



OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES DE β -GLICOSIDASE FÚNGICA

Fernanda Furlan Gonçalves Dias*, Joelise de Alencar Figueira, Hélia Harumi Sato



Lab. de Bioquímica de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos -FEA -Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP

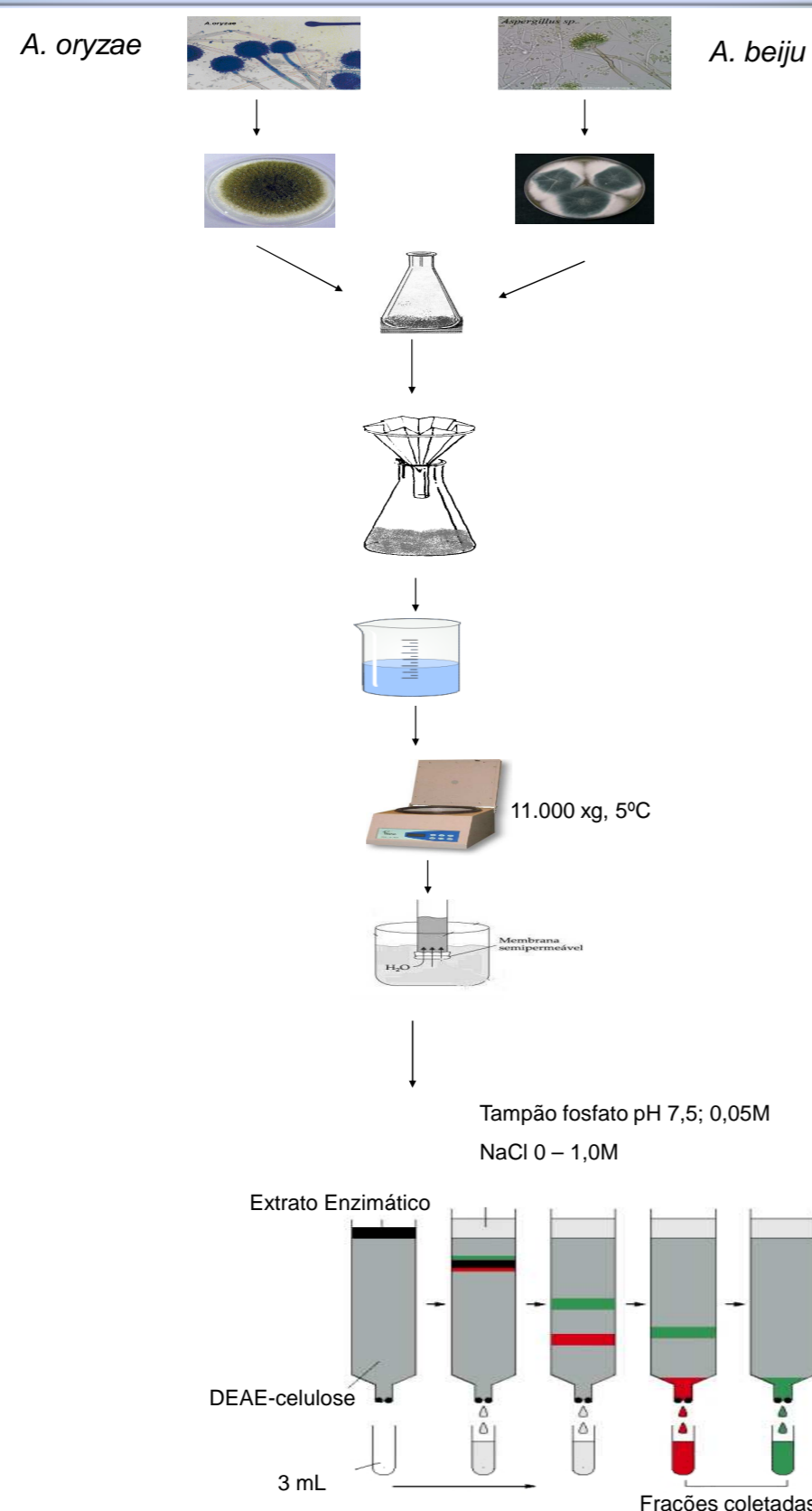
RESUMO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, E.C. 3.2.1.21) hidrolisam ligações β -glicosídicas de dissacarídeos e glicosídeos conjugados. Nos últimos anos tem aumentado o interesse pela β -glicosidase devido ao seu uso potencial em vários processos biotecnológicos. A enzima pode ser aplicada para melhoramento das características organolépticas como a formação de compostos de aroma em vinhos e sucos de frutas, remoção de compostos cianogênicos como amigdalina e prunasina encontrados em maracujá e resíduos de casca e polpa para ração animal, transformação de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas que podem ser utilizadas como fitoestrógeno para reposição hormonal. A β -glicosidase também desempenha um papel crucial na degradação enzimática da celulose e na produção de etanol a partir de resíduos agrícolas celulósicos, hidrolisando celobiose a glicose impedindo assim a inibição da reação pela celobiose. No presente trabalho foram testadas as linhagens fúngicas *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus beiju* para a produção da enzima β -glicosidase, também foi estudada a hidrólise de três diferentes substratos e a inibição da atividade da enzima na presença de glicose. A enzima que apresentou maior atividade e menor inibição da atividade na presença de glicose foi selecionada para a purificação. A enzima foi concentrada e a purificação parcial da β -glicosidase foi realizada em coluna de troca iônica. A linhagem do fungo *A. beiju* apresentou maior produção de β -glicosidase do que a de *Aspergillus oryzae*, ambos os microrganismos apresentaram atividade de hidrólise dos substratos p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (p-NPG), celobiose e amigdalina, sendo que a β -glicosidase de *Aspergillus beiju* apresentou maior atividade de hidrólise de celobiose do que em relação ao substrato sintético p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (p-NPG), enquanto que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* mostrou maior atividade sobre o substrato p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (p-NPG) do que em relação à celobiose. A β -glicosidase de *Aspergillus beiju* apresentou menor inibição da atividade na presença de glicose quando comparada com a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*. A β -glicosidase de *Aspergillus sp beiju* foi purificada cerca de 27 vezes por precipitação com sulfato de amônio 80%. Na cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-celulose foram obtidas 5 frações com atividade de β -glicosidase.

OBJETIVOS

- Produção da enzima β -glicosidase pelos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus beiju*.
- Obtenção de preparações brutas concentradas de β -glicosidase
- Purificação parcial da β -glicosidase selecionada em coluna de troca iônica

MATERIAL E MÉTODOS



CONCLUSÕES

A linhagem de *Aspergillus beiju* produziu maior atividade de β -glicosidase em relação à linhagem de *Aspergillus oryzae* nos três meios de cultivo semi-sólido testados, sendo que a maior atividade foi obtida utilizando-se o meio de cultivo nº1 composto de farelo de trigo + bagaço de cana-de-açúcar.

As β -glicosidases de ambos microrganismos apresentaram atividade de hidrólise dos substratos p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (p-NPG), celobiose e amigdalina.

A atividade de β -glicosidase de *Aspergillus beiju*, utilizando-se o substrato celobiose, apresentou menor inibição da glicose comparada com a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*.

O extrato bruto de β -glicosidase de *Aspergillus sp beiju* foi concentrado 27,7 vezes com rendimento de cerca de 48,2 vezes por precipitação com sulfato de amônio 80%.

Na purificação do extrato bruto concentrado em coluna DEAE-celulose foram obtidas cinco frações com atividade de β -glicosidase.

O extrato dialisado apresentou a maior atividade específica encontrada ao longo da purificação

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As linhagens de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus beiju* apresentaram maior atividade em meio de cultivo semi-sólido nº1 (farelo de trigo + bagaço de cana de açúcar moído) sendo obtido 3,1 U (mmol de p-NP mL⁻¹ min⁻¹) e 0,8 U (mmol de p-NP mL⁻¹ min⁻¹) de β -glicosidase após 144h e 120h respectivamente.

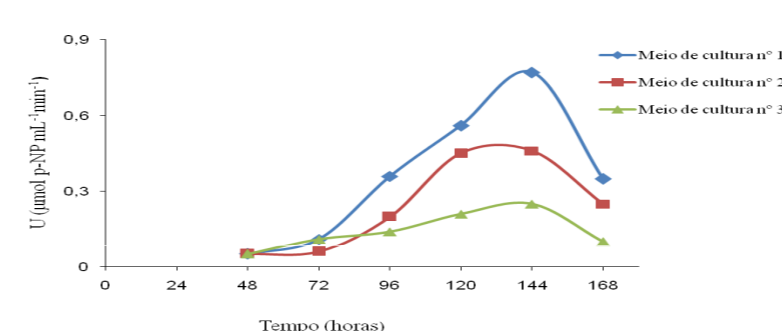


Figura 1. Cinética de produção de β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*

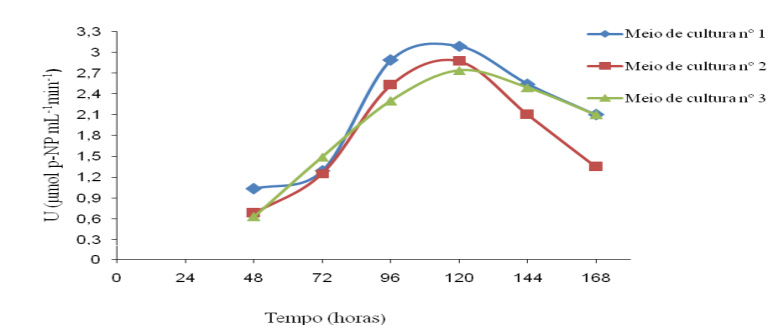


Figura 2. Cinética de produção de β -glicosidase de *Aspergillus beiju*

A β -glicosidase de *Aspergillus beiju*, utilizando-se o substrato celobiose, apresentou menor inibição da atividade na presença de glicose comparada com a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*.

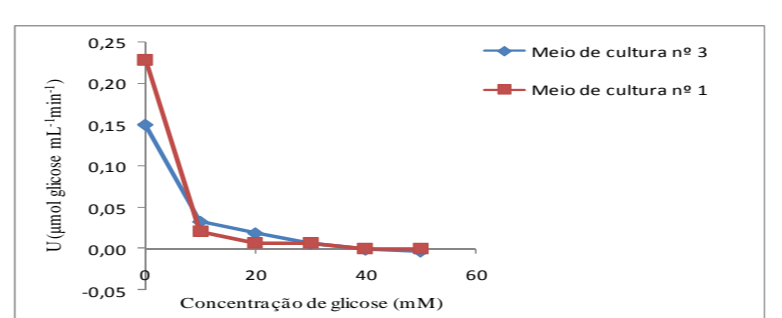


Figura 3. Efeito da concentração de glicose na atividade de β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* utilizando-se o substrato celobiose.

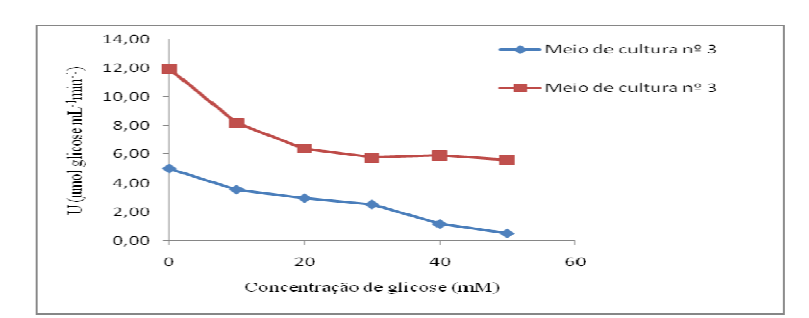


Figura 4. Efeito da concentração de glicose na atividade de β -glicosidase de *Aspergillus beiju* utilizando-se o substrato celobiose.

Na purificação parcial da enzima em coluna de troca iônica DEAE-celulose foram obtidas cinco frações com atividade de β -glicosidase.

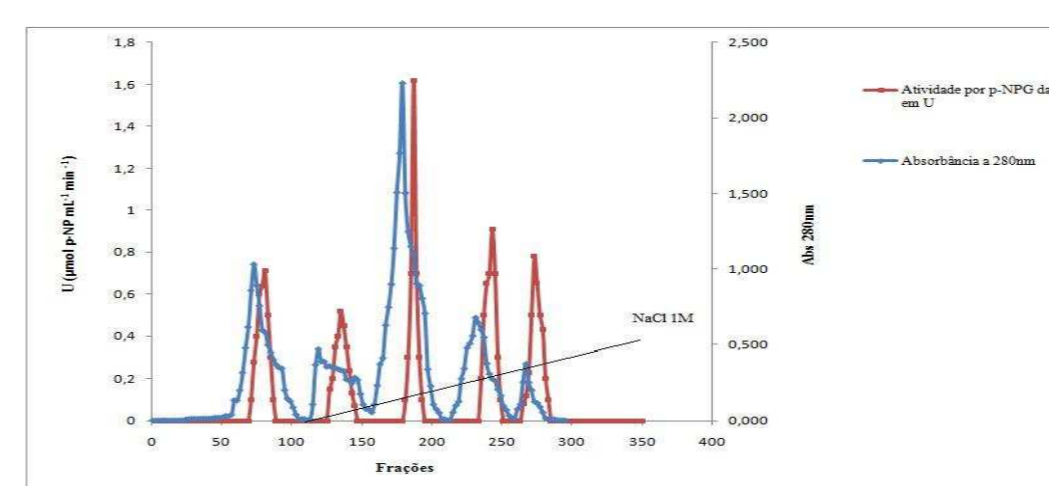


Figura 5. Purificação de β -glicosidase de *Aspergillus sp beiju* em coluna de DEAE-celulose.

Tabela 1. Purificação parcial da β -glicosidase de *Aspergillus sp beiju* por precipitação com sulfato de amônio 80% saturação e cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

Etapas da purificação	Quantidade (ml)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Total (U)	Proteínas Total (mg)	Atividade Específica (U/mg prot.)	Purificação	Rendimento
Extrato bruto	75,00	3,09	3,71	231,75	278,25	0,83	1,0	100,00
Precipitação com sulfato de amônio	6,00	18,64	0,81	111,84	4,86	23,01	27,7	48,2
Cromatografia Pico 1	3,50	0,71	0,07	2,49	0,24	10,14	12,2	1,07
em coluna de DEAE-celulose: Pico 2	3,50	0,52	0,04	1,82	0,14	15,66	15,6	0,007
Pico 3	3,50	1,62	0,25	5,67	0,88	6,48	7,8	2,45
Pico 4	3,50	0,91	0,15	3,19	0,53	6,06	7,3	1,37
Pico 5	3,50	0,78	0,09	2,73	0,32	8,66	10,4	1,18

AGRADECIMENTOS

