases e glicoamilases (LI et al., 1998; ANIYA et al., 1999; TSENG et al., 2000; YONGSMITH et al., 2000; WANG et al., 2002a, 2002b; LIU et al., 2004; YANG et al., 2004b; DUFOSSÉ et al., 2005; LIANG et al., 2006).

Contudo, o principal foco de pesquisas envolvendo isolados pertencentes ao gênero *Monascus* é a produção de pigmentos. Estes pigmentos, produzidos como metabólitos secundários, são utilizados há séculos como corantes em alimentos e pratos típicos de diversos países orientais (PASTRANA et al., 1995; JŮZLOVÁ et al., 1996; TSENG et al., 2000; DUFOSSÉ et al., 2005; WANG et al., 2005). Nas últimas décadas vem crescendo o interesse por novos pigmentos naturais, visando sua utilização na indústria alimentícia em substituição aos corantes sintéticos e, neste contexto,

enquadram-se os pigmentos produzidos por espécies de *Monascus* (SABATER-VILAR et al., 1999; DULIU et al., 2000). Além de pigmentos vermelhos (monascorubramina e rubropunctamina), *Monascus* podem produzir pigmentos amarelos (monascina e ankaflavina) e de cor laranja (monascorubrina e rubropunctatina) (WONG & KOEHLER, 1983; HAJJAJ et al., 2000; DUFOSSÉ et al., 2005). Recentemente, duas novas estruturas de pigmentos foram caracterizadas (CAMPOY et al., 2006). Tais pigmentos, recentemente, vêm sendo empregados como corantes em produtos alimentícios (FABRE et al., 1993; TSENG et al., 2000; JUNG et al., 2003; DUFOSSÉ et al., 2005).

Fungos do gênero *Monascus* são geralmente selecionados para pesquisas por serem considerados microrganismos seguros e amplamente utilizados em alimentos tradicionais (WANG et al., 2002a, 2002b). Entretanto, o antibiótico denominado monascidina A, produzido por espécies de *Monascus*, foi caracterizado como citrinina, uma conhecida micotoxina hepatonefrotóxica, que pode exercer efeitos mutagênicos após ativação metabólica (BLANC et al., 1995; SABATER-VILAR et al., 1999; XU et al., 2006). Entretanto, embora extratos de *Monascus* venham sendo utilizados como corantes alimentares por séculos, efeitos médicos adversos não foram relatados, o que pode ser atribuído às baixas concentrações aplicadas na tecnologia alimentar e/ou à baixa toxicidade da maioria das espécies de *Monascus* (SABATER-VILAR et al., 1999; WANG et al., 2005).

2.3 Resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas

Estima-se que a produção global de material lignocelulósico atinja valores entre 120 e 150 bilhões de toneladas (em matéria seca) por ano, algo como 30 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo, ou mais de quatro vezes o total anual do consumo mundial de energia (RAJOKA & MALIK, 1997).

A lignocelulose é um polímero complexo, consistindo de feixes fibrosos de celulose cristalina, revestidos por uma matriz polimérica de hemicelulose e lignina. Embora as composições possam variar, este material pode ser geralmente considerado como sendo composto por 50% celulose, 25% hemicelulose, e 25% lignina (INGRAM & DORAN, 1995).

A molécula de celulose é um polímero linear formado por moléculas de glicose (8.000-12.000 unidades) unidas através de ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Na celulose, devido à configuração β (beta) das ligações glicosídicas, todas as ligações hidroxil estão no mesmo plano. Em uma microfibrila de celulose onde as cadeias estão ordenadas forma-se uma estrutura cristalina, fortemente estabilizada por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares. Isto dá à celulose sua insolubilidade, resistência à tração, e resistência à enzimas e agentes químicos. Onde as cadeias estão menos ordenadas, a celulose é amorfa (não cristalina), mais facilmente hidratada e mais acessível a enzimas. A hemicelulose, grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados e amorfos, circunda as fibras de celulose e penetra na celulose através de poros. Xilose, arabinose, manose, glicose, ácido glicurônico e galactose são os principais monômeros componentes. A estrutura da hemicelulose é caracterizada por um

esqueleto principal longo e linear formado por um tipo repetitivo de açúcar, com cadeias laterais curtas e ramificadas, compostas por acetato e açúcares. A lignina, por sua vez, é um polímero fenólico ramificado, complexo e altamente insolúvel, que forma uma espécie de rede que circunda e fortalece a estrutura de celulose-hemicelulose (BÉGUIN & AUBERT, 1994; DUFF & MURRAY, 1996; WARREN, 1996; ARO et al., 2005).

Grandes quantidades de resíduos agroindustriais são geradas a cada ano a partir das mais diversas atividades econômicas (TAN & WAHAB, 1997; HECK et al., 2005), sendo geralmente utilizados como ração animal, fertilizantes ou condicionadores de solo (FERRER et al., 2001; SCHIEBER et al., 2001; YANG et al., 2001). Na realidade, biomassa em excesso e resíduos provenientes de atividades agrícolas e agroindustriais sempre foram amplamente empregados na produção de energia, rações, alimentos, entre outros produtos úteis. Por séculos, madeira e outros resíduos agrícolas vêm sendo utilizados como fonte de alimento, combustíveis, materiais de construção, na manufatura de papel, bem como para outros propósitos (MORAIS et al., 2002).

Estes resíduos lignocelulósicos representam uma valiosa fonte potencial de nutrientes que, com a tecnologia apropriada de conversão, podem ser transformados em uma variedade de produtos úteis. O cultivo de cogumelos representa um exemplo de processo viável (TAN & WAHAB, 1997). Neste sentido, vem aumentando o interesse biotecnológico no aproveitamento destes resíduos visando a obtenção de diversos produtos, como enzimas, combustíveis e compostos químicos (HANG & WOODAMS, 1994; INGRAM &

DORAN, 1995; ROMERO et al., 1999; ZHENG & SHETTY, 2000; KRISHNA et al., 2001; YANG et al., 2001; GALBE & ZACCHI, 2002; MORAIS et al., 2002; ADSUL et al., 2004, 2005; CORREIA et al., 2004a; KANG et al., 2004).

A utilização destes resíduos torna-se especialmente importante, pois estes representam uma das maiores fontes renováveis de energia disponíveis em nosso planeta e, quando indevidamente descartados ou utilizados, podem tornar-se fontes adicionais de poluição, uma vez que geralmente acumulam em áreas agroindustriais, não apresentando significativo valor industrial ou comercial (KRISHNA, 1999; KHALIL, 2002; FRANCIS et al., 2003; CORREIA et al., 2004a). Procedimentos normalmente utilizados no manejo destes resíduos, e que podem gerar problemas, são a disposição e a incineração (combustão): o primeiro pode permitir o desenvolvimento de parasitas prejudiciais para futuros cultivos, e o segundo, além da poluição ambiental, pode dar origem a incêndios indesejáveis e incontroláveis (DI BLASI et al., 1997; YANG et al., 2001; SUN & CHENG, 2002). Logo, a biodegradação e bioconversão de materiais lignocelulósicos presentes em resíduos agroindustriais em produtos úteis, diminuindo a poluição causada por estes materiais, configura-se como um enorme desafio ambiental (PANAGIOTOU et al., 2003; MTUI & NAKAMURA, 2005).

Pesquisas focam a triagem de fontes de carbono de baixo custo para a biossíntese de enzimas do complexo celulase por microrganismos, de forma a substituir os substratos celulósicos altamente purificados normalmente utilizados (SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; BHAT & BHAT, 1997; YANG et al., 2001). Contudo, a utilização de biomassa celulósica é mais complexa do

que a utilização de celulose pura, não apenas devido à composição complexa da primeira (como presença de hemiceluloses e lignina), mas também devido à arquitetura diversa das próprias células vegetais, uma vez que tecidos vegetais diferem enormemente quanto a tamanho e organização (LYND et al., 2002).

Em fungos filamentosos, enzimas extracelulares (celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases) fornecem ao microrganismo recursos para obter energia e nutrientes a partir destes biopolímeros vegetais (ARO et al., 2005). A capacidade de microrganismos em produzir diferentes enzimas celulolíticas e diferentes arranjos enzimáticos, com diferentes modos de ação e especificidade, permite a exploração de substratos heterogêneos. Com isso, há considerável variação no nível de transcrição, bem como no tipo de genes transcritos, dependendo da fonte de carbono utilizada para o crescimento (BÉGUIN & AUBERT, 1994; DUFF & MURRAY, 1996; BHAT & BHAT, 1997).

A transcrição de enzimas do complexo celulase em fungos, por exemplo, é regulada, basicamente, por três estágios: expressão em nível basal; secreção em massa de enzimas, mediada por indução; e repressão catabólica, provocada pelos produtos da hidrólise da celulose, o que impede a expressão de quantidades excessivas de celulase em circunstâncias onde há fontes de carbono abundantes e facilmente assimiláveis (SUTO & TOMITA, 2001). Entretanto, durante a hidrólise de celulose na natureza, estes produtos podem não acumular em níveis altos o suficiente para provocar significativa repressão da atividade enzimática (ARO et al., 2005).

Neste sentido, a produção de enzimas celulolíticas microbianas, incluindo BGLs, é fortemente dependente da natureza do substrato, e a

eficiência na produção destas enzimas depende também de outros fatores relacionados à composição química da matéria-prima, como a acessibilidade e suscetibilidade de vários componentes, bem como suas associações químicas ou físicas. Logo, é importante a escolha do substrato indutor apropriado para a produção destas enzimas. O substrato lignocelulósico ideal deve ser barato, facilmente processável, disponível em grandes quantidades, e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas – bem como para uma possível hidrólise comercial posterior (KANG et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2005).

Particularmente, alta produtividade destas enzimas pode ser potencialmente alcançada através do uso de biomassa lignocelulósica pré-tratada como fonte de carbonos (SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; GUPTA & MADAMWAR, 1997; ROMERO et al., 1999; ADSUL et al., 2004; KANG et al., 2004). O termo pré-tratamento é amplamente utilizado para referir o processo que converte a forma nativa da biomassa lignocelulósica, geralmente recalcitrante às celulasas, em uma forma onde a hidrólise enzimática seja mais efetiva (LYND et al., 2002). Logo, o pré-tratamento visa remover lignina e hemicelulose, reduzindo o caráter cristalino da celulose e aumentando a porosidade deste material (SUN & CHENG, 2002). Adsul et al. (2004) observaram que a remoção de lignina em bagaço de cana originou um material mais acessível ao ataque microbiano, auxiliando na produção de níveis mais altos de enzimas como BGLs e xilanases. Diversas opções de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos estão disponíveis, incluindo processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (SUN & CHENG, 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Neste estudo, o ascomiceto *Monascus purpureus* NRRL1992 foi utilizado. As culturas foram mantidas em placas de ágar Sabouraud a 4 °C. Periodicamente (a cada 45 dias) estas culturas eram inoculadas em novas placas de ágar Sabouraud, incubadas por 12 dias a 30 °C e posteriormente armazenadas a 4 °C.

O ágar Sabouraud foi preparado adicionando-se glicose (40 g/L), peptona (10 g/L) e ágar (12 g/L) em água destilada. Após esterilização (121 °C por 15 min), o meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri estéreis.

3.2 Inóculo

Para o preparo dos inóculos, culturas foram reativadas através da transferência para novas placas de ágar Sabouraud e incubadas a 30 °C por 12-14. Estas culturas foram gentilmente raspadas da superfície do ágar, adicionadas a solução salina (8,5 g/L NaCl) estéril, e homogeneizadas. Estas suspensões conidiais/miceliais, com densidade óptica (620 nm) ajustada para valores próximos a 0,4, foram utilizadas como inóculo.

3.3 Seleção de substratos para produção de BGL

Carboximetilcelulose (CMC) e resíduos agroindustriais, incluindo soro de queijo em pó, cascas de pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*), resíduos de uva da indústria vinícola, e farelo de soja foram testados como substratos (20 g/L) para a produção de BGL extracelular por *M. purpureus* NRRL1992 em combinação com peptona (5g/L) ou NH₄Cl (2,5 g/L) e/ou farelo de soja (5 g/L), em meio mineral. O meio mineral foi composto por K₂HPO₄ (5,0 g/L), KH₂PO₄ (5,0 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,1 g/L), CaCl₂ (0,025 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0,01 g/L) e MnSO₄ (0,01 g/L), em água destilada.

As combinações de substratos são especificadas na Tabela 1. O pH inicial do meio foi ajustado a 6,0 antes da esterilização (121 °C por 15 min).

Frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura foram inoculados com 250 µL (1% v/v) de inóculo (Seção 3.2), e incubados a 30 °C em incubadora com agitação orbital (100 rpm) por 9 dias. Alíquotas (500 µL) dos cultivos foram retiradas, centrifugadas (10.000 x g por 5 min), e o sobrenadante foi utilizado para realização de ensaio enzimático visando estimar a atividade de BGL extracelular.

A combinação de substratos que resultou na produção da mais elevada atividade β-glicolítica foi selecionada, sendo utilizada nos estudos subsequentes. Os resultados foram analisados através do teste *t* de Student.

3.4 Ensaio enzimático

A avaliação da atividade β-glicolítica foi realizada utilizando o substrato cromogênico *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPβG). A reação

(200 μL) consistiu de 90 μL de tampão citrato de sódio (250 mM; pH 4,5), 10 μL de solução pNP β G (4 mg/mL) e 100 μL de amostra contendo a atividade enzimática. Após a incubação desta mistura a 37 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de tampão carbonato de sódio (500 mM; pH 10,0). A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro, através da leitura da absorbância (405 nm) do *p*-nitrofenol ($\epsilon = 18.700$) liberado.

Nas etapas de purificação da enzima, o ensaio enzimático foi realizado sob as mesmas condições, exceto pela diminuição do tempo de incubação de 30 para 10 minutos.

Na caracterização da enzima, o ensaio enzimático foi realizado utilizando as condições ótimas de temperatura e pH para a atividade da BGL, com tempo de incubação de 10 minutos.

Uma unidade (U) de BGL foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 μmol de pNP β G por minuto, sob as respectivas condições acima descritas.

3.5 Influência de substratos na produção de BGL extracelular

Os efeitos de diferentes concentrações dos substratos selecionados para a produção de BGL extracelular por *M. purpureus* em cultivo submerso foram avaliados através de experimento fatorial (2^2) de primeira ordem, com três repetições nos pontos centrais, totalizando 7 combinações de tratamentos (BOX et al., 1978). Três níveis (concentrações) foram propostos para cada variável independente, e a atividade extracelular de BGL foi tomada como a

variável dependente. A Tabela 2 mostra as variáveis independentes e seus níveis (codificados e reais), bem como a resposta (atividade enzimática) obtida. Todos os dados foram analisados com o software STATISTICA 5.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

Os Erlenmeyers, contendo 25 mL de meio de cultura com diferentes concentrações de substratos (Tabela 2), foram inoculados e incubados como apresentado na Seção 3.3.

3.6 Repressão da produção de BGL

A avaliação da possível repressão da produção de enzima foi estudada através do cultivo do fungo em Erlenmeyers de 125 mL contendo glicose (20 g/L) e peptona (5 g/L) em 25 mL de meio mineral. As condições de inóculo e incubação seguiram o apresentado na Seção 3.3. Em intervalos pré-estabelecidos, alíquotas (500 µL) do cultivo foram retiradas, centrifugadas (10.000 x g por 5 min), e o sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático (Seção 3.4) e para a determinação da concentração de açúcares redutores.

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (CHAPLIN, 1986). Neste método, 1 mL de solução DNS foi acrescentada a 100 µL do sobrenadante de cultivo. Após a incubação dos tubos por 10 minutos em banho-maria de água fervente (aproximadamente 100 °C) e o resfriamento dos mesmos, a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm, e os resultados foram interpretados utilizando curva-padrão de glicose.

A solução DNS foi preparada dissolvendo 0,25 g de DNS e 75 g de tartarato de Na/K em solução de NaOH (2 M). Após, a solução resultante foi diluída em água destilada até o volume final de 250 mL.

3.7 Produção de BGL extracelular

A produção de BGL foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura, composto por meio mineral adicionado de resíduo de uva (20 g/L) e peptona (5 g/L). Este meio de cultura foi inoculado com 500 μ L (1% v/v) de inóculo (Seção 3.2) e incubado a 30 °C em estufa com agitação orbital (100 rpm) por 9 dias. Após filtração e centrifugação (10.000 x g por 15 min) do cultivo, o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado como fonte de enzima para as subseqüentes etapas de purificação.

3.8 Purificação parcial da BGL extracelular de *M. purpureus*

3.8.1 Precipitação de proteínas com acetona

A primeira etapa de purificação foi a precipitação de proteínas do extrato bruto com acetona. Nesta etapa, o extrato bruto (25 mL) foi adicionado de acetona gelada (80% v/v; -20 °C), permanecendo por uma hora em banho de gelo com agitação magnética constante. Transcorrido este período, foi realizada centrifugação (10.000 x g por 30 min), e o *pellet* resultante foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,25).

3.8.2 Cromatografia líquida de gel-filtração

A suspensão resultante da etapa anterior foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-100), em volume não superior a 5% do volume de resina da coluna. A coluna (20 x 0,8 cm), com fluxo de 0,37 mL/minuto, foi eluída com tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,25), sendo coletadas 25 frações de 1 mL cada. Para cada fração foram realizados o ensaio enzimático (Seção 3.4) e a estimativa da concentração de proteínas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro (280 nm). As frações com atividade foram reunidas, sendo realizados o ensaio enzimático e a determinação da concentração de proteínas solúveis (Seção 3.9).

3.8.3 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica

Às frações reunidas na cromatografia líquida de gel-filtração foi adicionado sulfato de amônio, em concentração final de 55 mM. Este material foi aplicado em coluna (10,5 x 0,65 cm) de cromatografia líquida de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose), com fluxo de 0,28 mL/minuto, sendo coletadas 20 frações de 1 mL cada. As primeiras cinco (05) frações foram eluídas com tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,25) contendo 55 mM de sulfato de amônio, e as frações seguintes foram eluídas com o mesmo tampão não adicionado de sulfato de amônio. Em cada fração coletada foram realizados o ensaio enzimático e a estimativa da quantidade de proteínas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro (280 nm). As frações com atividade foram unidas, sendo realizados o ensaio enzimático bem como a determinação da concentração de proteínas solúveis.

O material resultante desta última etapa de purificação foi utilizado na caracterização da BGL extracelular produzida por *M. purpureus* NRRL1992.

3.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A determinação da concentração de proteína solúvel nas diferentes etapas de purificação foi realizada através do método de Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

Inicialmente foi preparado o reagente A, que consistiu de 0,5 mL de solução de CuSO_4 (5 g/L), 0,5 mL de solução de tartarato de Na/K (10 g/L) e 49 mL de solução de Na_2CO_3 (20 g/L) preparada em NaOH 0,1 M.

Para os ensaios, realizados em triplicata, 100 μL de amostra foi adicionada a 2,5 mL de reagente A. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e, em seguida foram adicionados 300 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em água destilada). Após incubação em temperatura ambiente por 40 minutos, a absorbância (570 nm) das amostras foi mensurada em espectrofotômetro.

A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

3.10 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

Após a purificação parcial do extrato bruto de *M. purpureus* NRRL1992, o padrão protéico foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Amostras do processo de purificação parcial foram precipitadas através da adição de solução de ácido tricloroacético (TCA; 500 g/L) até a concentração de 10% (v/v). Esta mistura foi mantida sob refrigeração durante aproximadamente 12 horas e, após, foi centrifugada (10.000 x g por 5 min).

O *pellet* resultante foi ressuscitado em acetona e centrifugado (10.000 x g por 5 min). Este processo foi repetido diversas vezes, visando remover possíveis impurezas.

Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 25 µL de tampão de amostra. O tampão de amostra foi preparado com 1 mL de tampão Tris-HCl (500 mM; pH 8,6); 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de solução de SDS (100 g/L); 0,4 mL de β-mercaptoetanol; 0,4 mL de solução de azul de bromofenol (10 g/L); e 3,8 mL de água destilada.

Esta ressuspensão foi incubada a 100 °C por cinco minutos e, a seguir, aplicada em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (125 V e 25 mA), e a observação de bandas foi possível após coloração do gel com nitrato de prata (HEUKESHOVEN & DERNICK, 1985). No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

3.11 Eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida e zimograma

A eletroforese não-desnaturante (PAGE) foi utilizada visando a posterior observação da atividade beta-glicolítica no gel através de zimograma.

Amostras da última etapa de purificação foram misturadas a tampão de amostra (não contendo SDS e β -mercaptoetanol), e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (não contendo SDS). O campo elétrico aplicado para a separação das proteínas foi o mesmo acima utilizado (Seção 3.10).

Dois protocolos de zimogramas foram utilizados para a observação da atividade enzimática nos géis. No primeiro protocolo, baseado em Badhan et al. (2007), o gel foi imerso em tampão citrato-fosfato de sódio (250 mM; pH 5,5) contendo o substrato 4-MUG (10 mM), e incubado por 10 minutos a 37°C. Transcorrido este período, o gel foi observado sob luz UV (365 nm) em busca de banda(s) fluorescente(s), correspondente(s) à atividade enzimática. No segundo protocolo, baseado em Pandey & Mishra (1995), o gel foi imerso em tampão citrato-fosfato de sódio (250 mM; pH 5,5) contendo o substrato pNP β G (5 mM), e incubado por 30 minutos a 37°C. Após este período, solução de Na₂CO₃ (1 M) foi adicionada visando parar a reação e revelar banda(s) de coloração amarela.

3.12 Caracterização da enzima parcialmente purificada

3.12.1 Temperatura e pH ótimos

Para a determinação da temperatura e pH ótimos da enzima parcialmente purificada, foi realizado experimento fatorial (2²) completo, com quatro repetições nos pontos centrais, totalizando 12 combinações de tratamentos (BOX et al., 1978). Cinco níveis foram propostos para cada

variável independente (temperatura e pH), e a atividade β -glicolítica foi tomada como variável dependente.

A Tabela 5 mostra as variáveis independentes e seus níveis (codificados e reais), bem como a resposta (atividade enzimática) obtida. A atividade β -glicolítica nas condições de temperatura e pH de cada tratamento foi mensurada através da hidrólise do substrato pNP β G, como descrito na Seção 3.4.

Os diferentes valores de pH foram obtidos através dos seguintes tampões, todos em concentração de 250 mM:

- tampão citrato-fosfato de sódio (pH 3,00; 3,72 e 5,50);
- tampão fosfato de sódio (pH 7,28); e
- tampão Tris-HCl (pH 8,0).

Os dados obtidos foram analisados com o programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

3.12.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se a enzima parcialmente purificada por 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 ou 120 minutos em temperaturas de 50, 60, 65 ou 70 °C. Após este período de pré-incubação, foi realizado o ensaio enzimático empregando o substrato pNP β G (Seção 3.4), e utilizando as condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas para a BGL. A atividade residual da enzima nestes testes foi expressa como porcentagem da atividade enzimática apresentada no tempo zero (controle). Para o cálculo

do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da enzima em diferentes temperaturas, a Equação 1 foi utilizada:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

(1)

onde k_d é a constante de desnaturação da enzima para uma determinada temperatura, obtida através de gráficos semi-logarítmicos da atividade residual (%) *versus* tempo de pré-incubação (minutos).

A estabilidade frente a resfriamento (5 °C) e congelamento (-15 °C) também foi avaliada, mantendo a enzima parcialmente purificada por 7, 15, 30 ou 60 dias nestas temperaturas. Após este período, foi realizado o ensaio enzimático utilizando as condições ótimas estabelecidas para a BGL, e a atividade enzimática residual foi expressa como porcentagem da atividade observada no tempo zero (controle). No intuito de evitar a proliferação de microrganismos durante o período de armazenamento, azida sódica foi adicionada às amostras em uma concentração final de 0,2 g/L.

3.12.3 Efeito de sais, reagentes, álcoois e carboidratos sobre a atividade enzimática

O efeito de sais, reagentes e carboidratos sobre a atividade β -glicolítica foi determinado através da pré-incubação, a 37 °C por 10 minutos, de 100 μ L da enzima convenientemente diluída adicionada de 90 μ L de tampão citrato-fosfato de sódio (250 mM; pH 5,5) contendo os respectivos sais,

reagentes ou carboidratos, de forma a atingir as concentrações finais apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente. Após a pré-incubação, 10 μ L do substrato pNP β G (4 mg/mL) foi adicionado, e esta mistura foi incubada por 10 minutos em condições ótimas de temperatura. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de tampão carbonato de sódio (500 mM; pH 10) e, após, foi realizada leitura em espectrofotômetro (405 nM) do *p*-nitrofenol liberado.

Protocolo idêntico foi utilizado no estudo dos efeitos dos álcoois etanol e metanol (em concentrações de 0 a 3 M), sobre a atividade da BGL parcialmente purificada.

Em todos estes testes, a atividade enzimática foi expressa como porcentagem da atividade apresentada sem as respectivas adições (controle).

3.12.4 Especificidade da enzima em relação a diferentes substratos

Para a determinação da atividade sobre substratos cromogênicos (contendo pNP), a reação (200 μ L) consistiu na adição de 90 μ L de tampão citrato-fosfato de sódio (250 mM; pH 5,5), 10 μ L dos respectivos substratos (Tabela 12) para uma concentração final de 1 mM, e 100 μ L da enzima convenientemente diluída. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ótima, e a reação foi terminada com a adição de 1 mL de tampão carbonato de sódio (500 mM; pH 10). A atividade foi avaliada através da leitura em espectrofotômetro (405 nM) do *p*-nitrofenol liberado, e os resultados foram expressos como porcentagem da atividade da enzima frente ao substrato

padrão pNP β G. Uma unidade (U) de BGL foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de pNP (ou oNP) por minuto, sob as respectivas condições acima descritas.

Na análise da hidrólise de substratos não-cromogênicos, a reação (200 μ L) consistiu de 100 μ L de tampão citrato-fosfato de sódio (250mM; pH 5,5) contendo os respectivos substratos em quantidade suficiente para as concentrações finais apresentadas na Tabela 13, e 100 μ L da enzima convenientemente diluída. Após incubação de 30 minutos em condições ótimas de temperatura, a reação foi interrompida com a incubação a 100 °C por 5 minutos em banho seco. A atividade β -glicolítica foi avaliada através da quantidade de glicose liberada. Quando da utilização de substratos di- ou oligossacarídicos, a liberação de glicose foi avaliada através de kit comercial para quantificação enzimática de glicose (glicose-oxidase), de acordo com o manual do fabricante (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Argentina). Para a determinação da liberação de glicose a partir de substratos polissacarídicos, o método DNS (Seção 3.6) foi empregado. Uma unidade (U) de BGL foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto, sob as condições acima descritas.

3.12.5 Constantes cinéticas

A atividade da BGL parcialmente purificada foi avaliada utilizando diferentes concentrações de pNP β G (0,039-25,0 mM), celobiose (2,5-75,0 mM) e maltose (2,5-75,0 mM). Em todos os casos os ensaios e a análise da

atividade enzimática foram realizados em triplicata, conforme descrito na Seção 3.12.4, em condições ótimas de temperatura e pH.

As constantes cinéticas K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima de reação) para estes substratos foram calculadas a partir de gráficos de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934).

Valores de K_m e V_{max} para o substrato pNP β G também foram determinados na presença de glicose (10 e 20 mM) e celobiose (10 e 20 mM). Através deste procedimento, buscou-se verificar a modalidade de inibição exercida por glicose e celobiose sobre a atividade enzimática, bem como determinar a constante de inibição (K_i) da hidrólise de pNP β G para estes dois carboidratos. A obtenção dos valores de K_i para glicose e celobiose deu-se através da representação gráfica dos valores de K_m/V_{max} para o substrato pNP β G na presença e ausência dos respectivos inibidores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de BGL extracelular por *M. purpureus* NRRL1992

Várias combinações de substratos foram testadas visando a produção de BGL extracelular por *M. purpureus* NRRL1992 em cultivos submersos. Os resultados desta seleção são apresentados na Tabela 1.

A combinação entre resíduos agroindustriais e peptona ou farelo de soja resultou em maior produção de BGL do que a combinação entre CMC e peptona (Tabela 1). Este resultado é interessante, uma vez que a CMC é um substrato purificado, inviabilizando economicamente a produção de enzimas em larga escala. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de BGLs e outras enzimas, como celulases, hemicelulases e pectinases, têm atraído intenso interesse (HANG & WOODAMS, 1994; KANG et al., 1999, 2004; KRISHNA, 1999; ROMERO et al., 1999; PANAGIOTOU et al., 2003; ADSUL et al., 2004), uma vez que pode contribuir potencialmente para a diminuição dos custos de produção destas enzimas, e também para a redução da poluição ambiental provocada pelo acúmulo destes resíduos no ambiente.

TABELA 1. Produção de BGL extracelular por *M. purpureus* após 9 dias de cultivo submerso com diferentes substratos.

Substrato (g/L)*	Atividade enzimática (U/mL)**
CMC (20,0) + NH ₄ Cl (2,5)	0,08 ^a
CMC (20,0) + peptona (5,0)	0,36 ^b
Soro de queijo (20,0) + NH ₄ Cl (2,5)	0,20 ^{a,c}
Soro de queijo (20,0) + peptona (5,0)	1,04 ^d
Soro de queijo (20,0) + farelo de soja (5,0)	0,40 ^b
Casca de pinhão (20,0) + NH ₄ Cl (2,5)	0,06 ^a
Casca de pinhão (20,0) + peptona (5,0)	0,64 ^e
Farelo de soja (20,0)	0,83 ^f
Farelo de soja (20,0) + NH ₄ Cl (2,5)	0,78 ^f
Farelo de soja (20,0) + peptona (5,0)	1,10 ^d
Resíduo de uva (20,0) + NH ₄ Cl (2,5)	0,08 ^a
Resíduo de uva (20,0) + peptona (5,0)	1,68 ^g
Resíduo de uva (20,0) + farelo de soja (5,0)	0,66 ^{e,f}
Resíduo de uva (20,0) + NH ₄ Cl (2,5) + farelo de soja (5,0)	0,22 ^c

* Concentrações de substratos entre parênteses, expressas em g/L

** Média de experimentos em quadruplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre médias.

A melhor combinação de substratos para a produção de BGL extracelular por *M. purpureus* foi observada entre resíduo de uva e peptona (Tabela 1). Por este motivo, esta combinação foi utilizada nos estudos subsequentes. A Figura 1 apresenta o padrão de produção da BGL extracelular durante 14 dias de cultivo. Apesar da observação do acúmulo de BGL extracelular até o 14º dia de cultivo, o período de nove dias foi escolhido com base na produtividade da enzima. A produtividade no 9º dia de cultivo (0,18

U/mL.d) contrasta com a tendência de queda neste parâmetro observada no 14º dia (0,13 U/mL.dia), não justificando o prolongamento do tempo de cultivo.

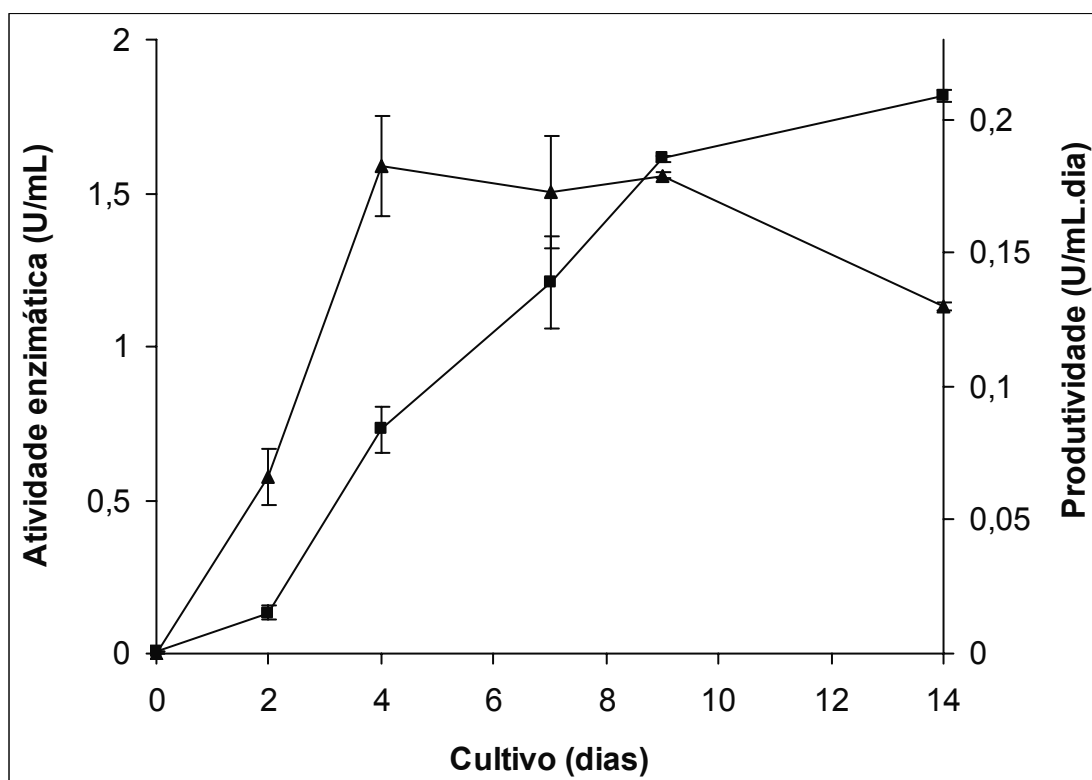


FIGURA 1. Produção (■) e produtividade (▲) de BGL por *M. purpureus* em meio mineral contendo resíduo de uva (20 g/L) e peptona (5 g/L). Cada ponto representa a média de experimentos realizados em quadruplicata.

A produção de uvas aproxima-se da marca de 60 milhões de toneladas por ano, tornando-se a segunda maior cultura de frutos no mundo. O bagaço representa aproximadamente 20% do peso das uvas processadas, significando mais de 9 milhões de toneladas por ano (SCHIEBER et al., 2001).

Portanto, resíduos de uva são abundantes e podem ser empregados em processos como compostagem (FERRER et al., 2001), ser utilizados como fontes de compostos antioxidantes (MEYER et al., 1998; SHRIKHANDE, 2000), como substratos para a produção de etanol (HANG et al., 1986), ácido cítrico (HANG & WOODAMS, 1985), enzimas (MOLDES et al., 2003; BOTELLA et al., 2005), entre outros. Particularmente, o bagaço de uva representa uma fonte potencialmente valiosa de antioxidantes fenólicos (MEYER et al., 1998; SHRIKHANDE, 2000) e a combinação entre crescimento fúngico e produção de BGLs pode ser explorada na liberação de compostos fenólicos a partir deste resíduo, como observado com resíduos de abacaxi, goiaba e outros (ZHENG & SHETTY, 2000; VATTEM & SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004a, 2004b).

É importante ressaltar que a presença de fontes inorgânicas de nitrogênio (NH_4Cl) não sustentou a produção de níveis elevados de BGL, fato também descrito em outros fungos (YAZDI et al., 1990; UMIKALSOM et al., 1997). Por outro lado, estudos relatam que fontes inorgânicas de nitrogênio resultaram na produção de BGL em níveis iguais ou superiores à obtida com fontes orgânicas (KRISHNA, 1999; KALOGERIS et al., 2003). Fontes orgânicas de nitrogênio são geralmente utilizadas para a produção de pigmentos (PASTRANA et al., 1995; DUFOSSÉ et al., 2005) e enzimas (LIU et al., 2004; LIANG et al., 2006) por espécies do gênero *Monascus*. Particularmente, Liu et al. (2004) observaram que fontes inorgânicas de nitrogênio resultaram em baixa produção de carboxipeptidase por *M. purpureus*, quando comparada à produção obtida com fontes orgânicas.

Entre os substratos testados em combinação com fontes inorgânicas de nitrogênio (NH_4Cl), a maior produção de BGL foi observada com a utilização de farelo de soja (Tabela 1). Além disso, devido à elevada atividade enzimática observada quando da utilização de farelo de soja como único substrato, este subproduto industrial foi testado como uma alternativa à utilização de peptona. Fontes alternativas de nitrogênio, de baixo custo, como o extrato de sólidos solúveis de milho (KANG et al., 1999) e farinha de soja (GOMES et al., 2000) foram empregadas com sucesso na produção de BGL, contribuindo para a diminuição dos custos de produção da enzima. Entretanto, a produção de BGL utilizando resíduo de uva e farelo de soja como substratos foi apenas 39% da obtida com a utilização de resíduo de uva e peptona (Tabela 1).

A produção de BGL utilizando a combinação entre resíduo de uva e farelo de soja demonstrou, contudo, ser similar à obtida com a combinação entre casca de pinhão e peptona (Tabela 1). De um lado a menor recalcitrância, a presença de vitaminas e minerais e o conteúdo de aminoácidos essenciais do farelo de soja e, por outro lado, o maior conteúdo de lignina das cascas de pinhão, podem ter sido responsáveis por estes resultados. A lignina, polímero insolúvel que fortalece as microfibrilas de celulose, é altamente resistente à biodegradação, protegendo celulose e hemicelulose contra a hidrólise, ou seja, diminuindo o acesso ao substrato e a susceptibilidade do mesmo à degradação (BÉGUIN & AUBERT, 1994; LYND et al., 2002; KANG et al., 2004).

Soro de queijo em pó não demonstrou ser um bom substrato para a produção de BGL quando em combinação com NH_4Cl ou farelo de soja.

Entretanto, a combinação entre soro de queijo e peptona aumentou a produção de BGL, tornando-se a segunda melhor combinação de substratos para este propósito (Tabela 1). O soro de queijo é um resíduo industrial rico em lactose, e diversos estudos relatam que este dissacarídeo pode atuar como indutor para a produção de enzimas do complexo celulase, incluindo BGLs, em fungos (ABDEL-FATTAH et al., 1997; CAI et al., 1998; SAHA, 2004) e bactérias (THIRUMALE et al., 2001; WOLOSOWSKA & SYNOWIECKI, 2004).

4.2 Repressão da produção de BGL

A expressão de genes que codificam enzimas do complexo celulase geralmente ocorre de forma constitutiva em níveis basais, e um dos mecanismos de regulação da transcrição destas enzimas, conhecido como repressão catabólica por carbonos, é comum entre fungos quando do seu crescimento em fontes de carbono facilmente assimiláveis (SUTO & TOMITA, 2001). O crescimento de fungos do gênero *Penicillium* em meio mineral contendo glicose reprimiu a produção de enzimas, e somente após a exaustão da glicose tais microrganismos iniciaram a produção de BGL (JØRGENSEN et al., 2004). Ao encontro destes resultados, a Figura 2 demonstra que *M. purpureus* produz nível constitutivo basal de BGL na presença de glicose, e que o aumento na produção desta enzima inicia-se após o consumo da glicose do meio de cultivo. Logo, pelos resultados obtidos, a produção de BGL extracelular por *M. purpureus* NRRL1992 parece ser indutível (Tabela 1) e controlada por repressão catabólica (glicose).

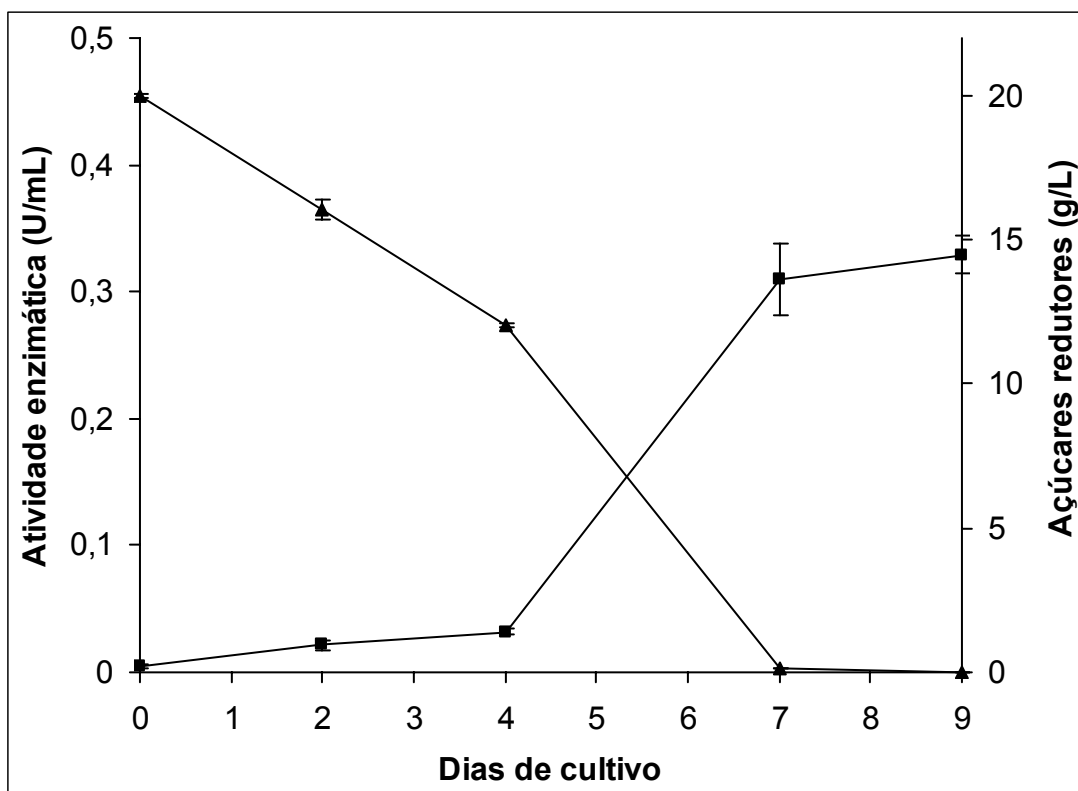


FIGURA 2. Perfil da produção de BGL por *M. purpureus* em meio mineral contendo glicose (20 g/L) e peptona (5 g/L). (■) Atividade enzimática; (▲) Concentração de açúcares redutores (glicose). Cada ponto representa a média de experimentos em quadruplicata.

4.3 Efeitos de componentes do meio de cultivo na produção de BGL extracelular

Os resultados obtidos apontam a interação positiva entre peptona (ou farelo de soja) e os resíduos agroindustriais testados, resultando em aumento da produção de BGL (Tabela 1). O grau de contribuição e os efeitos de resíduo de uva e peptona na produção de BGL foram estudados através de experimento fatorial (2^2). A Tabela 2 mostra as variáveis independentes resíduo de uva (X_1) e peptona (X_2), seus níveis codificados e reais, bem como a atividade enzimática em cada tratamento, representando a produção de BGL.

TABELA 2. Produção de BGL extracelular por *M. purpureus* utilizando diferentes concentrações de resíduo de uva e peptona (experimento fatorial 2²)

Tratamento	Variáveis independentes*		Atividade enzimática (U/mL)**
	X ₁	X ₂	
1	10 g/L (-1)	1 g/L (-1)	0,54
2	10 g/L (-1)	20 g/L (+1)	1,95
3	50 g/L (+1)	1 g/L (-1)	0,10
4	50 g/L (+1)	20 g/L (+1)	2,78
5	30 g/L (0)	10,5 g/L (0)	2,29
6	30 g/L (0)	10,5 g/L (0)	2,38
7	30 g/L (0)	10,5 g/L (0)	2,35

* São apresentados os valores reais (em g/L) e codificados (entre parênteses) para as variáveis independentes X₁ (resíduo de uva) e X₂ (peptona).

** Variável dependente.

Uma forma de avaliar os efeitos principais das variáveis independentes sobre a resposta (variável dependente) é a análise da diferença na performance do processo causada pela mudança do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) da variável independente correspondente. A performance do processo foi mensurada para a produção de BGL, e o valor p foi utilizado para confirmar a significância dos fatores estudados (Tabela 3).

Os resultados demonstraram que a produção de BGL foi afetada de forma mais significativa ($p < 0,05$) pela concentração de peptona (X₂). A mudança nesta variável, do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), resultou em aumento médio de 2,04 U/mL na atividade enzimática. A interação entre resíduo de uva e peptona também demonstrou ser significativa ($p < 0,05$) para a produção de BGL, tornando-se um fator interessante e atrativo no intuito de

obter níveis elevados desta enzima. A concentração de resíduo de uva (X_1) apresentou influência positiva em nível de confiança de 94% ($p < 0,06$). Desta forma, a concentração de peptona parece ser mais importante do que resíduo de uva na produção de BGL por *M. purpureus* NRRL1992.

TABELA 3. Efeitos principais de variáveis independentes, e interações, na produção de BGL por *M. purpureus*

Variável	Efeito (U/mL)	Erro Padrão	Valor p
Média	1,77	0,01	0,000097*
Resíduo de uva (X_1)	0,19	0,04	0,053461
Peptona (X_2)	2,04	0,04	0,000506*
$X_1.X_2$	0,63	0,04	0,005210*

*Fatores significativos ($p < 0,05$)

Apesar do fato de a maior produção de BGL ter sido obtida quando da utilização de resíduo de uva e peptona nas concentrações mais elevadas, é necessário considerar a peptona como um substrato caro e, neste sentido, uma análise de custo-benefício torna-se indispensável visando a produção de quantidades satisfatórias da enzima a custos baixos ou moderados.

4.4 Purificação parcial da BGL extracelular produzida por *M. purpureus*

O objetivo geral de um processo de purificação de proteínas não é apenas a remoção de contaminantes indesejados, mas também a concentração da proteína de interesse e sua transferência para um ambiente onde esta apresente-se estável e pronta para a aplicação pretendida. A pureza de proteínas é pré-requisito para o estudo de suas estruturas e funções, ou para suas aplicações potenciais, sendo que o nível de purificação requerido depende do uso final da proteína. Alto grau de pureza é necessário para estudos estruturais ou aplicações terapêuticas, e baixo ou moderado grau de pureza para aplicações industriais, como na indústria alimentícia ou na produção de detergentes domésticos (QUEIROZ et al., 2001).

O cultivo de *M. purpureus* em meio mineral contendo resíduo de uva (20 g/L) e peptona (5 g/L) foi filtrado e centrifugado após 9 dias de incubação. O sobrenadante resultante, denominado extrato bruto, foi utilizado como fonte de enzima no processo de purificação parcial da BGL extracelular. Este processo consistiu de três etapas: precipitação de proteínas com acetona; cromatografia líquida de gel-filtração; e cromatografia líquida de interação hidrofóbica. O resumo do processo de purificação parcial é apresentado na Tabela 4.

A primeira etapa de purificação da BGL extracelular consistiu na precipitação de proteínas do extrato bruto através da adição de acetona gelada (80% v/v). Este solvente orgânico interage com regiões hidrofóbicas de proteínas, repelindo moléculas de água e fazendo com que as proteínas

precipitem, principalmente, devido a interações eletrostáticas (SCOPES, 1994). A precipitação resultou na recuperação de aproximadamente 60% da atividade β -glicolítica presente no extrato bruto (100%), e em aumento de 9,5 vezes na atividade específica (Tabela 4).

TABELA 4. Quadro de purificação parcial da BGL extracelular produzida por *M. purpureus* NRRL1992

Etapa de purificação	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)	Fator de purificação
Extrato bruto	2,40	2,60	0,92	1,0
Precipitação	36,34	4,16	8,73	9,5
Gel-filtração	4,23	0,36	11,75	13,0
Interação hidrofóbica	2,53	0,03	84,34	92,0

A amostra resultante da etapa anterior foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração Sephadex G-100, equilibrada com tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,25) e eluída com o mesmo tampão. A Figura 3 apresenta o padrão de uma eluição típica. Na eluição foram coletadas 25 frações de 1 mL, e nestas frações puderam ser observados dois picos de proteína (fração 4 e fração 10), e apenas um pico de atividade enzimática (fração 4) coincidindo com o primeiro, e maior, pico de proteínas.

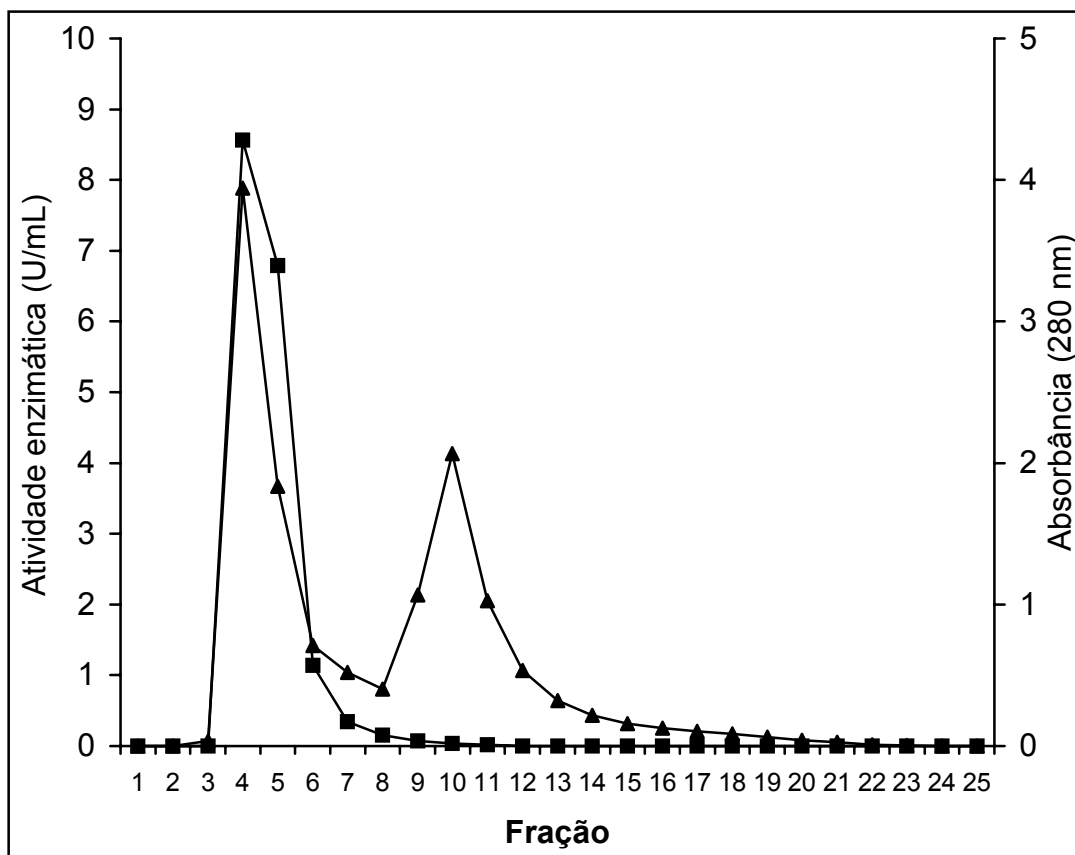


FIGURA 3. Padrão de eluição em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração com a resina Sephadex G-100. (■) atividade enzimática (U/mL); (▲) absorbância a 280 nm.

A cromatografia líquida de gel-filtração separa moléculas basicamente por tamanho e peso molecular, sendo que moléculas maiores são eluídas da coluna anteriormente às moléculas menores. Isto ocorre pois moléculas menores têm acesso a uma maior porção dos poros da resina na coluna e, com isso, a migração através da mesma ocorre em menor velocidade (SCOPES, 1994; POPOVICI & SCHOENMAKERS, 2005; YU et al., 2006). A eluição da atividade enzimática nas primeiras frações (4, 5, 6 e 7) pode indicar que a BGL seja uma enzima de peso molecular elevado, provavelmente maior

que 100-150 kDa, ou que a enzima esteja agregada ou associada a outras moléculas, como proteínas e pigmentos produzidos por *M. purpureus*. Neste sentido, os pigmentos produzidos por espécies de *Monascus* apresentam baixa solubilidade em água, e podem reagir facilmente com compostos contendo grupamentos amino presentes no meio, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos, formando pigmentos hidrossolúveis (WONG & KOEHLER, 1983; DUFOSSÉ et al., 2005).

As frações com atividade na etapa de gel-filtração (4-7) foram unidas, adicionadas de sulfato de amônio (55 mM), e aplicadas em coluna de cromatografia líquida de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,25) contendo a mesma concentração de sulfato de amônio. Esta modalidade de cromatografia faz uso da hidrofobicidade de proteínas, promovendo sua separação através de interações entre ligantes hidrofóbicos imobilizados e regiões não-polares na superfície de proteínas (QUEIROZ et al., 2001). O processo consiste na injeção das amostras na coluna hidrofóbica em condições de elevada concentração de sais, e a eluição é tipicamente alcançada através da diminuição da concentração de sais na fase móvel (MAHN e ASENJO, 2005). O sulfato de amônio é um dos sais geralmente empregados, visando diminuir a interação de proteínas com moléculas de água, ressaltando assim o caráter hidrofóbico destas proteínas e fortalecendo a interação entre os grupamentos da resina e as regiões hidrofóbicas periféricas das proteínas (SCOPES, 1994; QUEIROZ et al., 2001).

A Figura 4 apresenta uma eluição típica, onde foram coletadas 20 frações de 1 mL. Nas primeiras cinco (05) frações, eluídas com tampão fosfato de sódio contendo sulfato de amônio, observou-se apenas a saída de proteínas que não interagiram com a coluna. Por outro lado, a supressão do sulfato de amônio do tampão de eluição resultou no desligamento de proteínas associadas à coluna, originando um segundo pico de proteínas (fração 8) que coincidiu com a eluição do pico de atividade enzimática (frações 8-11), demonstrando assim a natureza de hidrofobicidade moderada da enzima.

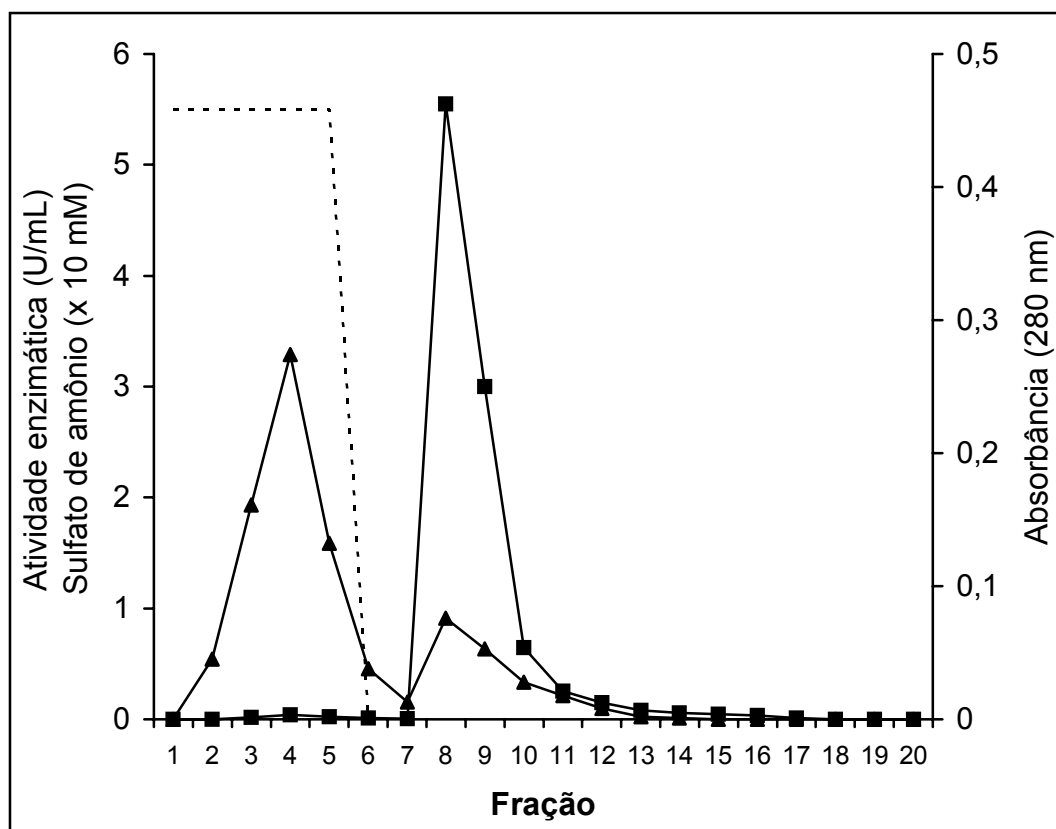


FIGURA 4. Padrão de eluição em coluna de cromatografia líquida de interação hidrofóbica com a resina Phenyl Sepharose. (■) atividade enzimática (U/mL); (▲) absorbância a 280 nm, (---) concentração de sulfato de amônio (x 10 mM).

Enquanto que no extrato bruto observou-se atividade específica de 0,9 U/mg de proteína, a atividade específica obtida ao final da purificação parcial foi de 84 U/mg de proteína, representando um fator de purificação de 92 vezes (Tabela 4), com a recuperação de aproximadamente 23% da BGL presente no extrato bruto.

O padrão protéico após a purificação parcial foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A coloração do gel revelou três bandas majoritárias de 55, 60 e 120 kDa (Figura 5; indicadas por setas), e outras de menor intensidade nas posições correspondentes a 9, 11, 13, 25, 40, 50 e 160 kDa.

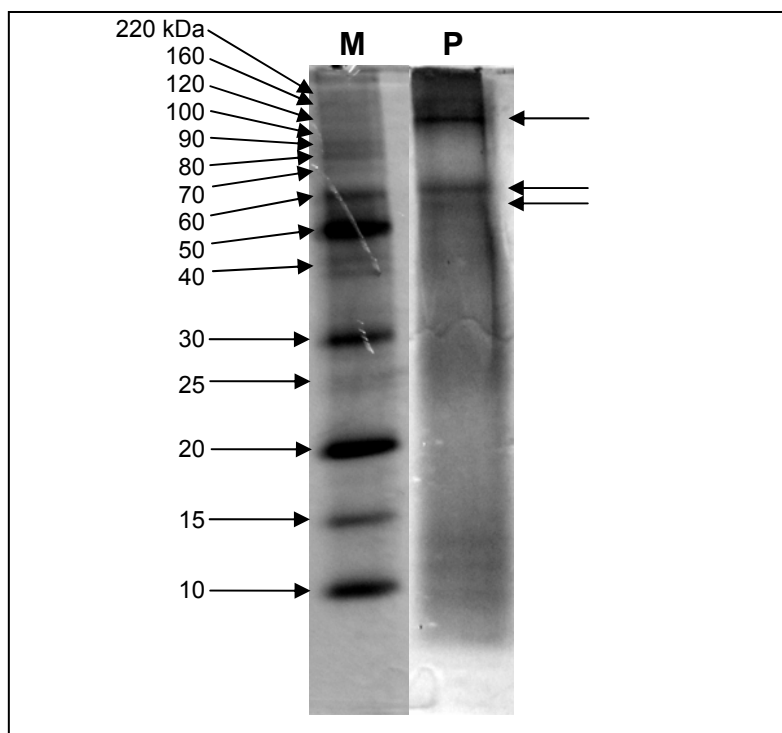


FIGURA 5. SDS-PAGE de amostra do processo de purificação parcial. **M:** marcador de peso molecular; **P:** padrão protéico após purificação parcial. As setas indicam bandas majoritárias após coloração com nitrato de prata.

Amostras da última etapa de purificação também foram submetidas a eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE). Após a PAGE, a atividade beta-glicolítica nos géis foi localizada através de zimograma utilizando o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glicosídeo (4-MUG), sendo observada uma única banda de atividade (Figura 6; indicada por seta). Comportamento idêntico foi observado quando da realização do zimograma com o substrato pNP β G. Neste caso, uma única banda de coloração amarela foi observada no gel quando sobre fundo claro (resultado não apresentado). Estes resultados indicam a presença de uma única BGL.

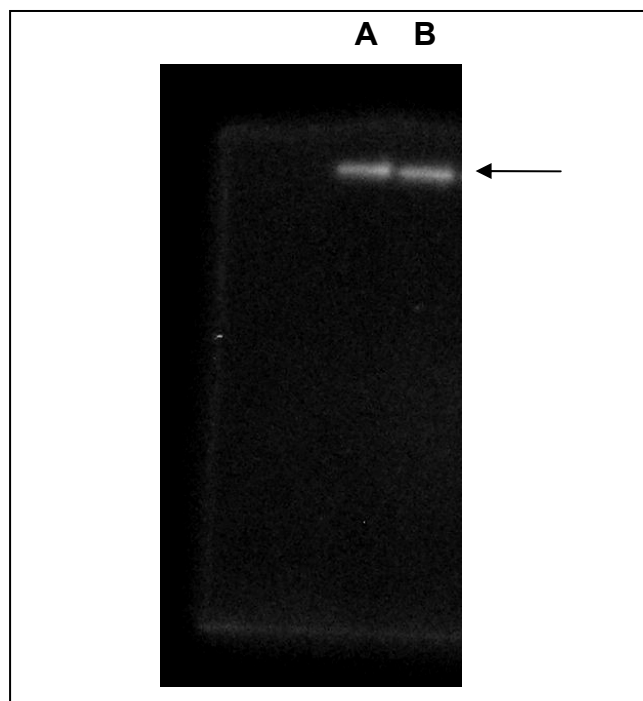


FIGURA 6. Zimograma realizado com o substrato 4-MUG após PAGE. **A:** amostra da etapa de gel-filtração; **B:** amostra da última etapa de purificação. A seta indica bandas observadas sob luz UV (365 nm).

4.5 Caracterização da BGL parcialmente purificada

4.5.1 Temperatura e pH ótimos

Os efeitos de temperatura e pH na atividade da BGL extracelular parcialmente purificada, frente ao substrato pNPβG, foram avaliados através de planejamento fatorial 2² completo, e análise de superfície de resposta. Os métodos convencionais geralmente modificam um único parâmetro por experimento, mantendo os demais em níveis constantes, porém freqüentemente fracassam na localização de condições ótimas de bioprocessos devido à falha em demonstrar o efeito de possíveis interações entre parâmetros. Neste sentido, técnicas de planejamento fatorial e superfície de resposta tornam-se eficientes estratégias experimentais visando a obtenção de condições ótimas em sistemas de múltiplas variáveis (KALIL et al., 2000). Tais técnicas vêm sendo empregadas com êxito em diversas áreas da biotecnologia, principalmente na otimização de meios de cultivo para produção de enzimas (TANG et al., 2004; NAWANI & KAPADNIS, 2005; THYS et al., 2006), mas também na otimização de condições para a atividade de diversas enzimas (GUMMADI & KUMAR, 2006; HECK et al., 2006; MAYERHOFF et al., 2006; RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2007).

A Tabela 5 mostra as variáveis independentes (temperatura e pH) e seus níveis codificados e reais, bem como a resposta obtida para a variável dependente (atividade enzimática) em cada combinação de tratamento.

TABELA 5. Atividade da BGL parcialmente purificada, frente ao substrato pNPβG, em diferentes combinações de temperatura e pH

Tratamento	Variáveis independentes*		Atividade enzimática (U/mL)**
	Temperatura (°C)	pH	
1	71,3 (+1)	7,28 (+1)	0,101
2	71,3 (+1)	3,72 (-1)	0,984
3	28,7 (-1)	7,28 (+1)	0,270
4	28,7 (-1)	3,72 (-1)	0,505
5	80 (+1,41)	5,50 (0)	1,341
6	20 (-1,41)	5,50 (0)	1,045
7	50 (0)	8,00 (+1,41)	0,209
8	50 (0)	3,00 (-1,41)	1,058
9	50 (0)	5,50 (0)	5,912
10	50 (0)	5,50 (0)	5,878
11	50 (0)	5,50 (0)	5,919
12	50 (0)	5,50 (0)	5,986

* São apresentados os valores reais e codificados (entre parênteses) para as variáveis independentes (temperatura e pH).

** Variável dependente.

Os efeitos das variáveis independentes sobre a atividade enzimática (variável dependente) são apresentados na Tabela 6. O aumento do pH, do limite inferior (3,00) para o limite superior (8,00), resultou em diminuição da atividade enzimática, indicando que valores de pH tendendo ao ácido são mais apropriados para o desempenho desta enzima. O aumento da temperatura apresentou efeito positivo sobre a atividade enzimática; contudo, o efeito negativo exercido por valores próximos ao limite superior (80 °C), sugere a desnaturação térmica da enzima.

TABELA 6. Efeitos de variáveis independentes (temperatura e pH), e suas interações, sobre a atividade da BGL parcialmente purificada

Variáveis	Efeito (U/mL)	Erro padrão	Valor <i>p</i>
Média	5,925	0,02	<0,000000*
(1) Temperatura (L ^a)	0,182	0,03	0,010718*
Temperatura (Q ^b)	-4,970	0,03	0,000001*
(2) pH (L)	-0,580	0,32	0,000366*
pH (Q)	-5,533	0,35	0,000001*
(1) x (2)	-0,324	0,45	0,005592*

* Fatores significativos ($p < 0,05$); ^a L = efeito linear; ^b Q = efeito quadrático

A partir da análise de regressão dos dados experimentais obtidos, foi gerado o modelo expresso pela Equação (2):

$$AE = 5,92499 + 0,09119.T - 2,48535.T^2 - 0,29025.P - 2,76677.P^2 - 0,162.T.P \quad (2)$$

onde *AE* corresponde à atividade enzimática (U), *T* à temperatura e *P* ao pH do meio reacional em valores codificados.

A análise deste modelo foi realizada por análise de variância (ANOVA) (Tabela 7). Os dados obtidos foram avaliados através do teste de Fischer, que define o valor *F* como a razão entre a média quadrática da regressão pela média quadrática do erro. O valor *F*, calculado a partir dos resultados da ANOVA (295,3), foi muito maior que o valor tabelado de *F* para estas condições (4,39), indicando que o modelo foi significativo em nível de

confiança de 95%. O valor $R^2 = 0,995$ indica que 99,5% da variação foi explicada pelo modelo. Assim, a variação considerada pelo modelo é significativamente maior do que possíveis variações ao acaso. Logo, o modelo é confiável e adequado para a representação dos efeitos, relações e interações entre temperatura, pH e atividade enzimática.

TABELA 7. Análise de variância^a

Fonte de variação	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	Valor F
Regressão	88,63	5	17,72	295,3
Residual	0,35	6	0,06	
Coefficiente de correlação (R^2)	0,995			

^a $F_{0,95(5;6)} = 4,39$; ^b Soma dos quadrados; ^c Graus de liberdade; ^d Média quadrática

A superfície de contorno e a superfície de resposta, geradas a partir dos dados obtidos, são apresentadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Nas condições de reação utilizadas, a atividade enzimática máxima foi observada em amplo intervalo de temperaturas (35-65 °C) e pHs (4,2-6,7), abrangendo o ponto central do experimento (Figuras 7 e 8). Neste sentido, a combinação de condições de temperatura e pH do ponto central (50 °C e pH 5,5) foi considerada ótima para a atuação desta enzima. Esta ampla área de desempenho máximo permite a exploração de inúmeras combinações entre temperaturas e pHs, determinando a versatilidade potencial desta enzima para aplicação em diversos processos específicos.

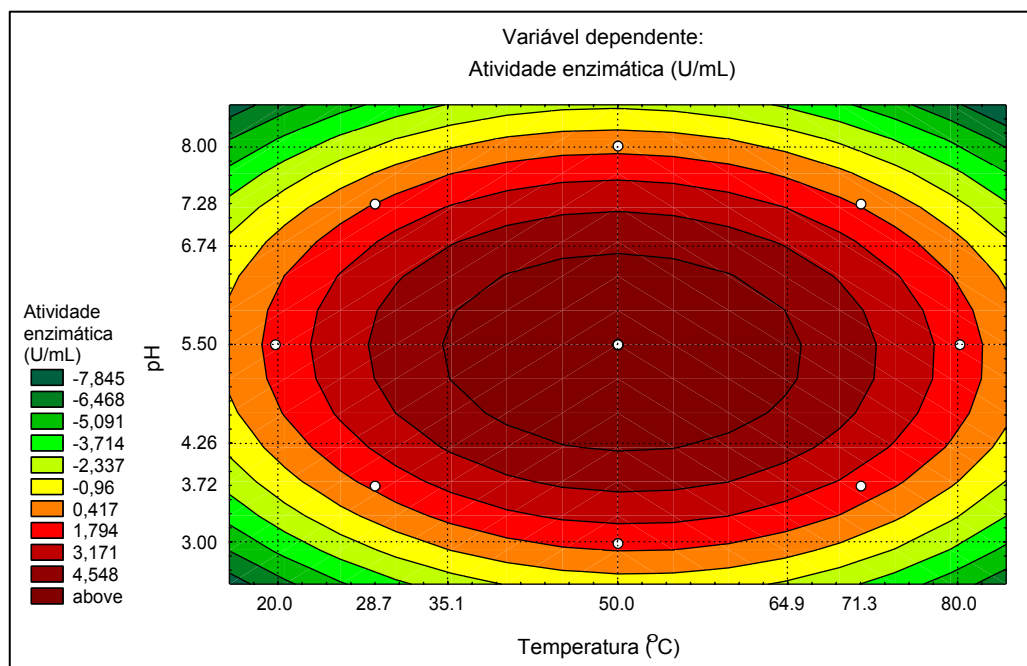


FIGURA 7. Superfície de contorno para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular parcialmente purificada.

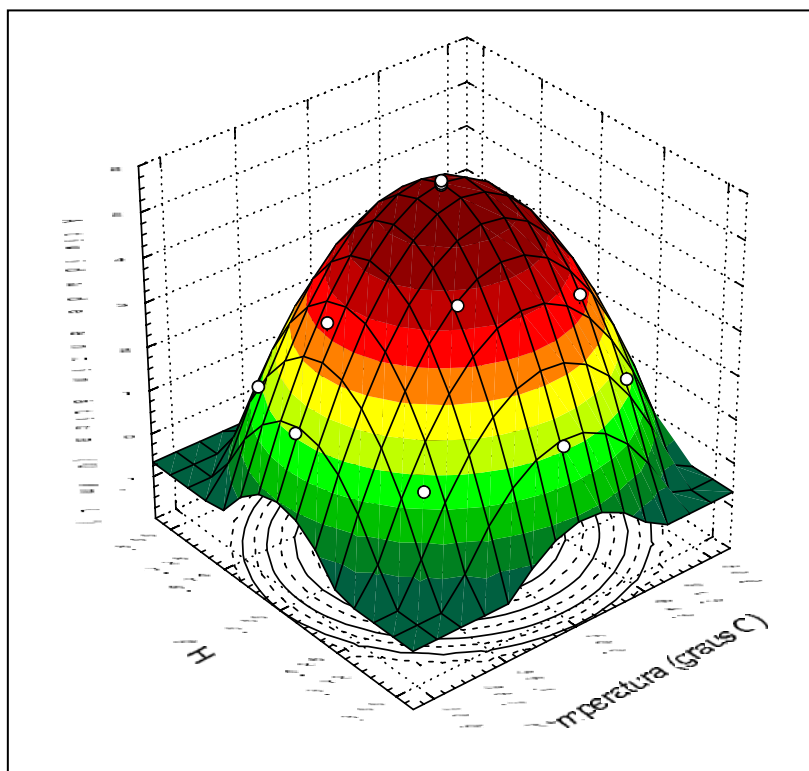


FIGURA 8. Superfície de resposta para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular parcialmente purificada.

A maioria das BGLs fúngicas exibe temperaturas ótimas para atividade entre 40 °C e 50 °C, e valores ótimos de pH entre 4,0 e 6,0 (WOODWARD & WISEMAN, 1982; BHATIA et al., 2002; SARRY & GÜNATA, 2004). Em espécies do gênero *Aspergillus*, particularmente, observa-se que as temperaturas ótimas de BGLs extracelulares variam entre 50 °C e 70 °C, enquanto que os valores de pH podem variar de 4,0 a 5,5 (SANYAL et al., 1988; WATANABE et al., 1992; HANG e WOODAMS, 1994; IWASHITA et al., 1998; RIOU et al., 1998; YAN et al., 1998; KANG et al., 1999; KIMURA et al., 1999; PESHIN & MATHUR, 1999; DECKER et al., 2000, 2001; JÄGER et al., 2001).

As condições ótimas de temperatura e pH para diversas BGLs microbianas são apresentadas na Tabela 8. As temperaturas ótimas podem atingir valores extremos, como os 98 °C para a BGL intracelular da bactéria hipertermofílica *Sulfolobus shibatae* (WOLOSOWSKA & SYNOWIECKI, 2004). Quanto ao pH, BGLs de localização parietal ou intracelular geralmente apresentam pHs ótimos mais próximos à neutralidade, enquanto que BGLs extracelulares apresentam pHs ótimos em valores mais baixos (pHs ácidos).

TABELA 8. Localização, temperatura (T) e pH ótimos de BGLs microbianas

Microrganismo	Localização	T (°C)	pH	Referência
<i>Monascus purpureus</i> NRRL1992	Extracelular	50	5,5	Este trabalho
<i>Aureobasidium</i> sp.	Extracelular	65	2,0-2,5	Iembo et al., 2002
<i>Aureobasidium</i> sp. ATCC 20524	Intracelular	80	4,0	Hayashi et al., 1999
<i>Botrytis cinerea</i>	Intracelular	50	7,0	Gueguen et al., 1995a
<i>Candida cacaoi</i>	Extracelular	55	4,0	Drider et al., 1993
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Extracelular	70	4,8	Lau & Wong, 2001
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Intracelular	38	6,6	Siddiqui et al., 1997
<i>Chalara paradoxa</i>	Extracelular	45	4,0-5,0	Lucas et al., 2000
<i>Cladosporium resinae</i>	Extracelular	50	4,5	Oh et al., 1999
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	Extracelular	40	5,0	Belancic et al., 2003
<i>Escherichia coli</i> (gene β glu2 de <i>Pichia etchellsii</i>)	Periplasmática	45	6,0	Bhatia et al., 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	Extracelular	60	5,0-6,0	Christakopoulos et al., 1994
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Extracelular	55-60	6,0	Peralta et al., 1997
<i>Macrophomina phaseolina</i>	BGL-I	Extracelular	55	Saha et al., 1981
	BGL-II	Extracelular	65	
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Extracelular	45	5,5-7,0	Li & Calza, 1991
<i>Neurospora crassa</i> (mutante <i>cell1</i>)	BGL A	Intracelular	55	Yazdi et al., 2003
	BGL B	Intracelular	60	

(CONTINUAÇÃO) TABELA 8. Localização, temperatura (T) e pH ótimos de BGLs microbianas

Microrganismo	Localização	T (°C)	pH	Referência
<i>Orpinomyces</i> sp. (PC-2)	Extracelular	50	6,2	Chen et al., 1994
<i>Penicillium decumbens</i>	G _I Intracelular	65	7,0	Mamma et al., 2004
	G _{II} Intracelular	75	7,0	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Extracelular	70	4,2	Khalil, 2002
<i>Pichia etchellsii</i>	BGL-I Parietal	50	6,0	Wallecha & Mishra, 2003
	BGL-II Parietal	50	6,0	
<i>Pichia pastoris</i> (gene <i>cel 1A</i> de <i>Piromyces</i> sp. E2)	Extracelular	47	5,7-6,3	Harhangi et al., 2002
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Parietal	60	6,5	Zanoelo et al., 2004
<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 11238	Intracelular	50	6,0-6,5	Pérez-Pons et al., 1995
<i>Sulfolobus shibatae</i>	Intracelular	98	5,5	Wolosowska & Synowiecki, 2004
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Extracelular	80	4,5	Kalogeris et al., 2003
<i>Trichoderma harzianum</i>	Extracelular	45	5,0	Yun et al., 2001
<i>Trichoderma reesei</i>	BGL-I Extracelular	65-70	4,6	Chen et al., 1992
	BGL-II Extracelular	60	4,0	
<i>T. reesei</i> (gene <i>cel3</i> de <i>Talaromyces emersonii</i>)	Extracelular	71,5	4,02	Murray et al., 2004
<i>Volvariella volvacea</i>	BGL-I Parietal	55-60	7,0	Cai et al., 1998
	BGL-II Parietal	55-60	6,2	
<i>Xylaria regalis</i>	Extracelular	50	5,0	Wei et al., 1996

4.5.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da BGL extracelular de *M. purpureus* foi analisada incubando a enzima em diferentes temperaturas (50, 60, 65 e 70 °C) por diferentes intervalos de tempo (0 a 120 minutos). Após o respectivo período de incubação o ensaio enzimático foi realizado, e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade observada no tempo zero. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 9.

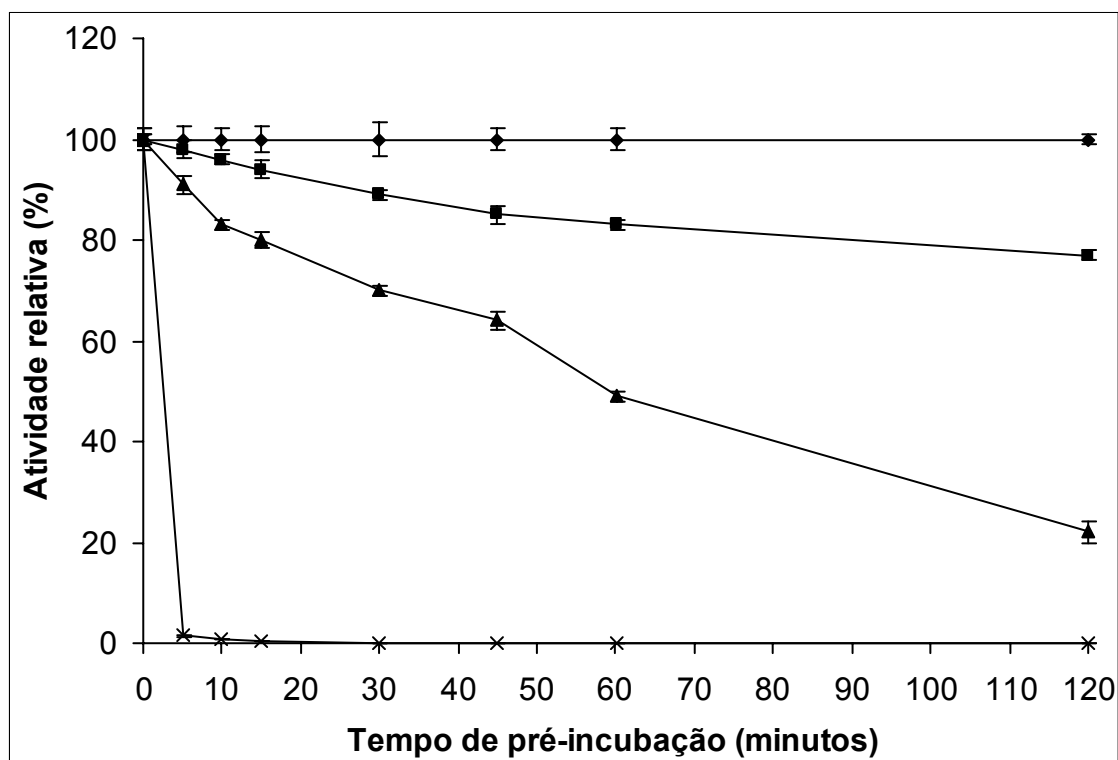


FIGURA 9. Estabilidade térmica da BGL parcialmente purificada. Pré-incubação a 50 °C (◆), 60 °C (■), 65 °C (▲) e 70 °C (x). Após o respectivo período de pré-incubação, o ensaio enzimático padrão foi realizado para cada amostra. Cada ponto é a média de experimentos realizados em triplicata.

Observou-se que a pré-incubação da enzima por até duas horas a 50 °C não afetou negativamente a atividade enzimática (Figura 9). Da mesma forma, a pré-incubação a 60 °C por 5 minutos não apresentou efeito adverso na atividade da enzima, sendo observada queda na atividade enzimática em pré-incubações superiores a 5 minutos. Após uma hora a 60 °C, a enzima manteve 83% da atividade observada no controle, e 78% após duas horas de pré-incubação, apresentando meia-vida de 315 minutos. Quando pré-incubada a 65 °C por 60 e 120 minutos, a enzima manteve 50% e 22% da atividade inicial, respectivamente, apresentando meia-vida de 57 minutos. Contudo, a estabilidade da enzima a 70 °C foi praticamente nula, uma vez que a atividade enzimática diminuiu 98,5% após 5 minutos de pré-incubação (Figura 9), apresentando meia-vida de apenas 1,8 minuto.

Em fungos filamentosos, a estabilidade térmica é geralmente superior à observada em leveduras e bactérias (DRIDER et al., 1993; BELANCIC et al., 2003; WALLECHA & MISHRA, 2003; SARRY & GÜNATA, 2004; SESTELO et al., 2004).

De forma semelhante ao observado neste estudo, as BGLs extracelulares de *A. phoenicis*, *A. niger* e *A. carbonarius* permaneceram estáveis por duas horas em temperaturas de até 50 °C, mantiveram 87%, 64% e 53% da atividade, respectivamente, após duas horas a 60 °C, mas foram inativadas após duas horas a 70 °C (JÄGER et al., 2001). Por outro lado, BGL extracelular de *A. oryzae* não foi afetada por pré-incubação de 5 horas a 60 °C (RIOU et al., 1998), e BGL extracelular de *A. niger* permaneceu estável em

temperaturas abaixo de 60 °C por uma hora, ainda mantendo 50% da atividade original após 10 minutos a 70 °C (YAN et al., 1998).

Comparativamente aos resultados deste experimento, BGL extracelular de *Fusarium oxysporum* apresentou meia-vida de apenas 109 minutos a 60 °C, e de 28 minutos a 65 °C (CHRISTAKOPOULOS et al., 1994). Em *Xylaria regalis*, BGL extracelular manteve aproximadamente 78% da atividade após 30 minutos a 50 °C, com rápida inativação quando da pré-incubação por 30 minutos em temperaturas iguais ou superiores a 60 °C (WEI et al., 1996). Em *A. sojae*, BGL extracelular foi inativada após 15 minutos a 65 °C (KIMURA et al., 1999), enquanto que BGL extracelular de *Cladosporium resinae* foi inativada após 30 minutos a 60 °C, mantendo aproximadamente 40% da atividade original após 30 minutos a 55 °C (OH et al., 1999). A BGL extracelular de *Trichoderma harzianum* apresentou-se estável em temperaturas inferiores a 55 °C por 15 minutos, mantendo 36% da atividade inicial após 15 minutos a 60 °C (YUN et al., 2001). Já em *Trichoderma reesei*, duas BGLs extracelulares (I e II) mostraram-se estáveis em temperaturas de 55 °C e 60 °C. Entretanto, após uma hora a 65 °C, BGL-I reteve aproximadamente 40% da atividade inicial, enquanto que BGL-II foi inativada (CHEN et al., 1992).

Em microrganismos termofílicos há a tendência de enzimas apresentarem estabilidade térmica mais pronunciada. No fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, por exemplo, BGL extracelular demonstrou-se estável por uma hora a 60 °C, exibindo meia-vida de 30 minutos a 70 °C (PERALTA et al., 1997). Em *Thermoascus aurantiacus*, a atividade beta-glicolítica extracelular exibiu meia-vida de 18 minutos a 80 °C, e de 24 horas a 70 °C

(KALOGERIS et al., 2003). Entretanto, Zanoelo et al. (2004) observaram que BGL parietal do fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* permaneceu estável por uma hora a 50 °C, apresentando meia-vida de apenas 20 minutos a 55 °C (ZANOELO et al., 2004).

A estabilidade da BGL parcialmente purificada também foi testada frente a baixas temperaturas, com o armazenamento da enzima por até 60 dias em temperaturas de 5 e -15 °C. Como pode ser observado na Figura 10, o armazenamento a 5 °C não afetou a atividade enzimática durante os 60 dias de armazenamento. O congelamento (-15 °C), por sua vez, reduziu levemente a atividade enzimática após o 15º dia de armazenamento e, após os 60 dias, 96% da atividade enzimática inicial foi mantida.

Similarmente, BGL extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii*, armazenada a 4 °C ou -21 °C por 55 dias, manteve mais de 90% da atividade original (RICCIO et al., 1999). Em duas BGLs parietais de *Volvariella volvacea*, o armazenamento a -20 °C por 45 dias resultou na inativação de BGL-I, e na retenção de 20% da atividade de BGL-II. Quando armazenadas a 4 °C pelo mesmo período, BGL-I manteve menos de 5% da atividade original, enquanto que BGL-II manteve 43% da atividade inicial (CAI et al., 1998). BGL extracelular expressa por *Pichia pastoris*, codificada pelo gene *cel1 A* de *Piromyces* sp. E2, não apresentou diminuição na atividade após armazenamento a -20 °C, 4 °C ou temperatura ambiente por 35 dias. Além disso, esta enzima reteve 75% da atividade original após 35 dias de armazenagem a 37 °C (HARHANGI et al., 2002).

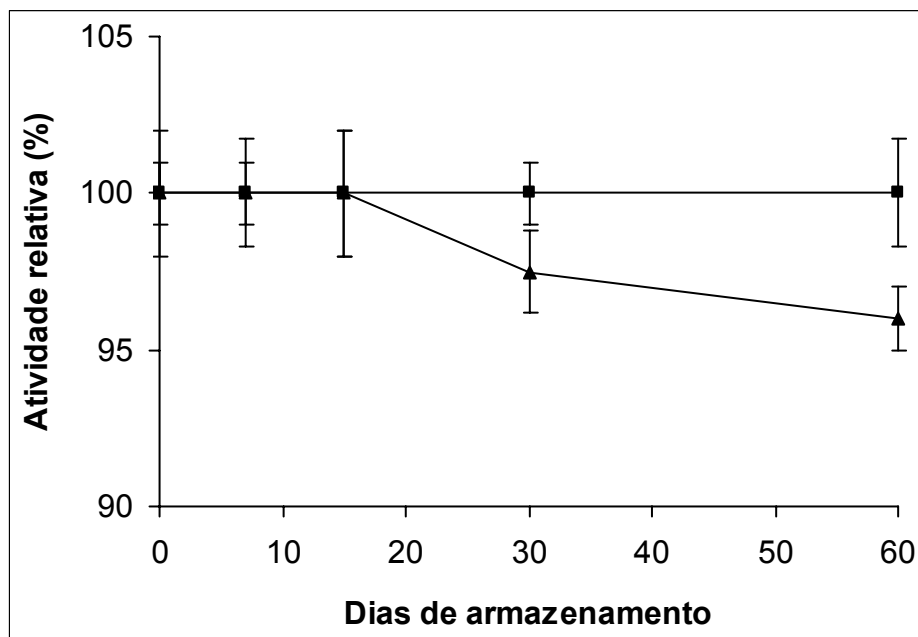


FIGURA 10. Estabilidade da BGL parcialmente purificada após diferentes períodos de armazenamento a 5 °C (■) ou -15 °C (▲). Cada ponto é média de experimentos realizados em triplicata.

4.5.3 Efeito de sais, reagentes, álcoois e carboidratos sobre a atividade enzimática

Estudos de efeitos de sais, reagentes, álcoois e carboidratos sobre a atividade enzimática tornam-se importantes no reconhecimento das condições nas quais a atividade enzimática apresenta-se máxima, visando otimizar o desempenho enzimático em processos específicos através da adição de compostos que estimulem a atividade enzimática, ou através da supressão de compostos que, presentes no meio reacional, possam afetar negativamente a catálise. Carboidratos podem ser produtos finais (ou substratos) de reações

catalisadas por BGLs, e atuar como potenciais inibidores (ou indutores) da reação em bioprocessos.

4.5.3.1 Sais

Entre os sais testados (todos na concentração de 5 mM), KCl, LiCl, NaCl, MnSO₄ e KBr diminuíram levemente (0,5-5%) a atividade enzimática, enquanto que os sais CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, NiCl₂, SrCl₂, ZnSO₄, AlCl₃, KI e NaF estimularam (2,5-9%) levemente a atividade beta-glicolítica (Tabela 9).

Por outro lado, os sais HgCl₂, K₂CrO₄ e K₂Cr₂O₇ afetaram de forma expressiva a atividade enzimática. A presença de HgCl₂ (5 mM) reduziu a atividade β-glicolítica em 85,5%. Da mesma forma, a presença de K₂CrO₄ (5 mM Cr³⁺) ou K₂Cr₂O₇ (10 mM Cr³⁺) diminuiu a atividade em 20 e 51%, respectivamente (Tabela 9).

O efeito de sais (íons) é particular e amplamente variável, dependendo da enzima em estudo. Neste estudo, por exemplo, o íon Cu²⁺ (derivado de CuSO₄) apresentou efeito estimulatório leve (8,5%) sobre a atividade da BGL parcialmente purificada. O mesmo íon estimulou fortemente as enzimas intracelulares BGL A (68%) e BGL B (113%) produzidas por linhagem mutante de *Neurospora crassa* (YAZDI et al., 2003). Entretanto, Cu²⁺ inibiu a atividade da BGL intracelular de *Aureobasidium* sp. (HAYASHI et al., 1999) e da BGL extracelular de *A. oryzae* (RIOU et al., 1998), não apresentando efeito sobre a BGL extracelular de *Trichoderma harzianum* (YUN et al., 2001).

TABELA 9. Efeito de sais sobre a atividade enzimática*

Sal (5 mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100,0
KCl	97,0
LiCl	95,0
NaCl	99,4
CaCl ₂	103,0
CoCl ₂	108,3
CuSO ₄	108,4
FeSO ₄	102,5
HgCl ₂	14,5
MgSO ₄	104,6
MnSO ₄	99,5
NiCl ₂	109,0
SrCl ₂	108,0
ZnSO ₄	106,0
AlCl ₃	106,0
K ₂ Cr ₂ O ₇	49,0
K ₂ CrO ₄	80,0
KBr	96,4
KI	102,5
NaF	103,0

* Experimentos realizados em triplicata.

O efeito inibitório observado com a adição de HgCl₂ (íon Hg²⁺) é geralmente observado em outras BGLs (CHEN et al., 1994; WEI et al., 1996; NAKANO et al., 1998; RIOU et al., 1998; HAYASHI et al., 1999; LUCAS et al., 2000; YAZDI et al., 2003; ZANOELO et al., 2004; LI et al., 2005). O íon Hg²⁺ é

reconhecido agente oxidante de grupos sulfidril (-SH), e a inibição provocada por este íon pode indicar o envolvimento de importantes grupos sulfidril no sítio catalítico da enzima (PAINBENI et al., 1992; GUEGUEN et al., 1995a, 1997b; WEI et al., 1996; NAKANO et al., 1998; OH et al., 1999). No entanto, a inibição observada na presença de Hg^{2+} pode não estar apenas relacionada à ligação deste íon com grupos sulfidril, mas também à interação deste íon com resíduos de triptofano e/ou grupamentos carboxil em aminoácidos da enzima (LUSTERIO et al., 1992).

A presença de cromo, metal não-essencial e altamente tóxico, também afetou negativamente a atividade da BGL parcialmente purificada (Tabela 9). Em leveduras foi demonstrado que o mecanismo de toxicidade do cromo envolveu a oxidação de proteínas (SUMNER et al., 2005). Este íon pode reagir com grupamentos carboxil e sulfidril de enzimas, provocando alterações em suas estruturas e atividades (CERVANTES et al., 2001). Gayatri et al. (2000) relataram que a inibição de colagenase bacteriana por cromo foi devida a mudanças estruturais na enzima. Por outro lado, a presença de íons (incluindo cromo), foi essencial para a atividade de α -manosidase da bactéria hipertermofílica *Thermotoga maritima* (NAKAJIMA et al., 2003).

4.5.3.2 Reagentes

Acetato de sódio, β -mercaptoetanol, SDS, EDTA e azida sódica não afetaram, nas concentrações utilizadas, a atividade da BGL extracelular parcialmente purificada (Tabela 10).

Diversos estudos relatam a ausência de efeito do agente redutor β -mercaptoetanol sobre BGLs (HAN & SRINIVASAN, 1969; CHEN et al., 1994; YAN et al., 1998; KIMURA et al., 1999; OH et al., 1999; LUCAS et al., 2000; YUN et al., 2001).

TABELA 10. Efeito de reagentes sobre a atividade enzimática*

Reagente	Atividade relativa (%)
Controle	100,0
Acetato de sódio (1 mM)	97,5
Acetato de sódio (5 mM)	99,5
Ácido tricloroacético (1 mM)	106,0
Ácido tricloroacético (5 mM)	109,5
β -mercaptoetanol (1 mM)	102,0
β -mercaptoetanol (5 mM)	99,5
EDTA (1 mM)	101,0
EDTA (5 mM)	100,0
EDTA (5 mM) + HgCl ₂ (5 mM)	99,5
Azida sódica (1 mM)	95,5
Azida sódica (5 mM)	99,0
Triton X-100 (0,1% v/v)	105,6
Triton X-100 (0,5% v/v)	103,9
Tween 20 (0,1% v/v)	106,9
Tween 20 (0,5% v/v)	104,2
Tween 80 (0,1% v/v)	102,6
Tween 80 (0,5% v/v)	109,2
SDS (0,1% m/v)	102,6
SDS (0,5% m/v)	100,0

* Experimentos realizados em triplicata.

Segundo Lucas et al. (2000), a inibição provocada por metais oxidantes de grupos sulfidril (como Hg^{2+}), juntamente com a ausência de efeito observada quando da presença de agentes redutores destes grupos (como o β -mercaptoetanol), sugerem que grupos sulfidril não são essenciais para a atividade catalítica. Assim, a inibição provocada por Hg^{2+} pode ser devida à formação não-específica de sais, alternativamente à formação de complexos com aminoácidos específicos contendo grupos sulfidril e/ou a catálise da oxidação destes aminoácidos (LUCAS et al., 2000). Resultados similares foram obtidos por Riou et al. (1998), indicando que os grupos sulfidril podem não estar envolvidos na estrutura do sítio catalítico da enzima, mas ser essenciais para a manutenção da estrutura tridimensional da proteína ativa. Alternativamente, conforme relatado por Lusterio et al. (1992), a inibição provocada por Hg^{2+} pode indicar a presença de importantes resíduos de triptofano e/ou grupamentos carboxil na estrutura da enzima.

Por outro lado, autores relatam que a adição de β -mercaptoetanol estimulou a atividade enzimática (PÉREZ-PONS et al., 1995; WEI et al., 1996; HASHIMOTO et al., 1998). Particularmente, Pérez-Pons et al. (1995) concluíram que a inibição observada na presença de Hg^{2+} e de outros inibidores de grupos sulfidril, juntamente com o aumento da atividade enzimática (5-15%) provocado por agentes redutores (como β -mercaptoetanol) em concentrações de 1 a 50 mM, sugerem a existência de grupos sulfidril essenciais para a atividade enzimática. O aumento da atividade enzimática na presença de β -mercaptoetanol pode ocorrer através da redução de

grupamentos -SH em enzimas que possuem parte destes grupos no estado oxidado (WEI et al., 1996).

O detergente aniônico SDS, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito significativo sobre a atividade da BGL parcialmente purificada, de forma semelhante aos estudos de Kimura et al. (1999) e Bhatia et al. (2005). Efeitos positivos também têm sido relatados (CHEN et al., 1992). Entretanto os efeitos negativos parecem ser mais comuns, e relacionados à desnaturação protéica (WEI et al., 1996; RIOU et al., 1998; YUN et al., 2001; BELANCIC et al., 2003; WALLECHA & MISHRA, 2003; LI et al., 2005).

O EDTA, reagente com a capacidade de quelar íons metálicos, é empregado em diversos testes bioquímicos visando, entre outros, diminuir a ação de proteases em extratos brutos. Entretanto, o EDTA pode tornar-se problemático caso as enzimas em estudo dependam de íons metálicos (MATEO & DI STEFANO, 1997). Nas concentrações utilizadas, este reagente não apresentou efeito sobre a atividade enzimática, similarmente a outros estudos, sugerindo que a atividade β -glicolítica não requer co-fatores metálicos (DRIDER et al., 1993; GUEGUEN et al., 1995a; NAKANO et al., 1998; RIOU et al., 1998; YAN et al., 1998; KIMURA et al., 1999; OH et al., 1999; ZANOELO et al., 2004; LI et al., 2005). De forma distinta, Belancic et al. (2003) relataram a inibição leve (8%) provocada por EDTA sobre BGL de *Debaryomyces vanriijiae*, enquanto que Sánchez-Torres et al. (1998) relataram a inibição moderada (34%) de BGL heteróloga (codificada pelo gene *bglI* de *Candida molischiana*) expressa por *Saccharomyces cerevisiae*. Hashimoto et al. (1998) observaram efeitos opostos em duas BGLs intracelulares heterólogas (BGLA e BGLB)

expressas em *Escherichia coli* (codificadas pelos genes *bglA* e *bglB* de *Bacillus* sp. GL1): enquanto BGLA foi levemente inibida (3,5%), BGLB teve sua atividade estimulada (19%) por EDTA. De maneira semelhante, Iwashita et al. (1998) observaram que EDTA atuou inibindo BGL extracelular (EX-2) e BGL parietal (CB-1) de *A. kawachii* em 21% e 12,9%, respectivamente, mas estimulou levemente (3,5%) a atividade da BGL extracelular EX-1.

A adição de Hg^{2+} (5 mM) e EDTA (5 mM) ao meio reacional não apresentou efeito negativo sobre a atividade enzimática (Tabela 10), indicando a indisponibilização do íon mercúrio através da ação quelante do EDTA. Estes resultados indicam que o EDTA pode ser utilizado com o intuito de diminuir a atuação de enzimas (como metaloproteases), bem como com o propósito de indisponibilizar íons potencialmente nocivos à atividade enzimática, particularmente Hg^{2+} e Cr^{3+} , sem afetar o desempenho da BGL. Similarmente, Sanyal et al. (1988) observaram que a adição de EDTA reverteu o efeito negativo do íon mercúrio sobre BGL extracelular de *A. japonicus*.

A presença de azida sódica, agente preservativo laboratorial, não inibiu a atividade da BGL parcialmente purificada de *M. purpureus* (Tabela 10). Da mesma forma, azida sódica não afetou a atividade de BGLs de *A. japonicus* (SANYAL et al., 1988) e *Alcaligenes faecalis* (HAN & SRINIVASAN, 1969). Entretanto, a adição deste reagente inibiu (6,3-19,6%) a atividade de BGLs produzidas por *A. kawachii* (IWASHITA et al., 1998).

A adição de ácido tricloroacético estimulou levemente (6-9,5%) a atividade enzimática. Da mesma forma, os detergentes não-iônicos Triton X-100, Tween 20 e Tween 80 aumentaram a atividade beta-glicolítica (2,6 a

9,2%) (Tabela 10), provavelmente através do aumento da solubilidade do substrato no meio reacional, facilitando a formação do complexo enzima-substrato. BGL heteróloga expressa em *E. coli*, codificada pelo gene *bgl* de *Volvariella volvacea*, foi estimulada (108%) por Triton X-100 mas não foi afetada por Tween 20 (LI et al., 2005). Contudo, BGL extracelular de *Chalara paradoxa* foi parcialmente inibida em 15% e 40% por Triton X-100 e Tween 80, respectivamente (LUCAS et al., 2000).

4.5.3.3 Álcoois

A inibição por álcoois é tópico de interesse no estudo de BGLs, uma vez que estas podem ser expostas a concentrações substanciais durante diversas aplicações comerciais (LO et al., 1990; SUN & CHENG, 2002). A Figura 11 apresenta o efeito de concentrações (0 a 3 M) de etanol e metanol sobre a atividade enzimática. A atividade observada sem a adição de álcoois foi tomada como 100%.

Observou-se que concentrações de etanol entre 5 e 50 mM estimularam a atividade enzimática em relação ao controle (sem adição de etanol), com a atividade máxima (105%) sendo alcançada na presença de 10 mM de etanol. Em concentrações superiores a 50 mM foi observada queda na atividade enzimática, e na presença 1, 2 e 3 M de etanol a enzima manteve 83,4%, 61,8% e 41,2% da atividade apresentada no controle, respectivamente (Figura 11).

A atividade enzimática foi estimulada em concentrações de 5 mM a 250 mM de metanol, apresentando atividade máxima (106,8%) na presença de

25 mM deste álcool. Com 500 mM de metanol a perda de atividade foi de apenas 1,6%, mantendo entre 92,3 e 63,2% da atividade original em concentrações de 1 a 3 M (Figura 11).

A enzima, portanto, foi levemente estimulada por baixas concentrações de etanol (5-50 mM) e metanol (5-250 mM), e a inibição na atividade enzimática, observada em altas concentrações (até 3 M) destes álcoois, indica que a BGL apresentou estabilidade mais pronunciada frente ao último.

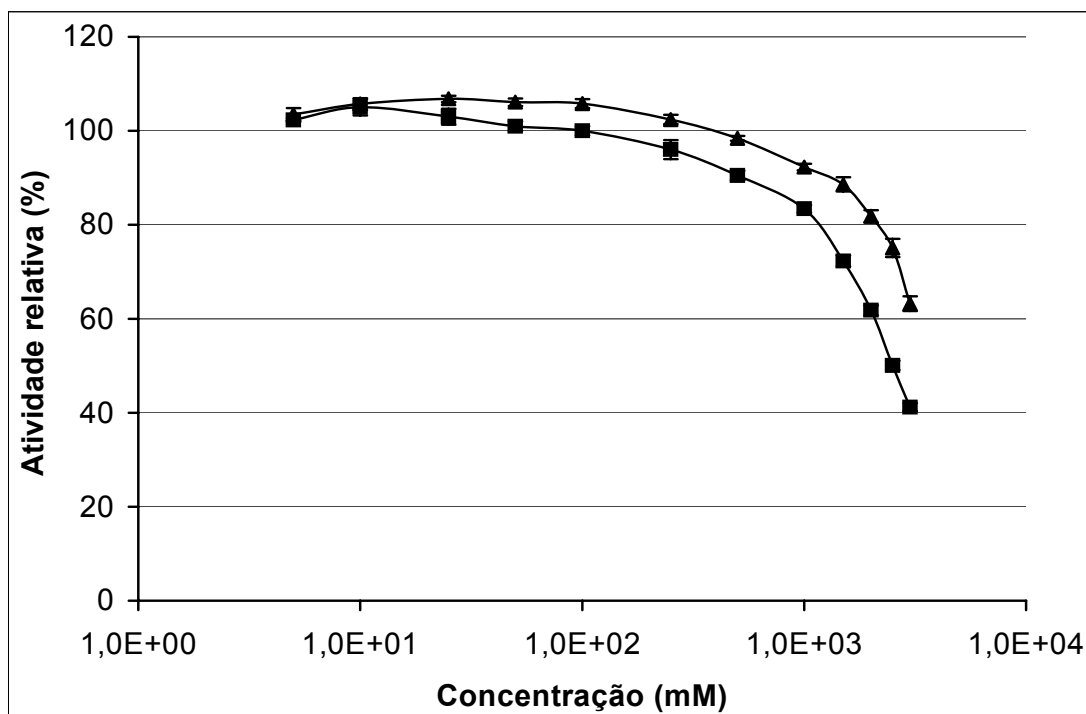


FIGURA 11. Efeito de concentrações de etanol (■) e metanol (▲) sobre a atividade da BGL parcialmente purificada. Experimentos realizados em triplicata.

O aumento da atividade enzimática, observado na presença baixas concentrações de etanol e metanol, pode ser atribuído à atuação da BGL parcialmente purificada como uma β -glicosiltransferase. Estes álcoois podem aumentar as taxas de reação atuando como aceptores preferenciais dos resíduos glicosil durante a catálise enzimática, substituindo a água na reação e dando origem a outros glicosídeos, como etil- e metil-glicosídeos (LO et al., 1990; PÉREZ-PONS et al., 1995; RIOU et al., 1998; YAN et al., 1998; LUCAS et al., 2000; BARBAGALLO et al., 2004a, 2004b). Reações de transferência de resíduos glicosil para diversos aceptores são comuns para a maioria das BGLs. A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, diferindo apenas na natureza do acceptor final (água ou outra molécula, respectivamente) (ZOROV et al., 2001; BHATIA et al., 2002), sendo que álcoois parecem associar-se melhor ao sítio ativo destas enzimas do que a água (KURASHIMA et al., 2003). Por outro lado, o efeito adverso sobre a atividade enzimática, observado na presença de concentrações elevadas destes álcoois, deve-se, provavelmente, a efeitos na estrutura da enzima, ocasionando a desnaturação ou modificações conformacionais devido à alteração na polaridade do meio (GUEGUEN et al., 1995a; PÉREZ-PONS et al., 1995; YAN et al., 1998; GALLIFUOCO et al., 1999; OH et al., 1999; SUN & CHENG, 2002; BARBAGALLO et al., 2004a, 2004b).

A influência de álcoois sobre a atividade de algumas BGLs é extremamente positiva. A atividade da BGL extracelular de *Chalara paradoxa*, por exemplo, aumentou em 197% e 168% na presença de 20% (v/v) de etanol e metanol, e 81% e 58% na presença de 40% (v/v) de metanol e etanol,

respectivamente (LUCAS et al., 2000). Como parâmetro para comparações, 1 M de etanol equivale a 5,8% (v/v), e 1 M de metanol equivale a 4,1% (v/v).

Christakopoulos et al. (1994) observaram que a presença de etanol (1 M), ou metanol (2 M), aumentou em aproximadamente 50% a atividade de BGL extracelular de *Fusarium oxysporum*. Entretanto, concentrações de etanol superiores a 1 M (ou de metanol superiores a 2 M) provocaram inibição da atividade enzimática, que ainda assim permaneceu acima do controle (sem etanol). Resultados similares foram obtidos por Gueguen et al. (1997b). A presença de etanol (20% v/v) estimulou em 51% a atividade de BGL de *A. niger*, e concentrações mais elevadas (até 40% v/v) inibiram a atividade enzimática, que mesmo assim continuou 9% superior à do controle. Metanol (20% v/v) também estimulou a atividade enzimática (80%), e concentrações mais elevadas (30-40% v/v) inibiram a atividade enzimática em 16% a 28% (YAN et al., 1998). A atividade de BGL extracelular de *A. oryzae* foi estimulada (30% e 15%) na presença de 15% (v/v) e 20% (v/v) de etanol, respectivamente (RIOU et al., 1998), e resultados semelhantes foram obtidos por Sánches-Torres et al. (1998).

Em outras BGLs, entretanto, álcoois não estimulam a atividade enzimática, como relatado por Painbeni et al. (1992). Em *Debaryomyces hansenii*, a presença de etanol inibiu a atividade beta-glicolítica extracelular, não sendo observado aumento da atividade enzimática em baixas concentrações de etanol. Com 5% (v/v) de etanol, a enzima manteve 98% da atividade original, e com 10-15% (v/v), concentração prevalente em vinhos, a enzima manteve 64-81% da atividade. Entretanto, 30% (v/v) de etanol

resultaram na inibição de 95% da atividade da enzima (BELANCIC et al., 2003). A atividade de BGL extracelular de *Cladosporium resinae* permaneceu similar ao controle com a adição de até 5% (v/v) de etanol, e o aumento na concentração deste álcool provocou a diminuição da atividade enzimática (OH et al., 1999).

4.5.3.4 Carboidratos

A presença de glicose (10 mM), conhecido inibidor de BGLs (WOODWARD & WISEMAN, 1982; DALE et al., 1985; SARRY e GÜNATA, 2004), reduziu em 58% a atividade enzimática mensurada através da hidrólise de pNP β G, enquanto que a presença de celobiose reduziu a atividade enzimática em 31,5% (Tabela 11). Glicose 6-fosfato e maltose (10 mM) reduziram levemente (12% e 15%, respectivamente) a atividade β -glicolítica, enquanto que outros carboidratos apresentaram apenas efeitos restritos, diminuindo a atividade enzimática entre 0% e 5,5% (Tabela 11).

Neste sentido, BGL extracelular de *Debaryomyces vanrijiae* foi inibida por concentrações de glicose, mantendo 98%, 86% e 78% da atividade inicial na presença de 5, 10 e 450 mM glicose, respectivamente (BELANCIC et al., 2003). Riou et al. (1998) observaram a inibição de BGL de *A. oryzae* por glicose, mas não por frutose, galactose, sacarose, lactose, arabinose e xilose (15% m/v); ainda, celobiose e maltose diminuíram em 50% a atividade enzimática. Segundo Oh et al. (1999), a atividade da BGL extracelular de *Cladosporium resinae* foi inibida por glicose, mas não por galactose, manose, arabinose, frutose e xilose (50 mM), sacarose e lactose (30 mM). Resultados

similares foram obtidos em estudo com *Chalara paradoxa* (LUCAS et al., 2000) e *A. niger* (YAN et al., 1998), sendo que os últimos autores também não observaram inibição por N-acetil-glicosamina.

TABELA 11. Efeito de carboidratos sobre a atividade enzimática*

Carboidrato	Atividade relativa (%)
Controle	100,0
Arabinose (10 mM)	97,5
Fucose (10 mM)	94,5
Xilose (10 mM)	98,5
Frutose (10 mM)	98,5
Galactose (10 mM)	97,0
Glicose (10 mM)	42,0
Manose (10 mM)	95,5
Glicose 6-fosfato (10 mM)	88,0
Manose 6-fosfato (5 mM)	99,0
Ácido glicurônico (10 mM)	97,0
Gliceraldeído (10 mM)	96,0
Metil α -D-glicopiranosídeo (10 mM)	98,0
Metil α -D-manopiranosídeo (10 mM)	98,5
N-acetil galactosamina (10 mM)	97,0
N-acetil glicosamina (10 mM)	97,5
N-acetil glicosamina 6-fosfato (5 mM)	96,0
N-acetil manosamina (10 mM)	97,5
Celobiose (10 mM)	68,5
Lactose (10 mM)	100,0
Maltose (10 mM)	85,0
Sacarose (10 mM)	99,5

* Experimentos realizados em triplicata.

Particularmente, a presença de glicose (100 mM) inibiu a atividade das BGLs EX-1, EX-2 e CB-1 de *A. kawachii* em 91,2%, 89,8% e 91,8%, respectivamente. Maltose e arabinose também inibiram EX-1 (54,1% e 7,1%, respectivamente), EX-2 (53,6% e 8,5%) e CB-1 (62,9% e 17,4%). De forma distinta, galactose, manose e xilose estimularam EX-1 em 0,9%, 13,1% e 15,2%; EX-2 em 4,9%, 5,5% e 24,4%; e CB-1 em 1,5%, 7,3% e 24,1%, respectivamente, enquanto que frutose estimulou EX-1 (9,9%) e EX-2 (11,8%), mas inibiu CB-1 em 1,6% (IWASHITA et al., 1998).

Em outros casos, como relatado por Spiridonov & Wilson (2001), BGL intracelular expressa por *E. coli* (codificada por gene de *Thermobifida fusca*) não foi afetada por glicose (20 mM), galactose, frutose, manose, sacarose, maltose e lactose, enquanto que a presença de xilose inibiu em 33% a hidrólise de pNP β G. De acordo com Hashimoto et al. (1998), as atividades de duas BGLs (A e B) de *Bacillus* sp. GL1, expressas em *Escherichia coli*, não foram afetadas de forma significativa por glicose, fucose, galactose, ácido glicurônico, manose e xilose (10 mM), embora uma tendência de estímulo (1-20%) na atividade das enzimas tenha sido observada.

Em *Scytalidium thermophilum*, a atividade de BGL extracelular foi fortemente estimulada (104% e 91%) por glicose e xilose (50 mM), respectivamente. Os carboidratos arabinose, galactose, manose, maltose, frutose e sacarose não apresentaram efeito, enquanto que celobiose inibiu fortemente (73-79%) a atividade enzimática (ZANOELO et al., 2004). Da

mesma forma, celobiose (25 mM) inibiu em 65% a atividade de BGL de *Neocallimastix frontalis* (LI & CALZA, 1991)

O estímulo ou inibição de BGLs, provocados por carboidratos e etanol, são de particular importância, por exemplo, em processos de vinificação. Em alguns casos a atividade β -glicolítica não é inibida por etanol, mas amplamente reduzida por glicose. Logo, a utilização de enzimas em processos de otimização do aroma pode ser considerada impraticável no mosto mas viável ao final da fermentação, quando o conteúdo de açúcares no vinho é consideravelmente menor, geralmente insuficiente para impossibilitar a utilização deste tratamento (GALLIFUOCO et al., 1999; BARBAGALLO et al., 2004a). Diferentemente, algumas leveduras produzem BGLs que demonstram ser fracamente inibidas por glicose, mas o forte efeito inibitório do etanol restringe sua utilização apenas aos primeiros estágios de fermentação do mosto (MATEO & DI STEFANO, 1997).

4.5.4 Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos

A BGL parcialmente purificada apresentou baixa taxa de hidrólise (0-4%) dos substratos cromogênicos pNP α G, pNP β Xyl, pNP α Xyl, pNP β Fuc, pNP α Fuc, oNP β Gal, pNP α Gal, pNP β Man, pNP α Man, pNPNA β G, pNPNA β Gal, pNPNA α Gal, pNP β AG, pNP β AGal e pNP β Lac, em comparação com a taxa de hidrólise do substrato padrão pNP β G (100%) (Tabela 12).

TABELA 12. Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos cromogênicos*

Substrato (1 mM)	Atividade relativa (%)
pNP-β-D-glicopiranosídeo (substrato padrão)	100,00
pNP-α-D-glicopiranosídeo	2,00
pNP-β-D-xilopiranosídeo	0,45
pNP-α-D-xilopiranosídeo	0,15
pNP-β-D-fucopiranosídeo	0,15
pNP-α-D-fucopiranosídeo	0,25
oNP-β-D-galactopiranosídeo	4,00
pNP-α-D-galactopiranosídeo	2,75
pNP-β-D-manopiranosídeo	0,05
pNP-α-D-manopiranosídeo	0,05
pNP-N-acetil-β-D-glicosaminídeo	4,00
pNP-N-acetil-β-D-galactosaminídeo	2,25
pNP-N-acetil-α-D-galactosaminídeo	0,05
pNP-β-glicuronídeo	ND**
pNP-β-galacturonídeo	0,40
pNP-β-D-celobiosídeo	22,00
pNP-β-D-celotriosídeo	5,90
pNP-β-D-lactopiranosídeo	0,10

* Experimentos realizados em triplicata; ** ND = não detectada

A taxa de hidrólise dos substratos cromogênicos pNPβCb e de pNPβCt foi de 22 e 5,9%, respectivamente, em relação à taxa hidrólise de pNPβG (Tabela 12). Resultados similares foram observados por Christakopoulos et al. (1994), indicando que a velocidade de hidrólise enzimática diminui com o aumento do comprimento da cadeia a ser hidrolisada.

Este fenômeno também foi relatado utilizando oligossacarídeos derivados da celobiose (MCHALE & COUGHLAN, 1981b; WATANABE et al., 1992; PITSON et al., 1997; RIOU et al., 1998; BHATIA et al., 2005). Contudo, resultados distintos foram obtidos por Pérez-Pons et al. (1995), Iwashita et al. (1998) e Harhangi et al. (2002), que observaram o aumento da taxa de hidrólise com o aumento do comprimento da cadeia.

Estudos indicam que a hidrólise de oligossacarídeos por BGLs procede mais eficientemente a partir da extremidade não-redutora destas moléculas. Particularmente, Spiridonov & Wilson (2001) observaram que BGL expressa por *E. coli* hidrolisou o substrato pNP- β -D-celobiosídeo (pNP β Cb), embora não tenha liberado pNP. Lo et al. (1990) e Park et al. (2002) reportaram a liberação imediata de glicose (extremidade não-redutora) e o retardo no aparecimento de pNP (extremidade redutora). Visando esclarecer este mecanismo, ensaios de hidrólise do substrato pNP β Cb foram realizados e tanto a liberação de pNP quanto de glicose foram observadas simultaneamente (Figura 12). Os resultados indicaram que a hidrólise e liberação de glicose da extremidade não-redutora da molécula de pNP β Cb ocorreram de forma mais eficiente do que a liberação de pNP da extremidade redutora. Desta forma, a menor taxa de hidrólise dos substratos pNP β Cb e pNP β Ct, em relação à hidrólise do substrato pNP β G, analisada através da liberação de pNP (Tabela 12), deve-se possivelmente à hidrólise de moléculas de glicose (extremidade não-redutora) preferencialmente à hidrólise de pNP (extremidade redutora).

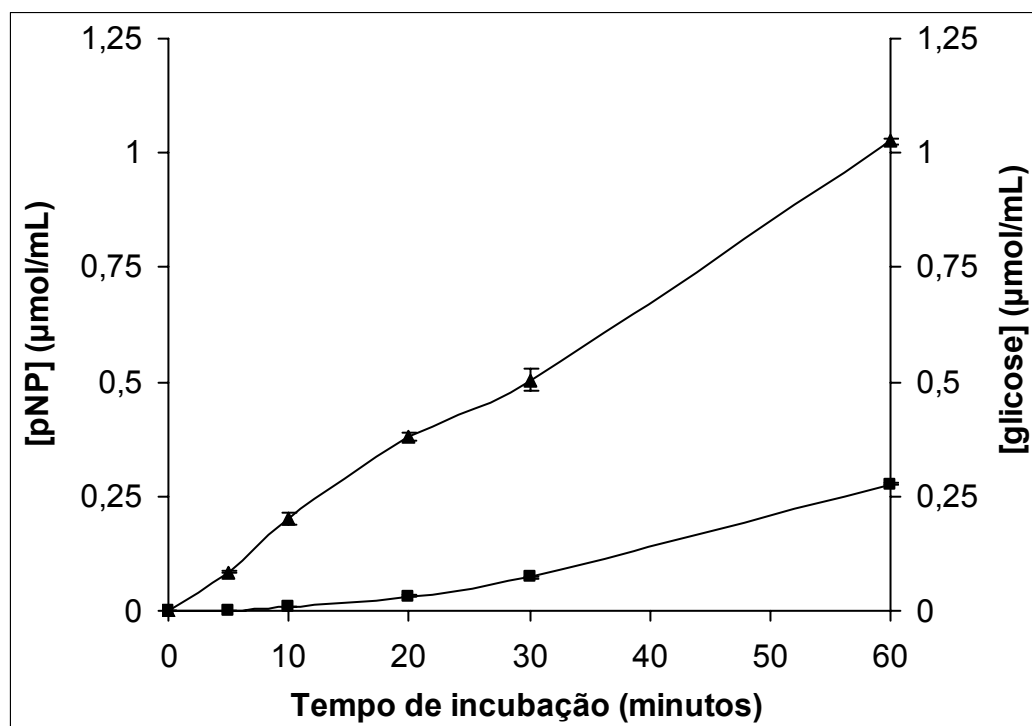


FIGURA 12. Hidrólise do substrato pNPβCb (2 mM) pela BGL parcialmente purificada. (■) liberação de pNP; (▲) liberação de glicose. Pontos representam a média de experimentos realizados em triplicata.

Os resultados dos estudos de especificidade da BGL parcialmente purificada frente a substratos não-cromogênicos são apresentados na Tabela 13. Nas condições de ensaio utilizadas, considerando a taxa de hidrólise de celobiose como padrão (100%), não foi observada hidrólise de esculina, lactose, metil- α -D-glicopiranosídeo, rafinose, sacarose, trealose, amido, CMC e celulose microcristalina. A ausência de atividade sobre sacarose (glicose β - $(1\rightarrow 2)$ frutose) indica que a enzima não possui atividade de invertase (PÉREZ-PONS et al., 1995), enquanto que a ausência de atividade frente aos substratos poliméricos CMC e celulose microcristalina, indica que não há atividade de endoglicanase (LUCAS et al., 2000).

TABELA 13. Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos não-cromogênicos*

Substrato (5 mM)	Atividade relativa (%)
Celobiose (substrato padrão)	100,0
Esculina	ND**
Lactose	ND
Maltose	125,0
Metil- α -D-glicopiranosídeo	ND
n-octil- β -D-glicopiranosídeo	75,0
Rafinose	ND
Sacarose	ND
Salicina	70,0
Trealose	ND
Amido (1 g/L)	ND
Celulose microcristalina (Avicel [®] ; 1 g/L)	ND
CMC (1 g/L)	ND
Xilana (1 g/L)	< 1,0

* Experimentos realizados em triplicata;

** ND = não detectada

Apenas indícios da hidrólise de xilana foram observados (Tabela 13). A resolução do método empregado para a determinação da taxa de hidrólise deste substrato (DNS; Seção 3.6), entretanto, não permitiu a determinação específica da taxa de liberação de açúcares redutores.

A BGL parcialmente purificada hidrolisou salicina e n-octil- β -D-glicopiranosídeo com taxas de hidrólise de 70% e 75%, respectivamente, em relação à taxa de hidrólise de celobiose (100%). A atuação de BGLs sobre

estes substratos é relatada (CAI et al., 1998; HARHANGI et al., 2002; WALLECHA & MISHRA, 2003; MAMMA et al., 2004; VILLENA et al., 2006).

A hidrólise de pNP β G, salicina e n-octil- β -D-glicopiranosídeo demonstra a especificidade da BGL por ligações β -glicosídicas e a tolerância da enzima por uma variedade de agliconas (WATANABE et al., 1992; GUEGUEN et al., 1995a; LUCAS et al., 2000).

Entretanto, surpreendentemente, observou-se maior taxa de hidrólise de maltose (125%), dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose ligadas através de ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 4), do que de celobiose, substrato típico de BGLs, formado por duas moléculas de glicose unidas por ligação β -(1 \rightarrow 4). A hidrólise de ligações β -glicosídicas (pNP β G e celobiose) e α -glicosídicas (principalmente maltose) demonstra a especificidade relaxada da enzima quanto à configuração anomérica das ligações glicosídicas a ser hidrolisadas (GUEGUEN et al., 1995a; PÉREZ-PONS et al., 1995).

A BGL parcialmente purificada também apresentou a capacidade de hidrolisar, embora em menores taxas, resíduos diferentes da glicose, como xilose, galactose, fucose e N-acetil-glicosamina. BGLs podem, freqüentemente, hidrolisar diversos substratos, apresentando atividades de β -galactosidase (WOŁOSOWSKA & SYNOWIECKI, 2004; ZANOELO et al., 2004), β -manosidase (IWASHITA et al., 1998), N-acetil- β -glicosaminidase (LUCAS et al., 2000), β -xilosidase (CAI et al., 1998; WALLECHA e MISHRA, 2003; MAMMA et al., 2004), β -fucosidase (RICCIO et al., 1999; HASHIMOTO et al., 1998), entre outras, bem como hidrolisar ligações de configuração alfa (CHEN et al., 1992;

DRIDER et al., 1993; WEI et al., 1996; CAI et al., 1998; RIOU et al., 1998; MAMMA et al., 2004; LI et al., 2005).

Em comparação com a taxa de hidrólise de pNP β G, a taxa de hidrólise de celobiose foi de 35%. Com base na especificidade em relação a diferentes substratos, as glicosidases podem ser divididas em três grupos: (i) aril- β -glicosidases, que hidrolisam exclusivamente aril- β -glicosídeos; (ii) celobiasas, que hidrolisam somente oligossacarídeos; e (iii) BGLs de ampla especificidade, que demonstram atividade sobre ampla variedade de substratos, e formam o grupo mais comum de BGLs (GUEGUEN et al., 1995a; BHATIA et al., 2002; WALLECHA & MISHRA, 2003). Neste contexto, a BGL extracelular parcialmente purificada de *M. purpureus* NRRL1992 poderia ser enquadrada como uma BGL de ampla especificidade.

4.5.5 Constantes cinéticas

Os efeitos de diferentes concentrações de substratos (pNP β G, celobiose e maltose) na atividade da BGL parcialmente purificada foram estudados nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As hidrólises de pNP β G (0,039-25,0 mM), celobiose (2,5-75,0 mM) e maltose (2,5-75,0 mM) são representadas nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente. No eixo das abscissas é apresentada a concentração de substrato ([S]), enquanto que no eixo das ordenadas é apresentada a velocidade de reação (V). Observou-se que, para os três substratos, a hidrólise obedeceu à cinética de Michaelis-Menten. Em outras palavras, o aumento na

concentração dos substratos fez com que a enzima se aproximasse de seu valor de V_{max} , estágio onde todas as moléculas de enzima estão na forma de complexo enzima-substrato e, assim, o acréscimo de substrato não acarreta o aumento da atividade enzimática (LINEWEAVER & BURK, 1934).

Contudo, observou-se certa inibição da atividade enzimática com o aumento excessivo da concentração dos substratos, fato reportado por outros autores (CHRISTAKOPOULOS et al., 1994; CAI et al., 1998; YAN et al., 1998; WALLECHA & MISHRA, 2003).

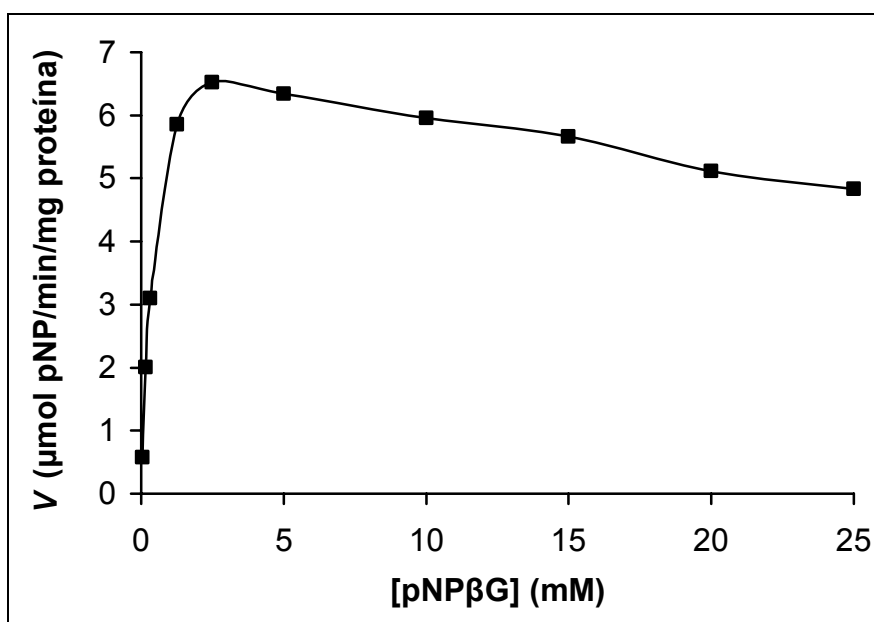


FIGURA 13. Efeito da concentração do substrato pNPβG sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada.

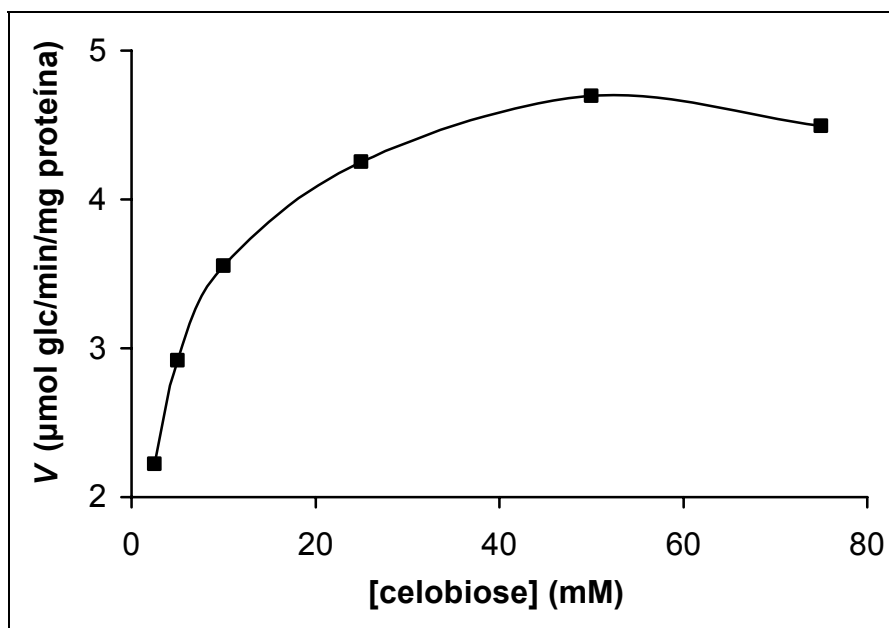


FIGURA 14. Efeito da concentração do substrato celobiose sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada.

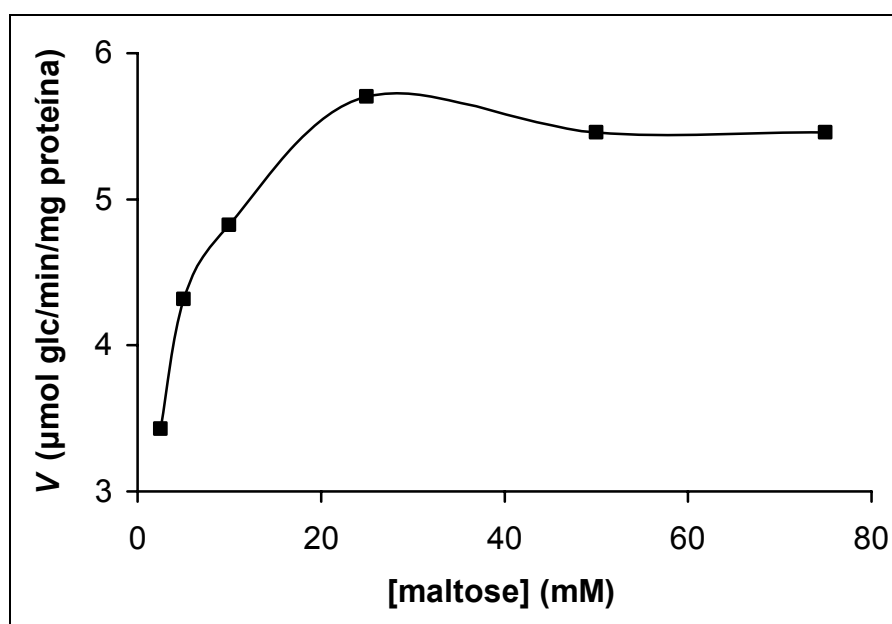


FIGURA 15. Efeito da concentração do substrato maltose sobre a atividade enzimática da BGL parcialmente purificada.

As constantes cinéticas K_m e V_{max} para os três substratos foram determinadas através de análise de Lineweaver-Burk dos dados obtidos (Figuras 13, 14 e 15). Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Constantes cinéticas da BGL de *M. purpureus*

Substrato	K_m (mM)	V_{max} (U/mg proteína)	V_{max}/K_m
pNP β G	0,39	6,51	16,7
Celobiose	2,86	4,71	1,65
Maltose	1,67	5,73	3,43

A constante K_m , característica para diferentes enzimas atuando sobre substratos específicos, é habitualmente relacionada à afinidade enzima-substrato: quanto menor o K_m , maior a afinidade (LINEWEAVER & BURK, 1934; GUEGUEN et al., 1997b; LE TRAON-MASSON & PELLERIN, 1998; MORAIS et al., 2002; SAMOSHINA & SAMOSHIN, 2005). Assim, o menor K_m para o substrato pNP β G (0,39 mM) indica a maior afinidade da enzima por este substrato em relação a celobiose (2,86 mM) e maltose (1,67 mM). Os valores de K_m obtidos neste estudo são intermediários aos resultados reportados para BGLs microbianas (WOODWARD & WISEMAN, 1982; CHEN et al., 1992; WATANABE et al., 1992; PERALTA et al., 1997; CAI et al., 1998; RIOU et al., 1998; YAN et al., 1998; OH et al., 1999; LUCAS et al., 2000; BHATIA et al., 2002; PARK et al., 2002; WALLECHA & MISHRA, 2003).

A eficiência da hidrólise de diferentes substratos foi estimada através da razão V_{\max}/K_m (PERALTA et al., 1997; ZANOELO et al., 2004). O resultado obtido para o substrato pNP β G (16,7), indica que a eficiência da hidrólise deste substrato é dez vezes maior do que a eficiência da hidrólise de celobiose, e aproximadamente cinco vezes maior que a eficiência da hidrólise de maltose.

A inibição da hidrólise do substrato pNP β G foi estudada na presença de concentrações de glicose (0, 10 e 20 mM) (Figura 16) e celobiose (0, 10 e 20 mM) (Figura 17). As constantes cinéticas K_m e V_{\max} , na ausência e presença dos respectivos inibidores, foram obtidas através de análise de Lineweaver-Burk. Nesta análise os dados obtidos foram representados graficamente através de seus valores recíprocos, ou seja, foram construídos gráficos $1/V$ versus $1/[S]$. Os valores de K_m foram calculados a partir do ponto de interseção das retas com o eixo das abscissas (equivalente a $-1/K_m$) e os valores de V_{\max} foram calculados a partir do ponto de interseção das retas com o eixo das ordenadas (equivalente a $1/V_{\max}$) (LINEWEAVER & BURK, 1934).

A presença de glicose ou celobiose provocou aumento no valor de K_m . Este fenômeno é representado pelo aumento na declividade das retas com o aumento na concentração dos inibidores (Figuras 16 e 17). Contudo, o valor de V_{\max} , representado pelo ponto de interseção das retas no eixo das ordenadas, permaneceu inalterado (Figuras 16 e 17). Estes resultados indicam que a inibição da hidrólise de pNP β G pode ser superada com o aumento da concentração do substrato. Logo, a inibição exercida por glicose e celobiose é do tipo competitiva (LINEWEAVER & BURK, 1934; SAHA et al., 1981; SANYAL et al., 1988).

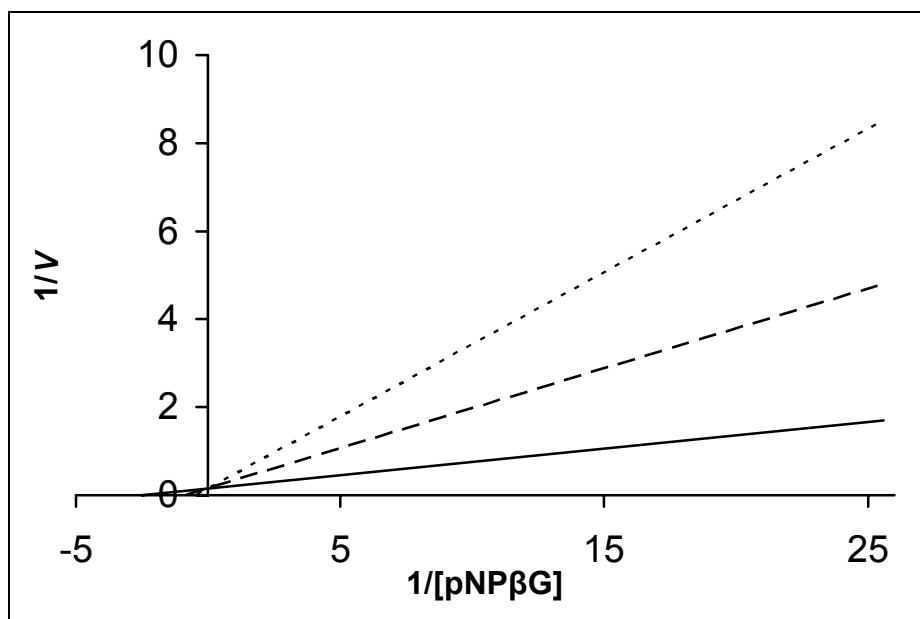


FIGURA 16. Representação de Lineweaver-Burk para a inibição da hidrólise de pNPβG por glicose. Concentrações de glicose: (—) 0 mM, (---) 10 mM e (- - -) 20 mM.

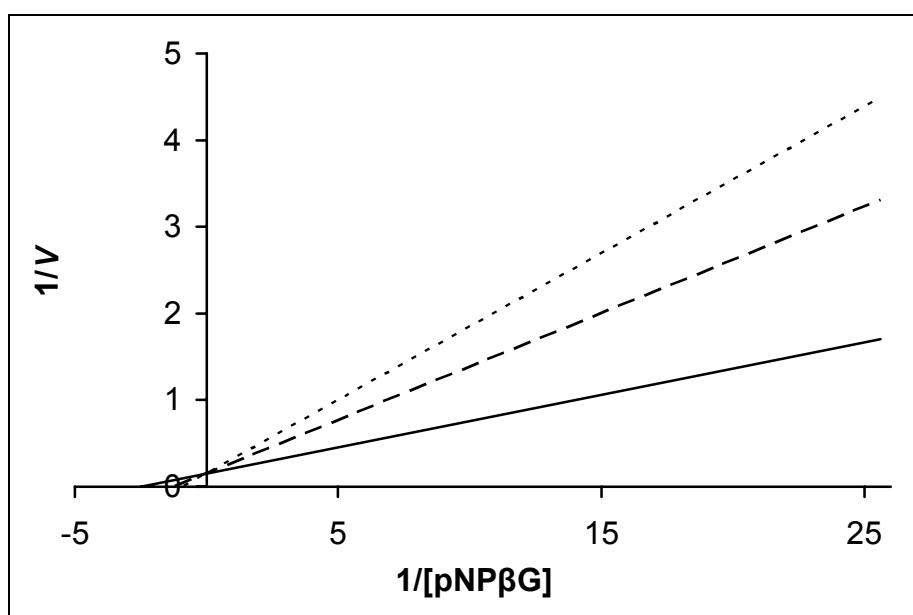


FIGURA 17. Representação de Lineweaver-Burk para a inibição da hidrólise de pNPβG por celobiose. Concentrações de celobiose: (—) 0 mM, (---) 10 mM e (- - -) 20 mM.

As constantes de inibição enzimática (K_i) para glicose e celobiose foram obtidas através da representação gráfica dos valores de K_m/V_{max} na ausência e presença dos respectivos inibidores (SAHA et al., 1981; SANYAL et al., 1988; KAKKAR et al., 1999). No eixo das abscissas são apresentadas as concentrações dos respectivos inibidores, enquanto que no eixo das ordenadas são apresentados os valores de K_m/V_{max} na ausência e presença dos inibidores glicose (Figura 18) e celobiose (Figura 19). O ponto em que a reta intercepta o eixo das abscissas é determinado como o valor negativo de K_i ($-K_i$) (KAKKAR et al., 1999). Assim, os valores de K_i obtidos para glicose e celobiose foram 4,24 mM e 11,51 mM, respectivamente.

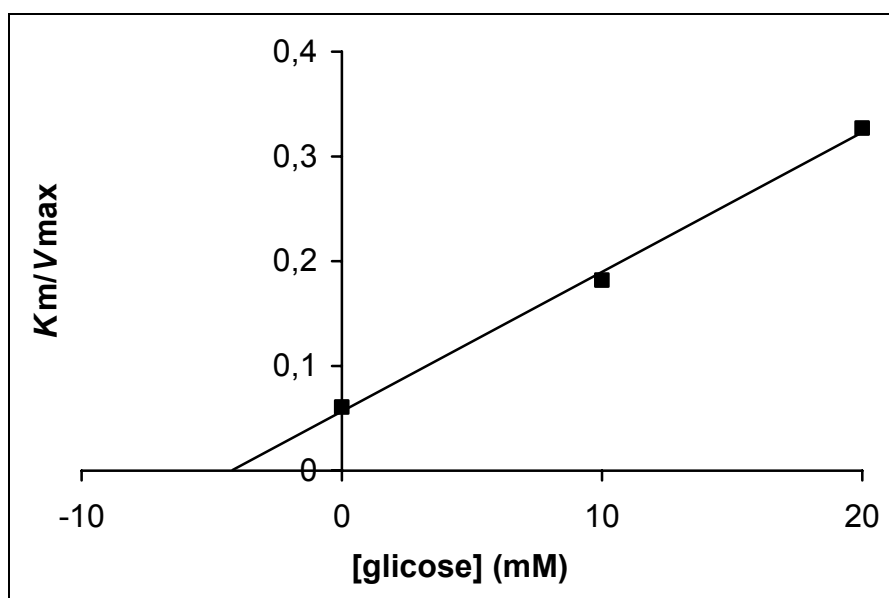


FIGURA 18. Representação dos valores de K_m/V_{max} para o substrato pNP β G (Figura 16) *versus* concentração de glicose.

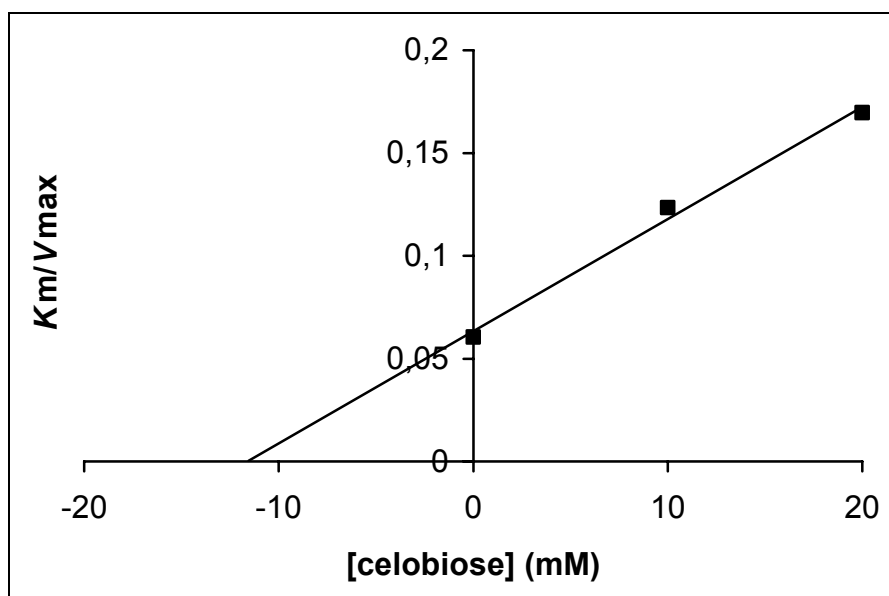


FIGURA 19. Representação dos valores de K_m/V_{max} para o substrato pNP β G (Figura 17) *versus* concentração de celobiose.

A inibição competitiva da hidrólise de pNP β G por glicose, e também celobiose, é comumente observada em BGLs microbianas uma vez que a glicose é produto comum das reações catalisadas por BGLs, enquanto que a celobiose é substrato destas enzimas. Constantes de inibição (K_i) para glicose variam de 0,5 mM a não mais que 100 mM (LO et al., 1990; LI & CALZA, 1991; GUEGUEN et al., 1997b; RIOU et al., 1998; YAN et al., 1998; YANG et al., 2004a; OH et al., 1999; LUCAS et al., 2000; YUN et al., 2001; ZANOELO et al., 2004). Contudo, Riou et al. (1998) relataram K_i de 1,36 M para a BGL de *A. oryzae*, ao passo que Chen et al. (1992) observaram K_i de apenas 189 μ M para BGL de *Trichoderma reesei*. Quanto à inibição competitiva por celobiose, Harhangi et al. (2002) e Zanoelo et al. (2004) observaram valores de K_i iguais a 0,17 mM e 1,32 mM, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

O fungo ascomiceto *M. purpureus* NRRL1992 produziu uma BGL extracelular utilizando resíduos agroindustriais e fontes complexas de nitrogênio como substratos em cultivos submersos. A produção desta enzima demonstrou ser indutível e controlada através de repressão catabólica.

A utilização de resíduo de uva e peptona demonstrou ser a melhor combinação de substratos para este propósito. A interação positiva observada entre estes componentes na produção de BGL é fator a ser explorado no intuito de obter maiores quantidades desta enzima.

O processo de purificação parcial da BGL, envolvendo a precipitação de proteínas do extrato bruto com acetona seguida de etapas de cromatografia líquida de gel-filtração e de interação hidrofóbica, resultou na recuperação de 23% da atividade observada no extrato bruto, sendo alcançado um fator de purificação de 92 vezes.

A BGL parcialmente purificada apresentou atividade ótima em ampla faixa de temperaturas e pHs frente ao substrato pNPβG, sendo selecionadas as condições de 50 °C e pH 5,5. A enzima demonstrou ser moderadamente termoestável, com valores intermediários frente a outras BGLs microbianas.

Os íons Hg^{2+} e Cr^{3+} , nas concentrações utilizadas, inibiram fortemente a atividade β-glicolítica, provavelmente através da oxidação de

grupamentos específicos, promovendo modificações estruturais na enzima. Os reagentes testados – incluindo β -mercaptoetanol, SDS, EDTA e detergentes não-iônicos – não afetaram a atividade enzimática. Os álcoois etanol e metanol, em baixas concentrações, estimularam levemente a BGL, possivelmente devido à atuação da BGL como uma β -glicosiltransferase. O aumento na concentração destes álcoois reduziu a atividade enzimática, provavelmente através de mudanças estruturais e desnaturação da BGL.

A hidrólise de pNP β G, celobiose, salicina, n-octil- β -D-glicopiranosídeo e maltose, entre outros, indica a ampla especificidade da enzima por diferentes substratos. A enzima apresentou maior afinidade e eficiência hidrolítica frente ao substrato sintético pNP β G, seguida por maltose e celobiose. Glicose e celobiose inibiram competitivamente a hidrólise de pNP β G.

De acordo com suas características, a BGL parcialmente purificada parece se adaptar, particularmente, à aplicação em processos de liberação de terpenos e outros compostos aromáticos presentes em vinhos, bem como em processos de liberação de compostos fenólicos antioxidantes em resíduos do processamento de vegetais.

De nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre a produção, purificação e caracterização de uma BGL de *M. purpureus*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; OSMAN, M. Y.; ABDEL-NABY, M. A. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 68, p. 189-196, 1997.
- ADSUL, M. G. et al. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 57, p. 67-72, 2004.
- ADSUL, M. G. et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 62, p. 6-10, 2005.
- AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUYAT, N. A cell wall-bound β -glucosidase from germinated rice: purification and properties. **Phytochemistry**, Oxford, v. 48, p. 49-54, 1998.
- AKIYAMA, K. et al. Production of galactooligosaccharides from lactose using β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 438-441, 2001.
- ANIYA, Y. et al. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. **General Pharmacology**, New York, v. 32, p. 225-231, 1999.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.
- ASHBY, A. M. Biotrophy and the cytokinin conundrum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 147-158, 2000.
- BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BARBAGALLO, R. N. et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, p. 58-66, 2004a.

- BARBAGALLO, R. N. et al. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 292-296, 2004b.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 13, p. 25-58, 1994.
- BELANCIC, A. et al. β -glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 1453-1459, 2003.
- BERGHEM, L. E. R.; PETTERSSON, L. G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 295-305, 1974.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* β -glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 66, p. 527-535, 2005.
- BLANC, P. J. et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, p. 201-213, 1995.
- BOTELLA, C. et al. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 26, p. 100-106, 2005.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER J. S. **Statistics for experiments**. New York: Wiley, 1978.
- BRIMER, L. et al. Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. **Archives of Microbiology**, New York, v. 169, p. 106-112, 1998.

BRZOBOHATY, B. et al. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. **Science**, Washington, v. 262, p. 1051-1054, 1993.

BUSTO, M. D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 949-954, 1995.

BUSTO, M. D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal β -glucosidase. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 441-449, 1997.

CABAROGLU, T. et al. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, p. 581-587, 2003.

CAI, Y. J.; BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, p. 122-129, 1998.

CAMERON, R. G. et al. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 4457-4462, 2001.

CAMPOY, S. et al. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 70, p. 488-496, 2006.

CERVANTES, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 25, p. 335-347, 2001.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate Analysis**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 1-3.

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

CHEN, H.; LI, X.; LJUNGDAHL, L. G. Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 64-70, 1994.

CHIEN, H. L.; HUANG, H. Y.; CHOU, C. C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 772-778, 2006.

CHRISTAKOPOULOS, P. et al. Purification and characterisation of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase

activities from *Fusarium oxysporum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 224, p. 379-385, 1994.

COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, London, v. 2, p. 351-356, 1997.

CORREIA, R. T. P. et al. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2167-2172, 2004a.

CORREIA, R. T. P. et al. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus*-mediated solid-state bioprocessing. **Journal of Food Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 404-418, 2004b.

COULON, S. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 74, p. 105-114, 1998.

DALE, M. P. et al. Reversible inhibitors of β -glucosidase. **Biochemistry**, Washington, v. 24, p. 3530-3539, 1985.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 436, p. 71-75, 1998.

DE-PAULA, E. H.; RAMOS, L. P.; AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 68, p. 35-41, 1999.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 4929-4936, 2000.

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**, New York, v. 55, p. 157-163, 2001.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, p. 577-588, 2001.

- DI BLASI, C.; TANZI, V.; LANZETTA, M. A study on the production of agricultural residues in Italy. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 12, p. 321-331, 1997.
- DORI, S.; SOLEL, Z.; BARASH, I. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 189-198, 1995.
- DRIDER, D. et al. Isolation and characterization of the exocellular β -glucosidase of *Candida cacaoi*: possible use in carbohydrates degradation. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 26, p. 198-204, 1993.
- DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 55, p. 1-33, 1996.
- DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 16, p. 389-406, 2005.
- DULIU, O. G.; FERDES, M.; FERDES, O. S. EPR identification of irradiated *Monascus purpureus* red pigment. **Radiation Physics and Chemistry**, London, v. 57, p. 97-101, 2000.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, Oxford, v. 24, p. 851-874, 2004.
- FABRE, C. E. et al. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 58, p. 1099-1110, 1993.
- FAURE, D. The Family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1485-1490, 2002.
- FERREIRA, A. M.; CLÍMACO, M. C.; FAIA, A. M. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 67-71, 2001.
- FERRER, J. et al. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 76, p. 39-44, 2001.
- FRANCIS, F. et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 15, p. 107-115, 2003.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, p. 618-628, 2002.

GALLIFUOCO, A. et al. On the use of chitosan-immobilized β -glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 163-168, 1998.

GALLIFUOCO, A. et al. Immobilized β -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 179-185, 1999.

GARGOURI, M. et al. Fungus β -glycosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 29, p. 89-94, 2004.

GAYATRI, R.; RAJARAM, R.; RAMASAMI, T. Inhibition of collagenase by Cr(III): its relevance to stabilization of collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1524, p. 228-237, 2000.

GERARDI, C. et al. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, Clare, v. 160, p. 795-805, 2001.

GERMAIN, D. P. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. **Clinical Genetics**, Oxford, v. 65, p. 77-86, 2004.

GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 28, p. 1301-1313, 2002.

GOMES, I. et al. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 53, p. 461-468, 2000.

GONZÁLES-CANDELAS, L. et al. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 3173-3177, 1989.

GRABOWSKI, G. A. et al. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, New York, v. 23, p. 25-55, 1996.

GRACE, M. E. et al. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 2283-2291, 1994.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, p. 233-244, 2005.

GUEGUEN, Y. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, p. 900-906, 1995a.

GUEGUEN, Y. et al. Enzymatic synthesis of dodecil. β -D-glucopyranoside catalyzed by *Candida molischiana* 35M5N β -glucosidase. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 53, p. 263-267, 1995b.

GUEGUEN, Y. et al. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 2336-2340, 1996.

GUEGUEN, Y. et al. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 55, p. 151-156, 1997a.

GUEGUEN, Y. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 469-476, 1997b.

GUMMADI, S. N.; KUMAR, D. S. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 30, p. 130-137, 2006.

GÜNATA, Y. Z. et al. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape components. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 331, p. 83-90, 1985.

GÜNATA, Y. Z. et al. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 184, p. 139-149, 1988.

GÜNATA, Y. Z. et al. Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 1232-1236, 1990.

GÜNATA, Y. Z. et al. Hydrolysis of monoterpenyl- β -D-glucosides by cloned β -glucosidases from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 286-290, 1996.

GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and β -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 13, p. 166-169, 1997.

HAERTER, A. C.; VOEGELE, R. T. A novel β -glucosidase in *Uromyces fabae*: feast or fight? **Current Genetics**, New York, v. 45, p. 96-103, 2004.

HAJJAJ, H. et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, p. 619-625, 2000.

HAN, Y. W.; SRINIVASAN, V. R. Purification and characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 100, p. 1355-1363, 1969.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Grape pomace a novel substrate for microbial production of citric acid. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 7, p. 253-254, 1985.

HANG, Y. D.; LEE, C. Y.; WOODAMS, E. E. Solid-state fermentation of grape pomace for ethanol production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, p. 53-56, 1986.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Apple pomace: a potential substrate for production of β -glucosidase by *Aspergillus nidulans*. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 27, p. 587-589, 1994.

HARHANGI, H. R. et al. A highly expressed family 1 β -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1574, p. 293-303, 2002.

HASHIMOTO, W. et al. Molecular cloning of two genes for β -D-glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and identification of one as a gellan-degrading enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 360, p. 1-9, 1998.

HAYASHI, S. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 22, p. 160-163, 1999.

HAYASHI, S. et al. Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [$^2\text{H}_8$] L-phenylalanine in rose flowers. **Tetrahedron**, Oxford, v. 60, p. 7005-7013, 2004.

HAYS, W. S. et al. Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, p. 34941-34948, 1998.

HECK, J. X. et al. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 107-112, 2005.

HECK, J. X. et al. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, p. 1902-1906, 2006.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, p. 572-584, 2002.

HEMINGWAY, K. M. et al. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 38, p. 283-286, 1999.

HERNÁNDEZ, L. F. et al. β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 171-176, 2003.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, p. 103-112, 1985.

IEMBO, T. et al. Production, characterization, and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 38, p. 549-552, 2002.

INGRAM, L. O.; DORAN, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 16, p. 235-241, 1995.

IRWIN, D. et al. Corn fiber hydrolysis by *Thermobifida fusca* extracellular enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 61, p. 352-358, 2003.

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

IWASHITA, K. et al. The Bgla gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound β -glucosidases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5546-5553, 1999.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 530-535, 2002.

JÄGER, S. et al. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 17, p. 455-461, 2001.

JANBON, G.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Selection and study of a *Candida molischiana* mutant derepressed for β -glucosidase production. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 118, p. 207-211, 1994.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263-268, 2003.

JØRGENSEN, H. et al. Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 109, p. 295-299, 2004.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUNG, H. et al. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 1302-1306, 2003.

JŮZLOVÁ, P. et al. Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, p. 151-153, 1996.

KAKKAR, T.; BOXENBAUM, H.; MAYERSOHN, M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, p. 756-762, 1999.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 539-550, 2000.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KANG, S. W. et al. Over-production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, p. 647-650, 1999.

KANG, S. W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p. 153-156, 2004.

KATAYEVA, I. A. et al. *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, p. 407-412, 1992.

KATO, E.; KUMAGAI, T.; UEDA, M. Concise synthesis of glyconoamidines as affinity ligands for the purification of β -glucosidase involved in control of some

biological events including plant leaf movement. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 46, p. 4865-4869, 2005.

KHALIL, A.I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 18, p. 753-759, 2002.

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

KOBAYASHI, T. et al. Synthesis of alkyl glycosides through β -glucosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, p. 13-21, 2000.

KRAMMER, G. et al. Glycosidically bound aroma components in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 778-781, 1991.

KRISHNA, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 69, p. 231-239, 1999.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 193-196, 2001.

KURASHIMA, K. et al. Enzymatic beta-glycosidation of primary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 26, p. 87-98, 2003.

LAMBERT, N. et al. Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1435, p. 110-116, 1999.

LAU, A. T. Y.; WONG, W. K. R. Purification and characterization of a major secretory cellobiase, Cba2, from *Cellulomonas biazotea*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 23, p. 159-166, 2001.

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

LEAH, R. et al. Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 15789-15797, 1995.

LECAS, M. et al. Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p. 451-454, 1991.

LEE, J. H.; KWON, K. S.; HAH, Y. C. Regulation of β -glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 135, p. 79-84, 1996.

LEI, V.; AMOA-AWUA, W. K. A.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 169-184, 1999.

LEXA, M. et al. Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: a modelling approach. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, p. 585-597, 2003.

LI, X.; CALZA, R. E. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 13, p. 622-628, 1991.

LI, C. et al. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. **Nutrition Research**, Oxford, v. 18, p. 71-81, 1998.

LI, Y. K.; LEE, J. A. Cloning and expression of β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B β -glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 144-150, 1999.

LI, X. et al. Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvariella volvacea*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 1369-1373, 2005.

LIANG, T. W. et al. Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 74-80, 2006.

LINWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 56, p. 658-666, 1934.

LIU, S. Q. A review – Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 589-601, 2002.

LIU, F. et al. Purification and characterization of a new type of serine carboxypeptidase from *Monascus purpureus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 31, p. 23-28, 2004.

LO, A. C.; BARBIER, J. R.; WILLICK, G. E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 192, p. 175-181, 1990.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, R. et al. β -glucosidase from *Chalara paradoxa* CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3698-3703, 2000.

LUSTERIO, D. D. et al. Alkali resistant, alkaline endo-1,4- β -glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, p. 1671-1672, 1992.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAHN, A.; ASENJO, J. A. Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 23, p. 359-368, 2005.

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

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

MANZANARES, P. et al. A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, p. 95-103, 2000.

MARANA, S. R.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physycal properties, substrate specificities and function. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, p. 835-843, 1995.

MARTINO, A. et al. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 281-285, 1996.

MARTINO, A. et al. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 93-102, 2000.

MATEO, J. J.; DI STEFANO, R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 583-591, 1997.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wines. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 557-567, 2000.

MATTHEWS, A. et al. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5715-5731, 2004.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Response surface methodology as an approach to determine the optimal activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes from *Candida Mogii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 70, p. 761-767, 2006.

MCHALE, A.; COUGHLAN, M. P. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Identification of the various components produced during growth on cellulosic media. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 662, p. 145-151, 1981a.

MCHALE, A.; COUGHLAN, M. P. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Purification and characterization of the extracellular and intracellular β -glucosidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 662, p. 152-159, 1981b.

MCMAHON, H. et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, p. 198-203, 1999.

MEYER, A. S.; JEPSEN, A. M.; SØRENSEN, N. S. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2439-2446, 1998.

MOLDES, D. et al. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, p. 491-495, 2003.

MORAIS, H. Liquid chromatographic and electrophoretic characterization of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 770, p. 111-119, 2002.

MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Bioconversion of lignocellulosic waste from selected dumping sites in Dar es Salaam, Tanzania. **Biodegradation**, New York, v. 16, p. 493-499, 2005.

MURRAY, P. et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 beta-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 38, p. 248-257, 2004.

NAGATOMO, H. et al. Preparation and properties of gelatin-immobilized β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, p. 128-136, 2005.

NAKAJIMA, M. et al. Unique metal dependency of cytosolic α -mannosidase from *Thermotoga maritima*, a hyperthermophilic bacterium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 415, p. 87-93, 2003.

NAKANO, H. et al. Purification and characterization of a novel β -glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 85, p. 162-168, 1998.

NAWANI, N. N.; KAPADNIS, B. P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 651-660, 2005.

NEMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 42, p. 29-42, 2003.

NG, T.B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, New York, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

OH, K. B. et al. Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 281-287, 1999.

OKAFOR, P. N. Determination of the hydrolytic activity of *Achatina achatina* β -glucosidase toward some cyanogenic glycosides of some tropical plants. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1579-1582, 2005.

OPARISSI, R. et al. Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**, Clare, v. 165, p. 627-638, 2003.

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

PAAVILAINEN, S.; HELLMAN, J.; KORPELA, T. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans*

subsp. *Alkalophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 927-932, 1993.

PAINBENI, E. et al. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 3087-3091, 1992.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 18, p. 37-45, 2003.

PANDEY, M.; MISHRA, S. Cloning and expression of β -glucosidase gene from the yeast *Pichia etchellsii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, p. 446-453, 1995.

PANINTRARUX, C.; ADACHI, S.; MATSUNO, R. n-Octyl β -D-glucoside synthesis through β -glucosidase catalyzed condensation of glucose and n-octanol in a heterogeneous system with high glucose concentration. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 1, p. 165-172, 1996.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARK, J. K. et al. Molecular cloning and characterization of a unique β -glucosidase from *Vibrio cholerae*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 29555-29560, 2002.

PASTRANA, L. et al. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 333-341, 1995.

PERALTA, R. M. et al. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 146, p. 291-295, 1997.

PÉREZ, A. G. et al. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: Valery and Pequeña Enana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 4393-4397, 1997.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1251, p. 145-153, 1995.

PERUGINO, G. et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, London, v. 22, p. 31-37, 2004.

PESHIN, A.; MATHUR, J. M. S. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 401-404, 1999.

PETRUCIOLLI, M. et al. Production and properties of the linamarase and amygdalase activities of *Penicillium aurantiogriseum* P35. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 805-812, 1999a.

PETRUCIOLLI, M. et al. The linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 302-310, 1999b.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, p. 182-190, 1997.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 679-690, 2002.

POPOVICI, S. T.; SCHOENMAKERS, P. J. Fast size-exclusion chromatography – Theoretical and practical considerations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1099, p. 92-102, 2005.

PRADE, H.; MACKENZIE, L. F.; WITHERS, S. G. Enzymatic synthesis of disaccharides using *Agrobacterium* sp. β -glucosidase. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 305, p. 371-381, 1998.

PYO, Y. H.; LEE, T. C.; LEE, Y. C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, Amsterdam, v. 38, p. 551-559, 2005.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 87, p. 143-159, 2001.

RAJOKA, M. I. Double mutants of *Cellulomonas biazotea* for production of cellulases and hemicellulases following growth on straw of a perennial grass. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, p. 1063-1066, 2005.

RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultures in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 59, p. 21-27, 1997.

RANADIVE, A. S. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 1922-1924, 1992.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v. 5, p. 235-244, 2004.

REUVENI, M. et al. β -glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers. **Plant Science**, Clare, v. 147, p. 19-24, 1999.

RICCIO, P. et al. Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 123-129, 1999.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3607-3614, 1998.

RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M. et al. Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, p. 634-642, 2007.

ROMERO, M. D. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, p. 244-250, 1999.

RONNEBERG, T. A. et al. Limonoid glucoside β -glucosidase activity in lemon seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1305-1307, 1995.

RUIZ-TERÁN, F.; PEREZ-AMADOR, I.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 5207-5209, 2001.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 2, p. 91-102, 1980.

SABATER-VILAR, M.; MAAS, R. F. M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 444, p. 7-16, 1999.

SADDLER, J. N. Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 4, p. 414-418, 1982.

SAHA, S. C. et al. Purification and characterization of two forms of extracellular β -glucosidase from jute pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 662, p. 22-29, 1981.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1871-1876, 2004.

SAMOSHINA, N. M.; SAMOSHIN, V. V. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, p. 239-251, 2005.

SÁNCHEZ-TORRES, P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; RAMÓN, D. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 354-360, 1998.

SANYAL, A. et al. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 2. Purification and characterization of an inducible extracellular β -glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, p. 91-99, 1988.

SANZ-APARICIO, J. et al. Crystal structure of β -Glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: Insights into the catalytic activity in Family 1 glycosyl hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 275, p. 491-502, 1998.

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

SCHIEBER, A; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 12, p. 401-413, 2001.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 20, p. 633-637, 2004.

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

SHOSEYOV, O. et al. Immobilized endo- β -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 1387-1390, 1990.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, p. 469-474, 2000.

SIDDIQUI, K. S. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Cellulomonas biazotea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 13, p. 245-247, 1997.

SOLOV'EVA, I. V. et al. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. **Microbiology**, New York, v. 74, p. 141-146, 2005.

SPAGNA, G. et al. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, p. 63-69, 2000.

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D. B. Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 295-301, 2001.

SRINIVASAN, K. et al. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, p. 153-158, 2001.

STAPLES, R. C.; MAYER, A. M. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 134, p. 1-7, 1995.

SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 155, p. 67-74, 2000.

SUMNER, E. R. et al. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. **Microbiology**, New York, v. 151, p. 1939-1948, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, p. 305-311, 2001.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 10, p. 367-375, 1996.

TAN, Y. H.; WAHAB, M. N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 13, p. 613-617, 1997.

TANG, X. J. et al. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 93, p. 175-181, 2004.

TAPIERO, H. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 200-207, 2002.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 17, p. 110-117, 2001.

THIRUMALE, S.; RANI, D. S.; NAND, K. Control of cellulase formation by trehalose in *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 241-245, 2001.

THYS, R. C. S. et al. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 67-73, 2006.

TSENG, Y. Y.; CHEN, M. T.; LIN, C. F. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 31-37, 2000.

UEDA, M. et al. Leaf-movement factors of nyctinastic plant, *Phyllanthus urinaria* L.; the universal mechanism for the regulation of nyctinastic leaf-movement. **Tetrahedron**, Oxford, v. 55, p. 5781-5792, 1999.

UGLIANO, M.; GENOVESE, A.; MOIO, L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 5073-5078, 2003.

UMIKALSOM, M. S. et al. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 47, p. 590-595, 1997.

VAN POECKE, R. M. P.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 27, p. 1911-1928, 2001.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 367-379, 2003.

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

VILLENA, M. A. et al. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 229-234, 2006.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, p. 829-837, 2004.

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

WANG, S. L. et al. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 337-344, 2002a.

WANG, S. L.; HSIAO, W. J.; CHANG, W. T. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 2249-2255, 2002b.

WANG, Y. Z.; JU, X. L.; ZHOU, Y. G. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 145-148, 2005.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 183-212, 1996.

WATANABE, T. et al. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 209, p. 651-659, 1992.

WEI, D. L. et al. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 297-301, 1996.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p. 31-39, 2004.

WILLIAMS, P. J. et al. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. **Phytochemistry**, Oxford, v. 21, p. 2013-2020, 1982a.

WILLIAMS, P. J. et al. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene β -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 1219-1223, 1982b.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 44, p. 325-337, 2001.

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

WONG, H. C.; KOEHLER, P.E. Production of red water-soluble *Monascus* pigments. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 48, p. 1200-1203, 1983.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -D-glucosidases – their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 4, p. 73-79, 1982.

WU, P. et al. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 170-172, 1991.

WYMER, N.; TOONE, E. J. Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 4, p. 110-119, 2000.

XU, B. J. et al. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, Oxford, v. 17, p. 271-285, 2006.

YAN, T. R.; LIAU, J. C. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, p. 591-594, 1998.

YAN, T. R.; LIN, Y. H.; LIN, C. 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**, Washington, v. 46, p. 431-437, 1998.

YANG, X. et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 78, p. 277-280, 2001.

YANG, L. et al. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 1940-1944, 2004a.

YANG, J. H. et al. Storage stability of monascic acid. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, p. 303-309, 2004b.

YAZDI, M. T.; WOODWARD, J. R.; RADFORD, A. Cellulase production by *Neurospora crassa*: the enzymes of the complex and their regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 116-119, 1990.

YAZDI, M. T. et al. Purification and characterization of two intracellular β -glucosidases from the *Neurospora crassa* mutant cell-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 19, p. 79-84, 2003.

YONGSMITH, B. et al. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 10, p. 263-272, 2000.

YU, C. M.; MUN, S.; WANG, N. H. L. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1132, p. 99-108, 2006.

YUN, S. I. et al. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 2028-2032, 2001.

ZAGROBELNY, M. et al. Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 293-306, 2004.

ZANOELO, F. F. et al. β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 240, p. 137-143, 2004.

ZHAO, H.; GRABOWSKI, G. A. Gaucher disease: perspectives on a prototype lysosomal disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 694-707, 2002.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 895-900, 2000.

ZOROV, I. N. et al. Isolation and properties of cellobiase from *Penicillium verruculosum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 37, p. 587-592, 2001.

VITA

- **Nome:** Daniel Joner Daroit
- **Data e local de nascimento:** 22/12/1979, em Nova Brésia/RS
- **Filiação:** Dario Decio Daroit e Helena Daroit

- **Formação:**
 - **Ensino Fundamental (1986-1993):** Escola Estadual de Ensino Médio Nova Brésia/RS
 - **Ensino Médio (1994-1996):** Escola Estadual de Ensino Médio Nova Brésia/RS
 - **Ensino Superior:**
 - **Graduação (1997-2002):** Licenciatura Plena em Ciências com Habilitação em Biologia (Centro Universitário UNIVATES)
 - **Pós-graduação:**
 - **Especialização (2003-2004):** Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS)
 - **Mestrado (2005-2007):** Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

- **PRODUÇÃO CIENTÍFICA:**
 - 1) **Resumos de trabalhos publicados em anais de eventos:**
 - a) **Título:** Avaliação da creatina quinase em pacientes fenilcetonúricos
Autores: Daroit, D.J.; Martins, S.L.; Wannmacher, C.M.D.; Bedin, M.
Evento: IV Mostra de Ensino, Extensão e Pesquisa (MEEP) do Centro Universitário UNIVATES
 - b) **Título:** Determinação da atividade da creatina quinase em indivíduos com síndrome de Down
Autores: Lopes, S.M.; Daroit, D.J.; Bedin, M.
Evento: IV MEEP do Centro Universitário UNIVATES.
 - c) **Título:** Avaliação da creatina quinase em pacientes fenilcetonúricos
Autores: Daroit, D.J.; Martins, S.L.; Wannmacher, C.M.D.; Bedin, M.
Evento: XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS
 - d) **Título:** Produção, purificação e caracterização de uma beta-glicosidase extracelular de *Monascus purpureus*
Autores: Greca, M.F.; Daroit, D.J.; Hertz, P.F.; Brandelli, A.
Evento: XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS
 - e) **Título:** Produção de uma β -glicosidase extracelular por *Monascus purpureus*
Autores: Simonetti, A.; Daroit, D.J.; Hertz, P.F.; Brandelli, A.
Evento: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS
 - 2) **Artigos aceitos para publicação em periódicos:**
 - a) **Título:** Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates
Autores: Daroit, D.J.; Silveira, S.T.; Hertz, P.F.; Brandelli, A.
Periódico: Process Biochemistry. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.01.012
 - b) **Título:** Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design
Autores: Silveira, S.T.; Daroit, D.J.; Brandelli, A.
Periódico: LWT - Food Science and Technology. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.01.013