WALDECK CAMPANHA DE SOUZA JUNIOR

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1 EM ALGINATO DE CÁLCIO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE GALACTOLIGOSSACARÍDEOS

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho

Ao meu pai, (*in memorian*) Waldeck Campanha de Souza,
À minha mãe, Luzia Luciana de Oliveira,
Aos meus irmãos, Kennya e André,
À minha namorada, Gabriela,
A todos os meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me iluminar e proteger em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Luzia Luciana de Oliveira, pelo amor, carinho, apoio, orações, preocupação, e por sempre me incentivar a continuar meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por possibilitar a realização do curso mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual seria muito difícil a realização desse trabalho.

Agradeço imensamente, à professora Valéria Monteze Guimarães, pela paciência, confiança, apoio e principalmente pela orientação tão importante na realização deste trabalho e na minha formação pessoal e profissional. Muito obrigado.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende pelas aulas de bioquímica na minha graduação, as quais me espiram a buscar mais conhecimento nessa área e conseqüentemente ao mestrado em Bioquímica Agrícola.

A todos os professores com quem estudei, pelos conhecimentos transmitidos, que contribuíram tanto para minha formação profissional como pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial, ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela paciência, amizade e atenção.

Ao Aloísio Nunes Cordeiro, pela concessão dos materiais utilizados durante os experimentos e pela amizade.

Ao Sr. Fausto Sant'Anna pela amizade, paciência e colaboração com o com todos do Laboratório de Enzimologia.

A todos os funcionários do BIOAGRO e professores da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela colaboração.

Ao Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO, onde a maior parte do meu trabalho foi realizado.

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO, onde realizei parte dos meus trabalhos.

Aos amigos Daniel Luciano Falkoski, Angélica Pataro Reis, Pollyanna Amaral Viana e Lílian Silva Fialho pelos ensinamentos, amizade, apoio e pela ajuda na realização deste trabalho. Muito Obrigado.

Às estagiarias Maíra Nicolau de Almeida, Solimar Gonçalves Machado e Juliana Barbosa Coutinho, pela ajuda e contribuição na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Anderson Martins Pilon, Arlindo Inês Teixeira e Pedro Ivo Good God, pelos conselhos, atenção e colaboração.

Aos companheiros de republica Wagner Azis, Gabriel Fonseca e Evandro Neves, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos todos os meus amigos do cicloturismo, pelos momentos de diversão e descontração sobre a Bike.

À Gabriela Santos Cavalcante Santana, pela paciência, amor, carinho, incentivo e principalmente por estar ao meu lado em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins. Muito Obrigado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

Waldeck Campanha de Souza Junior, filho de Waldeck Campanha de Souza e Luzia Luciana de Oliveira, nasceu em Galiléia, Minas Gerais, em 02 de julho de 1975.

Em março de 2003, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em agosto de 2004, iniciou o Curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 26 de fevereiro de 2006, com defesa de tese.

ÍNDICE

Página

RESUMO xi

ABSTRACT xiii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. OBJETIVOS GERAIS 2

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1. A soja como alimento 4

2.2. Oligossacarídeos de rafinose 5

2.3. Mecanismo de ação das α-galactosidases 8

2.4. α-Galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 11

2.5. Permeabilização de células 12

2.6. Imobilização de células 13

2.6.1 Imobilização de células em alginato de cálcio 15

3. MATERIAIS E MÉTODOS 19

3.1. Microrganismo 19

3.2. Manutenção da cultura 19

3.3. Cultivo de *Debaryomyces hansenii* para produção de α-galactosidases 19

3.4. Permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 20

3.4.1. Efeito do tempo de permeabilização das células na atividade de α-galactosidase 20

3.4.2 Efeito da velocidade de agitação, usada durante a permeabilização das células, na atividade de α-galactosidase 20

3.5. Imobilização das células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 21

3.5.1. Efeito da relação célula:alginato na atividade da α-galactosidase intracelular 22

3.5.2. Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato na atividade da α-galactosidase 22

3.5.3. Determinação do diâmetro das esferas 22

3.5.4. Efeito do tempo de incubação no volume das esferas de alginato 22
3.6. Determinação das atividades enzimáticas 23
3.6.1. Atividade de α-galactosidase com o substrato sintético ρNPαGal 23
3.6.2. Atividade de invertase 23
3.7. Caracterização enzimática 24
3.7.1. Efeito do pH 24
3.7.2. Efeito da temperatura 24
3.7.3. Análise de termoestabilidade 25
3.7.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células de *Debaryomyces. hansenii* UFV-1 25
3.8. Ensaio de hidrólise de rafinose com as células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 25
3.8.1. Ensaio de reutilização das esferas de alginato 26
3.9. Hidrólise de RO em leite de soja 26
3.10. Extração de RO 27
3.11. Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

Parte 1: Estudo das condições para Permeabilização e imobilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.1.1. Estudo das condições de permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 30
4.1.1.1. Tempo de permeabilização das células 30
4.1.1.2. Tipo de agitação e eficiência da permeabilização 31
4.1.2. Estudo das condições de imobilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 31

4.1.2.1. Efeito da relação célula:alginato na atividade de α-galactosidase das células imobilizadas 31

4.1.2.2. Efeito do tempo de reticulação na atividade de α-galactosidase e no diâmetro das esferas de alginato..... 33

4.1.2.3. Efeito da imobilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 na atividade da α-galactosidase..... 34

Parte 2: Caracterização da α-galactosidase contida em células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.2. Caracterização enzimática..... 37

4.2.1. Efeito do pH 38

4.2.2. Efeito da temperatura..... 38

4.2.3. Análise da termoestabilidade 39

4.2.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1..... 40

Parte 3: Caracterização da α-galactosidase contida em células imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.3. Caracterização enzimática..... 43

4.3.1. Efeito do pH 43

4.3.2. Efeito da temperatura..... 44

4.3.3. Análise da termoestabilidade 46

4.3.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 48

Parte 4: Hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose pela α-galactosidase contida nas células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.4.1. Hidrólise de rafinose pela α-galactosidase contida nas células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 51

4.4.1.1 Hidrólise de rafinose pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 51

4.4.1.2. Hidrólise de rafinose pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 52

4.4.2. Hidrólise de RO em extrato hidrossolúvel de soja pela α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 55

5. CONCLUSÕES 59

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

RESUMO

SOUZA, Waldeck Campanha Junior, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **Imobilização de células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Co-orientadores: José Humberto de Queiroz, Sebastião Tavares de Rezende e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

O objetivo deste trabalho foi imobilizar, em alginato de cálcio, células permeabilizadas da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 contendo uma α-galactosidase, caracterizar a enzima presente nas células livres e imobilizadas e avaliar o potencial uso das células imobilizadas na hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes no extrato hidrossolúvel de soja. A levedura *D. hansenii* UFV-1 foi cultivada em meio mineral com extrato de levedura (MME), contendo galactose como fonte de carbono, por 36 h, a 30°C. Após este período, o meio foi centrifugado, o sobrenadante descartado e as células de *D. hansenii* UFV-1 contendo a enzima α-galactosidase foram permeabilizadas com etanol 50% e posteriormente imobilizadas em alginato de cálcio. As células permeabilizadas apresentaram diminuição de 20,5 vezes na atividade de α-galactosidase após a imobilização em alginato de cálcio. As maiores atividades de α-galactosidase para as células permeabilizadas foram detectadas em pH 4,5, a 60°C, enquanto que para a enzima contida nas células permeabilizadas e imobilizadas as maiores atividades foram determinadas em pH 4,0 e a 70°C. A enzima contida nas células permeabilizadas manteve 82% da atividade original após pré-incubação a 60°C, por 5 h. A pré-incubação a 60 e 70 °C proporcionaram aumento no valor de atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas, a qual exibiu 157% da atividade original quando pré-incubada por 72 h, a 70°C. O valor da $K_{M\ app}$ da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas, para o substrato ρNPαGal, foi de 0,32 mM, enquanto que, para a enzima contida nas células imobilizadas o $K_{M\ app}$ foi de 0,82 mM. A enzima contida nas células permeabilizadas demonstrou capacidade de hidrólise de

rafinose, reduzindo 96,34% da concentração desse açúcar após incubação por 20 h, a 50^{o}C. A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas reduziu apenas 75,54% do açúcar rafinose, nas mesmas condições. Apesar da menor taxa de hidrólise do açúcar rafinose, em solução, pelas células imobilizadas, estas foram reutilizadas por mais 2 vezes nesse processo, somando 3 utilizações sem perda expressiva da atividade de α-galactosidase. A utilização das células imobilizadas, contendo a α-galactosidase, no tratamento dos RO em leite de soja, proporcionou redução de 100% dos teores de rafinose e estaquiose após incubação a 60^{o}C, por 6 h. Esses resultados mostraram que as células imobilizadas de *D. hansenii* apresentaram potencial para a utilização industrial, no processamento dos RO presentes em produtos derivados de soja.

ABSTRACT

SOUZA, Waldeck Campanha Junior, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2006. **Immobilization of *Debaryomyces hansenii* UFV-1 cells in calcium alginate and its application in galactoligoosaccharides hydrolysis**. Advisor: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisers: José Humberto de Queiroz, Sebastião Tavares de Rezende and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The goal of this work was to immobilize, in calcium alginate, permeabilized cells of the *Debaryomyces hansenii* UFV-1 yeast containing a α-galactosidase, to characterize the enzyme present in the free and immobilized cells and to evaluate the potential use of immobilized cells in the hydrolysis of the raffinose oligosaccharides (RO) present in the soymilk. The *D. hansenii* UFV-1 yeast was cultivated in a mineral medium with yeast extract (MME), containing galactose as carbon source, for 36 hours, at 30 ºC. After this period, the medium was centrifuged, the supernatant was discarded and the *D. hansenii* UFV-1 cells containing the α-galactosidase enzyme were permeabilized with ethanol 50% and later immobilized in calcium alginate. The permeabilized cells presented decrease of 20,5 times in the α-galactosidase activity after the immobilization in calcium alginate. The biggest activities of α-galactosidase to the permeabilized cells was determined in pH 4,5, and 60 ºC, while to the enzyme present in the permeabilized and immobilized cells the biggest activities were determined in pH 4,0, and 70 ºC. The enzyme present in the permeabilized cells kept 82% of its original activity after pre-incubation at 60 ºC, for 5 h. The pre-incubation of immobilized cells at 60 and 70 ºC proportioned an increase in the α-galactosidase activity, which showed 157% of its original activity when it was pre-incubated for 72 h, at 70 ºC. The $K_{M\ app}$ value of the α-galactosidase present in the permeabilized cells, for the substrate ρNPαGal, was 0,32 mM, while, to the enzyme present in the immobilized cells the $K_{M\ app}$ was 0,82 mM. The enzyme present in the permeabilized cells demonstrated capacity of raffinose hydrolysis, reducing 96,34% of this sugar concentration after the incubation for 20 h, at 50 ºC. The α-galactosidase present

in the permeabilized and immobilized cells decreased only 75,54% of the raffinose content, in the same conditions. In spite of the lower hydrolysis rate of the raffinose, in solution, by the immobilized cells, these were reused twice, becoming three uses without an expressive lost in the α-galactosidase activity. The use of the immobilized cells, containing the α-galactosidase, in the treatment of RO in soymilk, proportioned decrease of 100% of the raffinose and stachyose rates after incubation at 60 ºC for 6 h. These results had shown that the immobilized cells of *D. hansenii* had presented potential for the industrial use, in the processing of RO present in soy derived products.

WALDECK CAMPANHA DE SOUZA JUNIOR

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1 EM ALGINATO DE CÁLCIO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE GALACTOLIGOSSACARÍDEOS

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

Aprovada em: 26 de julho de 2006.

Prof. José Humberto de Queiróz (Co-orientador)	Prof. Sebastião Tavares de Rezende (Co-orientador)
Profª. Flávia Maria Lopes Passos	Profª. Tânia Maria Fernandes Salomão

Profª. Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais vem aumentando significativamente a cada ano. Esse aumento é provocado principalmente pela tendência mundial de substituição de processos industriais já estabelecidos por novos, especialmente biotecnológicos, mais específicos, de menor consumo energético e menos agressivos ao ambiente.

As α-galactosidases (α-D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.22) são enzimas que apresentam potencial para aplicação em diversos processos biotecnológicos. Especialmente na indústria de alimentos, esta enzima tem sido indicada para uso na hidrólise de açúcares em produtos derivados de leguminosas.

A soja é uma leguminosa de grande interesse para a indústria de alimentos, devido principalmente ao seu padrão bem balanceado de aminoácidos, constituindo uma ótima fonte de proteína para alimentação tanto de humanos como de animais. Além disso, a soja é uma fonte concentrada de isoflavonas que tem recebido considerada atenção devido ao seu papel relevante na prevenção e no tratamento de câncer e osteoporose.

Apesar de todas estas vantagens, o uso da soja na alimentação de humanos e animais é limitado devido aos fatores antinutricionais presentes, os quais além de diminuir seu valor nutritivo também diminuem a sua aceitação. Os oligossacarídeos de rafinose (RO), principalmente rafinose e estaquiose, possuem em sua estrutura unidades de galactose unidas por ligações α(1-6), as quais necessitam da enzima α-galactosidade para a sua hidrólise. Devido à ausência dessa enzima na mucosa do intestino delgado de humanos e animais monogástricos, os RO passam intactos para o intestino grosso, onde são fermentados anaerobicamente, causando flatulência e perturbação gastrointestinal.

Vários processos são propostos com a finalidade de reduzir ou eliminar os RO nos produtos derivados de soja. No entanto, a hidrólise enzimática utilizando α-galactosidases tem demonstrado ser o processo mais promissor.

Estudos com a levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 têm demonstrado a sua capacidade de produção de α-galactosidases tanto intra como extracelulares, em quantidade e com alta especificidade para a hidrólise dos RO em produtos a base de soja. Esta característica torna esta levedura de grande interesse para a indústria

alimentícia, para o uso em processamento de alimentos a base de soja. Além de ser uma boa produtora de α-galactosidases, não é patogênica, sendo normalmente encontrada em diversos alimentos industrializados como, salsichas e queijos.

Embora a hidrólise dos oligossacarídeos no leite de soja seja alcançada satisfatoriamente usando a enzima pura, este método tem um custo elevado, pois os processos de purificação são trabalhosos e caros, e também devido ao fato de que a enzima permanece no produto final e não pode ser reutilizada.

Uma alternativa para resolver estes problemas é a imobilização de células que contenham a enzima de interesse. Após imobilização, as enzimas intracelulares continuam ativas e podem agir sobre seus substratos, com a vantagem de não haver custos com extração e purificação, além de permitir a reutilização.

Assim, a imobilização de células de *D. hansenii* UFV-1, que não é patogênica e possui uma α-galactosidase intracelular, poderia ser uma alternativa promissora e econômica para melhorar a qualidade alimentícia dos produtos de soja, através da hidrólise dos RO.

1.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi permeabilizar e imobilizar as células de *D. hansenii* UFV-1, contendo a α-galactosidase intracelular, em alginato de cálcio e estudar o potencial da utilização desse processo na redução dos oligossacarídeos de rafinose em leite de soja.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições para permeabilização e imobilização das células de *D. hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio.

- Caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima contida nas células permeabilizadas livres e imobilizadas (efeito de pH, temperatura,

termoestabilidade, determinação dos valores de $K_{M\ app}$ para o substrato sintético ρNPαGal).

- Avaliar o potencial das células permeabilizadas e imobilizadas na hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose presentes no leite de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A soja como alimento

As leguminosas têm um papel importante na alimentação em várias regiões do mundo devido ao fato de serem uma fonte de proteínas, fibras e uma variedade de outros micronutrientes (MESSINA, 1999).

A soja (*Glycine max* L.) é uma espécie da família das leguminosas, de origem Chinesa, que é utilizada em todo o mundo como fonte de alimento. Devido ao seu padrão bem balanceado de aminoácidos (SMITH; CIRCLE, 1972) constituindo uma ótima fonte de proteínas para nutrição humana e animal (GITZELMANN; AURICCHIO, 1965). O grão de soja apresenta em sua constituição 30 a 45% de proteínas, 20 a 35% de carboidratos, cerca de 5% de cinzas e um elevado teor de lipídeos variando de 15 a 25% (MOREIRA, 1999). A soja é rica em minerais como magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco, potássio (MONTEIRO, 2000) e uma fonte concentrada de isoflavonas que tem recebido considerada atenção para o seu potencial papel na prevenção e no tratamento de câncer e osteoporose (MESSINA, 1999).

Os produtos alimentícios a base de soja são suplementos promissores para a contribuição na redução dos problemas de desnutrição do mundo devido às suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas as regiões, alta produtividade e facilidade de cultivo (BELLAVER; SNIZEK, 1999).

O leite de soja é um produto rico em proteínas de alta qualidade, não contém colesterol e lactose (DESJARDINS *et al.*, 1990) e pode ser comparado ao leite de vaca em relação ao conteúdo de proteínas e gorduras (MOREIRA, 1999). É um substituto nutritivo para o leite de origem animal podendo ser utilizado como suplemento para pessoas, principalmente crianças, intolerantes a lactose (KHARE *et al.*, 1994). Além disso, também serve como matéria-prima para a produção de uma variedade de bebidas e alimentos ricos em proteína (SMITH; CIRCLE, 1972). Adicionalmente, devido à alta produção de soja nos países tropicais, sua utilização na alimentação dos animais, como suínos na fase de aleitamento representa uma alternativa econômica bastante atrativa (DUFFUS; SLAUGHTER, 1980).

No Brasil, o óleo de soja representa acima de 50% de todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999). A fração de óleo é utilizada, também, na indústria de alimentos para produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos. Aproximadamente 83% da produção mundial de soja são utilizadas para extração de óleo destinado, principalmente ao consumo humano, sendo o farelo resultante utilizado na fabricação de ração animal (LIMA; ANGNES, 1999).

2.2. Oligossacarídeos de rafinose

Apesar de ser um excelente alimento, a soja tem seu uso limitado devido ao fato de possuir compostos antinutricionais que diminuem seu valor nutritivo e a sua ampla aceitação (STEGGERDA *et al.,* 1974). Como exemplo de alguns destes compostos temos os inibidores de protease, lipoxigenase, taninos, lectinas e os oligossacarídeos de rafinose (BIRK, 1996).

Um fator antinutricional muito importante encontrado em produtos a base de soja são os oligossacarídeos de rafinose (RO) principalmente rafinose [α-D-galactopiranosil-(1,6)-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosideo] e estaquiose [α-D-galactopiranosil-(1,6)-α-D-galactopiranosil-(1,6)-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosideo] (GITZELMANN; AURICCHIO, 1965) (Figura 1). Os RO também conhecidos como α-galactosidios ou galacto-oligossacarídeos são amplamente distribuídos no reino vegetal. Grandes quantidades destes RO são encontradas nas partes superiores das plantas onde executam funções fisiológicas de proteção (DEY, 1985; HORBOWICZ; OBENDORF, 1994; KUO *et al.,* 1988, LARSSON *et al.,* 1993). Em leguminosas, os RO são acumulados durante o desenvolvimento e a maturação das sementes (FRÍAS *et al.,* 1996a; LOWELL; KUO, 1989) e funcionam como reserva de carbono para uso durante a germinação (DEY, 1990; FRÍAS *et al.,* 1996b).

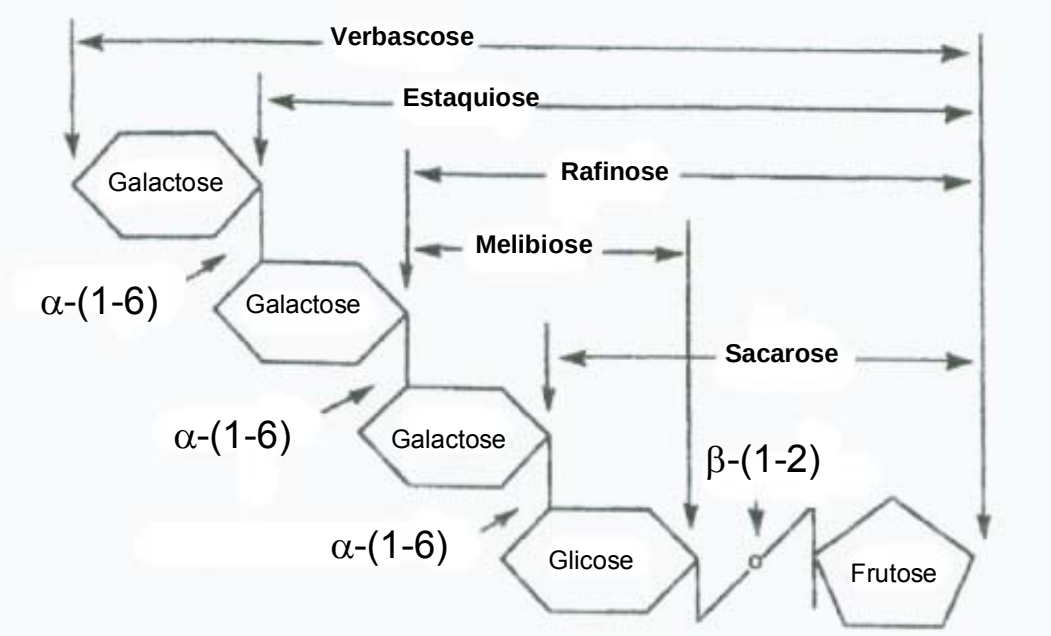

Figura 1 – Estruturas dos oligossacarídeos de rafinose.

A mucosa do intestino delgado de humanos e de outros animais monogástricos não produz α-1,6-galactosidases, enzimas necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. Desta forma, estes RO passam intactos para o intestino grosso, onde são fermentados por bactérias anaeróbias resultando na liberação de grandes quantidades de gases, como CO_2, H_2 e CH_4, causando flatulência, que está associada com cólicas, diarréia, dispepsia e constipação (STEGGERDA; DIMMICK, 1966; SUAREZ *et al*., 1999).

A biosíntese dos RO começa com a reação de formação do galactinol (*O*-α-D-galactopiranosil-(1→1)-L-mio-inositol) catalisada pela enzima galactinol sintase (EC 2.4.1.123) que promove a transferência do galactosil do UDP-galactose para mio-inositol (PETERBAUER; RICHTER, 2001). Em sucessão, a rafinose sintase (EC 2.4.1.123) catalisa a transferência do resíduo de galactosil do galactinol para sacarose, formando rafinose e mio-inositol (PETERBAUER *et al*., 2002). Em outra reação, a rafinose recebe outro galactosil por meio da reação catalisada pela estaquiose sintase (EC, 2.4.1.67), formando estaquiose (PETERBAUER; RICHTER, 1998) (Figura 2).

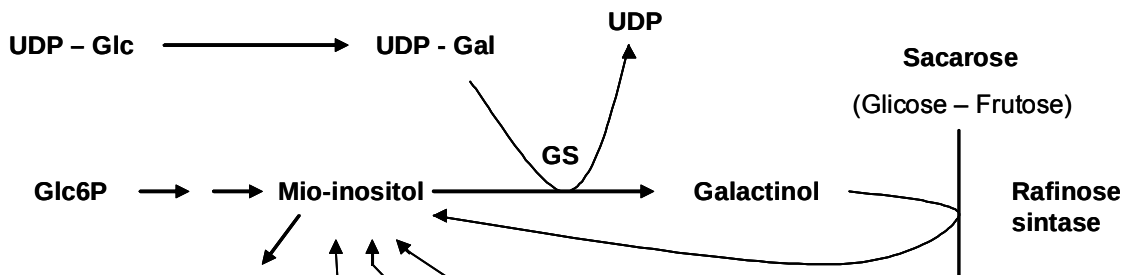

Figura 2 – Esquema da via metabólica de síntese dos RO: UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose 6 fosfato; GS: galactinol sintase.

É sugerido que o bloqueio da expressão do gene da galactinol sintase que codifica para a enzima fundamental na rota de síntese dos RO em sementes, poderia diminuir o conteúdo destes RO, reduzindo assim a flatulência causada por leguminosas (DE LUMEN, 1992).

> Por outro lado, várias pesquisas sugerem que a conversão enzimática dos RO presentes em derivados de soja pode ser uma estratégia mais eficiente para reduzir estes RO e aumentar o valor nutricional destes produtos (CRUZ; PARK, 1982; GUIMARÃES *et al*., 2001; THIPPESWAMY; MULIMANI, 2002; PRASHANTH; MULIMANI, 2004; VIANA, 2005).

A hidrólise dos RO pode ser catalisada pelas α-galactosidases (α-D-galactosídeo galactohidrolase; EC 3.2.1.22) e invertases (β-D-frutofuranosidase; EC 3.2.1.26) ou ambas. As α-galactosidases hidrolisam ligações α-1,6 produzindo galactose e sacarose e, as invertases hidrolisam ligações β-1,2, produzindo melibiose e frutose ou glicose e frutose.

2.3. Mecanismo de ação das α-galactosidases

A α-galactosidase é uma hexoglicosidase que catalisa a hidrólise de ligações α-1-2, α-1-3, α-1-4, α-1,6 de resíduos de α-galactosídeos em oligossacarídeos simples como estaquiose, rafinose e melibiose, em polissacarídeos como galactomananas e em substratos sintéticos como, ρNPαGal (ADEMARK *et al*., 2001).

Estudos de modificação química da α-galactosidase de côco, realizados por Mathew e Balasubramaniam (1987), indicaram a presença de dois grupos carboxil, tirosina e triptofano no sítio ativo da enzima, ou próximo dele. Estudando o efeito do pH nos valores dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max}, estes autores observaram que os grupos dissociáveis no sítio ativo da enzima apresentavam valores de pK_a de 3,8 e 6,5 e estariam envolvidos na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e um desses grupos, estaria envolvido diretamente na catálise. O grupo com pK_a de 3,8 seria um grupo carboxil (pK_a 3,0-4,7), requerido como um grupo $–COO^-$ para a catálise. O grupo com pK_a de 6,5 seria um grupo carboxil perturbado, devido ao ambiente hidrofóbico produzido pela presença de resíduos de triptofano e tirosina em sua vizinhança. Com base em experimentos de modificação química e nos resultados de estudos cinéticos, Mathew e Balasubramaniam (1987) propuseram o mecanismo de ação para a α-galactosidase (Figura 3).

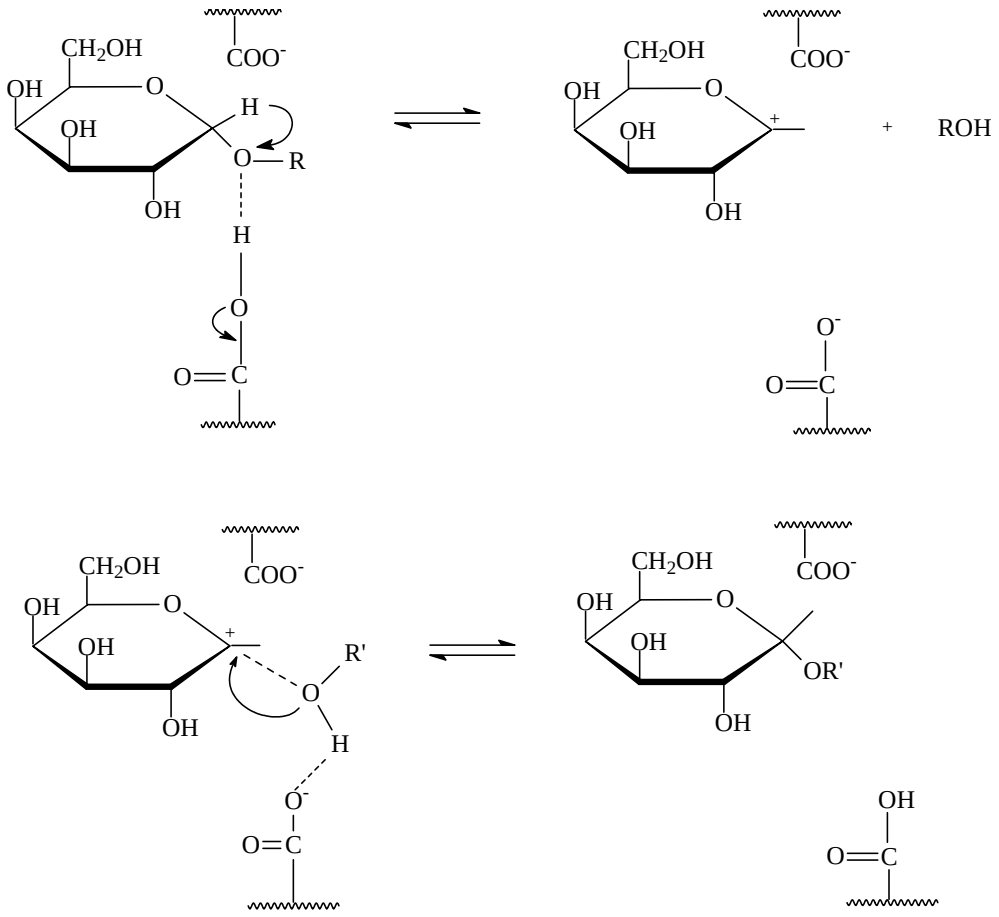

Figura 3 – Mecanismo de ação para α-galactosidase de côco sugerido por Mathew e Balasubramaniam, 1987.

No mecanismo de ação proposto para a α-galactosidase, o grupo com pK_a de 3,8 é um grupo carboxil presente na forma ionizada para estabilizar um carbocátion intermediário e a presença deste grupo ionizado protege o carbocátion do ataque direcionado por um nucleófilo, permitindo que o produto retenha a mesma configuração anomérica do substrato. O grupo com pK_a de 6,5 é um grupo carboxílico perturbado que está presente na forma protonada e está envolvido na doação de um próton.

Recentemente, Fujimoto *et al.* (2003) determinaram a estrutura tridimensional da α-galactosidase de arroz através de estudos de cristalografia. A estrutura da α-galactosidase de arroz demonstrou possuir um domínio catalítico e um domínio C-terminal que são essencialmente iguais aos possuídos pela α-N-acetilgalactosaminidase, a qual, também, é membro da mesma família das glicosil hidrolases, a família 27. O modelo final para a α-galactosidase de arroz consiste

de uma única cadeia de 362 resíduos de aminoácidos com domínio catalítico (1-278) com estrutura em $(\beta/\alpha)_8$-barril e o domínio C-terminal (279-362), constituído de 8 folhas β, contendo um motivo chave-grega e duas pontes de dissulfeto situadas próximo ao bolso catalítico (Figura 4).

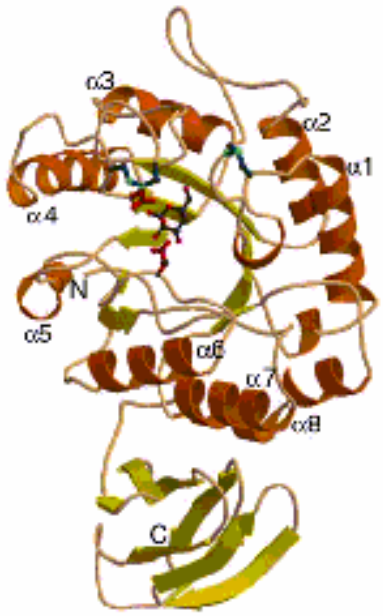

Figura 4 – Vista tridimensional da fita-modelo da α-galactosidase de arroz. A D-galactose ligada, os dois resíduos catalíticos e duas ligações de sulfito estão mostrados em preto, vermelho e verde, respectivamente (FUJIMOTO *et al.*, 2003).

A cristalização da α-galactosidase de arroz complexada com D-galactose e a posterior resolução da estrutura complexada, permitiram os estudos do modo de ligação da enzima ao substrato. A molécula de D-galactose se liga na fenda do sítio ativo no lado C-terminal do β-barril central do domínio catalítico. Os resíduos catalíticos encontrados na α-galactosidase de arroz foram dois resíduos de ácidos aspárticos, Asp-130 localizado no final da fita *β*4, e Asp-185 depois da fita *β*6. Como previamente proposto (GARMAN *et al.*, 2002), a catálise destas enzimas parece envolver um mecanismo de duplo-deslocamento e o Asp-185 teria função de catalisador acido/base e Asp-130 atuaria como um nucleófilo. Além dos resíduos catalíticos, outros resíduos faziam contato hidrofílicos e hidrofóbicos com o substrato. O Trp-164, Arg-181, Cys-162, Lys-128, Asp-51, Asp-52 e também

Asp-185 foram encontrados fazendo pontes de hidrogênio com a molécula de galactose. Além disso, contatos hidrofóbicos foram observados para os resíduos Trp-16, Cys-101 e Met-217 (FUJIMOTO *et al.*, 2003).

2.4. α-Galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

D. hansenii é uma levedura halotolerante freqüentemente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas como, salsichas e queijos (COOK, 1995; ENCINAS *et al*., 2000; PETERSEN *et al*., 2002; BINTSIS *et al*., 2003), onde contribui para o desenvolvimento do "flavor" devido as suas atividades lipolítica e proteolítica (COOK, 1995; DURÁ *et al*., 2002; OLENSEN; STAHNKE, 2000; SORENSEN; SAMUELSEN, 1996) e, também, na regulação da acidez por assimilação de ácido láctico (ELIKASES-LECHNER; GINIZINGER, 1995; JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

Nos dias atuais, tem crescido o interesse na fisiologia, bioquímica e nos aspectos genéticos de *D. hansenii* devido ao impacto na indústria de fermentações (NOBRE *et al*., 1999; LÉPINGLE *et a*l., 2000; STRAUSS *et al*., 2001; BOLUMAR *et al*., 2003 a,b).

Viana (2005) determinou as condições ideais para produção de α-galactosidases por *D. hansenii* UFV-1*,* purificou e caracterizou estas enzimas. Segundo o autor, em meio contendo galactose como fonte de carbono, *D. hansenii* UFV-1 produzia duas α-galactosidases: uma intracelular e outra extracelular, com alta termoestabilidade, pH ótimo ácido e altamente seletivas para a hidrólise da galactose ligada em posição α. Adicionalmente, o autor demonstrou a eficiência destas α-galactosidases na redução dos RO presentes em produtos derivados da soja, sugerindo que estas enzimas poderiam ser utilizadas industrialmente no processamento dos RO. Viana (2005) também estudou o uso de células permeabilizadas de *D. hansenii* UFV-1 contendo a enzima α-galactosidase intracelular para hidrólise dos RO presentes em leite de soja, obtendo a redução de 70% dos teores de rafinose e 100% dos teores de estaquiose, após 6 h de incubação a 60^{o}C.

2.5. Permeabilização de células

O uso de células de microrganismos contendo enzimas de interesse em bioconversões é vantajoso quando comparado com o uso destas enzimas purificadas, por dispensar as etapas de purificação e pelo aumento da estabilidade enzimática. Entretanto, as barreiras de permeabilidade do envelope celular para substrato e produtos levam a baixas taxas de reação das enzimas contidas nestas células (KONDO *et al.*, 2000). Assim torna-se muito importante o desenvolvimento de métodos efetivos para redução das barreiras de permeabilidade e para o preparo de células com alta taxa de atividade. Uma das maneiras de aumentar a permeabilidade celular é a extração de alguns lipídios de membrana pelo uso de solventes. Com este fim, vários processos de permeabilização de células de microrganismos, com solventes orgânicos como tolueno, tween 80, etanol, mistura clorofórmio-etanol, etanol e isopropanol têm sido testados para o aumento da permeabilidade do envelope celular (KUBAL; D'SOUZA, 2004; STANO *et al.*, 2005; GENARI *et al.*, 2003; DECLEIRE *et al.*, 1987; CHAMPLUVIER *et al.*, 1988; KONDO *et al.*, 2000).

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

2.6. Imobilização de células

Imobilização é a restrição da mobilidade da célula em um definido espaço, provendo altas concentrações das mesmas (NURSEVIN *et al*., 2003), com preservação da atividade catalítica (KAREL *et al*., 1985). A imobilização protege a célula e enzimas das tensões ambientais como pH, temperatura, sais, solventes, autodestruição, inibidores, e venenos (PARK; HOFFMAN, 1990). A imobilização de células oferece várias vantagens, como aumento da produtividade da fermentação, processo de produção contínuo, estabilidade celular, baixo custo e capacidade de reutilização (MARGARITIS; MERCHANT, 1984; STEWART; RUSSEL, 1986).

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

Imobilização de célula em um suporte sólido é conseguida por adsorção física devido a forças eletrostáticas ou por ligação covalente entre o suporte e a membrana da célula. Sistemas que usam células imobilizadas em uma superfície sólida são bastante populares devido à facilidade relativa da realização deste tipo de imobilização. Como exemplo de suportes sólidos usados neste tipo de imobilização pode-se citar materiais derivados de celulose (DEAE-celulose, madeira, serragem, serragem desliguinificada), materiais inorgânicos (porcelana porosa, vidro poroso). Os materiais como vidro ou celulose também podem ser tratados com policátions, chitosan ou outras substâncias químicas (pré-formadores de suportes) para aumentar sua capacidade de adsorção (NORTON; D'AMORE, 1994; NAVARRO; DURAND, 1977).

A imobilização por aprisionamento dentro de uma matriz porosa é baseada na inclusão de células dentro de uma rede rígida impedindo que as células se difundam no meio circunvizinho, enquanto permitem ainda a transferência de nutrientes e metabólitos. Exemplos característicos deste tipo de imobilização é o aprisionamento em géis de polissacarídeos como alginato, ágar, chitosan e ácido poligalacturônico ou outras matrizes poliméricas como gelatina, colágeno e álcool de polivinil (NORTON; D'AMORE, 1994; NAVARRO; DURAND, 1977; PARK; CHANG, 2000).

Floculação de células tem sido definida por muitos autores como a agregação de células que formam uma unidade maior ou a propriedade das células em suspensões de aderirem em grupo e sedimentar rapidamente (JIN; SPEERS, 1998). Floculação pode ser considerada como uma técnica de imobilização com uso potencial em reatores devido ao grande tamanho dos agregados formados. A capacidade de formar agregados é principalmente observada em fungos e células de plantas. Agentes floculantes artificiais ou "cross-linkers" podem ser usados para aumentar a agregação em culturas de células que não floculem naturalmente. A floculação de leveduras é uma propriedade de grande importância para a indústria de cerveja, afetando a produtividade e a qualidade, além da remoção e reutilização das leveduras. A floculação é afetada por muitos fatores inclusive composição da parede celular, pH, oxigênio dissolvido e composição do meio (JIN; SPEERS, 1998).

Retenção de células atrás de uma barreira pode ser obtida por uso de membrana de microporos, por aprisionamento das células em microcápsula ou através de imobilização da célula em uma superfície de interação com dois líquidos imiscíveis. As desvantagens principais da imobilização de células em membranas de microporos são: limitações de transferência de massa (LEBEAU *et al*., 1998) e possível obstrução de membrana causada pelo crescimento das células (GRYTA, 2002).

De acordo com Kourkoutas *et al*. (2004), o uso de sistemas imobilizados oferece muitas vantagens em relação às células livres incluindo: atividade prolongada e estabilidade do biocatalizador; altas densidades de células por unidade de volume do bioreator o que conduz a alta produtividade volumétrica da fermentação; captação de substrato aumentada e melhoria de rendimento; viabilidade de processo contínuo; tolerância aumentada para alta concentração de substrato e redução da inibição devido aos produtos formados; viabilidade de conduzir fermentações a baixas temperaturas melhorando a qualidade de produto; recuperação de produto mais fácil por redução das exigências de separação e de filtração, reduzindo assim, o custo de equipamentos e demandas de energia; regeneração e reutilização do biocatalizador por períodos estendidos em operações em bateladas, sem removê-lo do bioreator e redução do risco de contaminação microbiana devido às altas densidades de células.

Bekers *et al.* (1999) imobilizaram células de *S. cerevisiae*, em esferas de aço inox modificado, para a produção de etanol. Os autores relataram que a imobilização aumentava a estabilidade das células e, também, a produção de etanol. As células imobilizadas foram utilizadas durante cinco ciclos de fermentação sem perda de estabilidade. Kubal; D'Souza (2004) usaram células de *S. cerevisiae,* contendo a enzima catalase e imobilizadas em casca de ovo, para remoção de peróxido de hidrogênio em leite. Os autores relataram que as células imobilizadas foram capazes de degradar todo o peróxido de hidrogênio durante 10 reutilizações sem perda de eficiência. Kubal; D'Souza (2004) também relataram aumento da termoestabilidade enzimática após a imobilização. Van Der Sluis *et al.* (2001) imobilizaram células da levedura halo-tolerante *Candida versatilis e Zygosaccharomyces rouxii* em gel de oxido de polietileno para a produção de "flavor" em molho de soja. Os autores relataram que a imobilização diminuía consideravelmente o tempo requerido para o desenvolvimento de "flavor".

2.6.1. Imobilização de células em alginato de cálcio

Alginato é um biopolímero encontrado na natureza extraído, principalmente, de algas marrons. Em termos moleculares, o alginato é um polissacarídeo linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) unidos por ligações 1,4 podendo variar em composição e seqüência, dependendo da alga de origem (Figura 5).

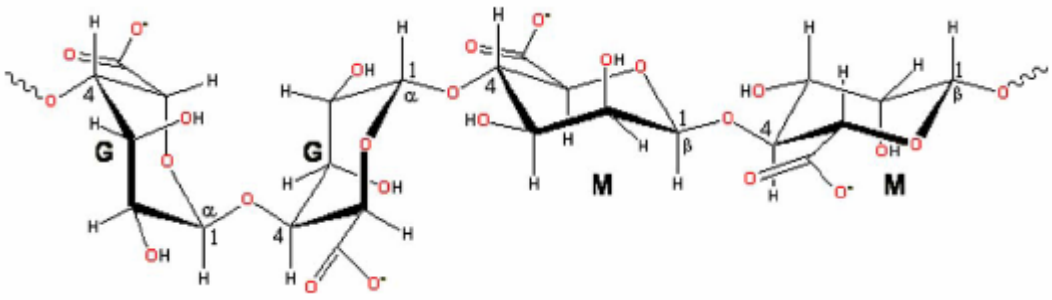

Figura 5 – Estrutura química do alginato. G é o grupo ácido gulurônico, M é o grupo ácido manurônico.

Em presença de cálcio e outros cátions divalentes o alginato apresenta a propriedade de formar gel, pois o cálcio induz um efeito cooperativo entre os blocos G formando uma rede 3D de acordo com o modelo ‘‘egg-box’’(CLARK ; ROSS-MURPHY, 1987)(Figura 6).

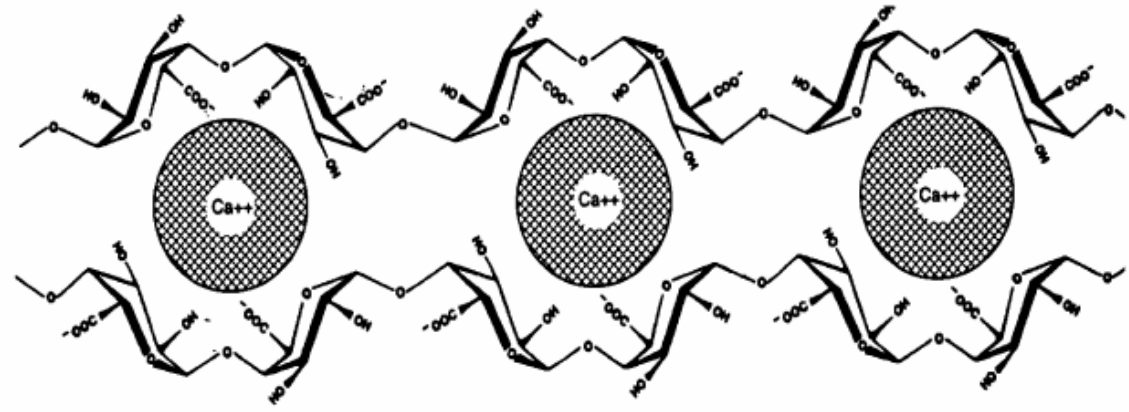

Figura 6 – Modelo “Eggs-box” para a foramação do gel de alginato com ions cálcio (CLARK ; ROSS-MURPHY, 1987).

O encapsulamento de biocatalizadores em hidrogel, e mais especificamente em cápsulas de gel alginato de cálcio, é uma técnica de imobilização que tem sua aplicação amplamente difundida. Ela consiste no aprisionamento do biocatalizador dentro de uma cápsula de gel de membrana semipermeável a qual fica em contato com solução aquosa (NIGAM *et al*., 1988). A imobilização em gel alginato de cálcio oferece vantagens como biocompatibilidade, simplicidade, baixo custo e a imobilização pode ser realizada sob condições muito moderadas (GRYTA, 2002). O hidrogel de alginato de cálcio é extensamente usado na indústria de alimentos como emulsificante e em aplicações biotecnologicas, inclusive na encapsulação de células, ou cultura de tecidos (GOMBOTZ; WEE, 1998; SHAPIRO; COHEN, 1997; EISELT *et al*., 2000; MIRALLES *et al*., 2001).

O gel de alginato, assim como outros hidrogéis, possui em sua estrutura grupos hidrofílicos carregados. Em solução aquosa estes grupos são capazes de absorver água com conseqüente aumento de volume das partículas do gel (“swelling”). A tendência osmótica e termodinâmica de absorver água é contrabalanceada pela força resultante das ligações cruzadas dentro da rede tridimensional do gel (SUDIPTO *et al.*, 2002). O ponto de equilíbrio entre as forças

que controlam a absorção ou a liberação de água nos hidrogéis é conhecido como equilíbrio de “swelling” (SARAYDIN *et al.*, 2002). Este equilíbrio é afetado por alguns estímulos externos como temperatura, pH, concentração do solvente, luz e campo magnético (JI *et al.*, 2006). O equilíbrio de “swelling” é uma característica muito importante para células imobilizadas em hidrógeis, pois parece estar diretamente ligado à capacidade de difusão de substrato e produtos dentro da rede tridimensional do gel (SARAYDIN *et al.*, 2002).

Becerra *et al.* (2001) estudaram o uso de células de *Kluyveromyces lactis,* contendo a enzima β-galactosidase, imobilizadas em gel de alginato de cálcio, para a hidrólise de lactose em leite. Os autores relataram alta atividade de β-galactosidase nas células imobilizadas, com redução de 99,5% da lactose no leite incubado a 30^{o}C, por 30 h. Wang *et al*. (1998) imobilizaram células de *Absidia orchidis* contendo a enzima β–hidroxilase, em alginato de cálcio, para a síntese do antiinflamatório hidrocortisona. Os autores relataram alta estabilidade das células imobilizadas que foram utilizadas por 6 vezes sem nenhuma perda significante de atividade. Alteriis *el al*. (2004) imobilizaram células de *K. lactis* em alginato de cálcio para a produção da enzima glucoamilase. Os autores relataram alta produção volumétrica de glucoamilase pelas células imobilizadas. Os autores também relataram que o nível de produção da enzima glucoamilase pelas células de *K. lactis* imobilizadas em alginato de cálcio se mantinha inalterado durante uma semana de uso em bioreator. Ettayebi *et al*. (2003) imobilizaram células de *Candida tropicalis* em alginato de cálcio para a biodegradação de polifenóis em efluente da indústria de óleo de oliva. Os autores relataram que a imobilização em alginato de cálcio protegia as células contra os efeitos tóxicos dos fenóis, permitido que a capacidade de biodegradação dos fenóis fosse estável por 20 ciclos de fermentações.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

A cepa de *D. hansenii* utilizada, designada como UFV-1, pertence à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos-BIOAGRO-UFV.

3.2. Manutenção da cultura

A levedura mantida a - 80^{o}C em YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) e glicerol, foi estriada em meio YPD sólido (1,5% ágar), incubada em câmara de crescimento, por 24 h a 30^{o}C. As culturas foram mantidas a 4^{o}C e utilizadas para obteção do inóculo.

3.3. Cultivo de *Debaryomyces hansenii* para produção de α-galactosidases

A levedura *D. hansenii* mantida meio YPD sólido, a 4^{o}C, foi ativada em 50 mL de YPD líquido e incubada em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 200 rpm, por 12-15 h, a 30^{o}C. Após este período, o meio foi centrifugado a 4000 x *g*, por 5 min, a 4^{o}C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água peptonada 0,1% (p/v). Posteriormente, as células de *D. hansenii* foram inoculadas (volume equivalente a A_{600} inicial de 0,1) em meio mineral com extrato de levedura (contendo por litro de água destilada, 0,62 g de KH_2PO_4, 2 g de K_2HPO_4, 1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g de $MgSO_4.7H_2O$ e 5 g de extrato de levedura) – contendo 1% (p/v) de galactose e incubadas nas mesmas condições descritas acima por 36 h. Após o período de cultivo, as cultura foi centrifugada nas mesmas condições já descritas e o precipitado, contendo as células, lavado com água peptonada 0,1% (p/v) e armazenado em freezer a - 20°C.

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

As células congeladas de *D. hansenii* foram pesadas e misturadas com solução de etanol 50% (v/v), na proporção de 450 µL de solvente para cada 0,2 g de célula. A mistura foi mantida, sob agitação à temperatura ambiente, por diferentes tempos e velocidades de agitação. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm em microcentrífuga tipo Eppendorf, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células secas em estufa por 1 hora a 35°C.

As células permeabilizadas foram novamente pesadas e a atividade da α-galactosidase intracelular determinada, conforme descrito no item 3.6.1.

3.4.1. Efeito do tempo de permeabilização das células na atividade de α-galactosidase

As células congeladas de *D. hansenii* foram pesadas e misturadas com solução de etanol 50% (v/v), na proporção de 450 µL de solvente para cada 0,2 g de célula. Para a permeabilização das células, a mistura foi mantida à temperatura ambiente, pelos tempos de 5, 10 e 15 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm em microcentrífuga tipo Eppendorf, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células secas em estufa por 1 hora a 35°C.

As células permeabilizadas foram novamente pesadas e a atividade da α-galactosidase intracelular determinada, conforme descrito no item 3.6.1.

3.4.2. Efeito da velocidade de agitação, usada durante a permeabilização das células, na atividade de α-galactosidase

As células congeladas de *D. hansenii* foram pesadas e misturadas com solução de etanol 50% (v/v), na proporção de 450 µL de solvente para cada 0,2 g de célula.

Para permeabilização das células, a mistura foi submetida, por de 5 min, a dois tipos de agitação: agitação lenta, feita em agitador de bancada e agitação rápida, feita em agitador tipo vortex. Após o tempo de agitação, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm em microcentrífuga tipo Eppendorf, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células secas em estufa por 1 hora a 35°C.

As células permeabilizadas foram novamente pesadas e a atividade da α-galactosidase intracelular determinada, conforme descrito no item 3.6.1.

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

As células congeladas de *D. hansenii* foram pesadas e misturadas com solução de etanol 50% (v/v), na proporção de 450 µL de solvente para cada 0,2 g de célula. A mistura foi mantida, sob agitação à temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm em microcentrífuga tipo

Eppendorf, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células secas em estufa por 1 hora a 35°C.

Após terem sido permeabilizadas e secas, as células de *D. hansenii* foram misturadas a uma solução de alginato de sódio 2%, (p/v), previamente autoclavada, tendo sido usadas diferentes proporções de células para cada grama de alginato de sódio. Cada uma dessas misturas foi adicionada, gota a gota, através de agulha de seringa hipodérmica conectada a uma bomba peristáltica, em uma solução de $CaCl_2$ 0,1 M, para a formação das esferas de alginato de cálcio contendo as células imobilizadas. Para melhor formação do retículo e estabilização, as esferas foram mantidas na solução de $CaCl_2$ 0,1 M, por diferentes tempos, a 4°C. Posteriormente, estas foram lavadas com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e armazenadas no mesmo tampão a 4°C, até o uso.

Frações contendo número específico de esferas foram ensaiadas para determinação da atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, conforme descrito no item 3.6.1. O número de partículas formadas durante o processo de imobilização foi determinado, multiplicando o número médio de esferas formadas durante 1 min pelo tempo total, uma vez que o fluxo da bomba peristáltica permaneceu constante durante todo o processo.

3.5.1. Efeito da relação célula:alginato na atividade da α-galactosidase intracelular

Para estudar o efeito da relação célula:alginato, usada durante a formação das esferas de alginato, na atividade da α-galactosidase, as células permeabilizadas foram imobilizadas conforme descrito no item 3.5. Foram testadas as proporções de 4, 8 e 12 g de células para cada 1 g de alginato. Após formação das esferas, a atividade da α-galactosidase foi quantificada, conforme descrito no item 3.6.1.

3.5.2 Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato na atividade da α-galactosidase

Depois de formadas, as esferas de alginato foram mantidas em solução de $CaCl_2$ 2% (p/v) por 15 minutos ou por 12 horas. As esferas foram lavadas com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e armazenadas no mesmo tampão a 4°C. Foram retiradas 4 esferas para determinação da atividade da α-galactosidase, conforme descrito no item 3.6.1.

3.5.3. Determinação do diâmetro das esferas

Após o procedimento descrito no item 3.5.2, foram retiradas amostras de esferas e o diâmetro destas foi determinado com o auxílio de um paquímetro.

3.5.4. Efeito do tempo de incubação no volume das esferas de alginato

Para estudar o efeito do tempo de incubação no volume das partículas, 20 esferas de alginato foram colocadas em proveta volumétrica e imersas em volume definido de água destilada. O volume deslocado foi considerado como o volume inicial destas partículas. Após a determinação deste volume inicial, as esferas de alginato foram incubadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 por 2 e 5 h na temperatura de 60ºC. Após estes tempos, o volume das esferas foi medido, conforme descrito anteriormente.

3.6. Determinação das atividades enzimáticas

3.6.1. Atividade de α-galactosidase com o substrato sintético ρNPαGal

Para a determinação da atividade da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii*, estas foram secas, pesadas e ressuspendidas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Desta suspensão foram retiradas alíquotas de 10 e 20 µL para preparo das diluições usadas na determinação da atividade da α-galactosidase. O ensaio enzimático, com volume total de 1000 µL, continha 10 a 20 µL da suspensão enzimática, 730 a 740 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 µL da solução de ρNPαGal 2 mM. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 50ºC, por 15 min. Após este tempo, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de solução de NaOH 0,25 M e

feita a leitura espectrofotométrica a 410 nm. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em µmoles de ρNP, utilizando uma curva padrão construída com solução de ρNP.

Para a determinação da atividade de α-galactosidase nas células imobilizadas, o ensaio enzimático continha os mesmos reagentes descritos acima, exceto que 4 esferas de alginato foram usadas em substituição à suspensão de células. O ensaio enzimático foi conduzido como descrito anteriormente.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ρNP por min, por g de célula, nas condições de ensaio.

3.6.2. Atividade de invertase

Para os ensaios com o substrato sacarose, a atividade enzimática contida nas células imobilizadas foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzida com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) pelo método de Miller (1956). A mistura de reação continha 750 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0; 250 µL de solução de sacarose 100 mM e 4 esferas de alginato. O ensaio foi conduzido por 30 min, a 50^{o}C. Após este período, foi adicionado 1 mL do reagente DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e deixadas em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após este tempo, foram adicionados 2 mL de água e os valores de absorbância, obtidos a 550 nm, foram transformados em µmoles de açúcar redutor, utilizando uma curva padrão construída com 0 a 2 µmoles de glicose.

3.7. Caracterização enzimática

3.7.1. Efeito do pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres e imobilizadas de *D. hansenii*, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.6.1, exceto que, o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH, utilizando-se os seguintes tampões: tampão citrato de sódio 200 mM, pH 3,0 e 3,5, tampão acetato de sódio 200 mM,

pH 4,0 e 6,0 e tampão ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfônico (MOPS), 200 mM, pH 6,5 e 8,0.

3.7.2. Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da α-galactosidase, contida nas células permeabilizadas livres e imobilizadas de *D. hansenii*, as condições foram as mesma descritas no item 3.6.1, exceto que, o ensaio foi realizado em várias temperaturas compreendidas entre 30 e 80°C.

3.7.3. Análise de termoestabilidade

Para o estudo da estabilidade térmica da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii* UFV-1, alíquotas de 10 a 20 µL da suspensão de células foram adicionadas em um tubo de ensaio contendo 730 a 740 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e pré-incubadas nas temperaturas de 60 e 70 °C por períodos de 0, 1, 2, 5, 20, 24, 28, 45 e 72 h.

Após cada tempo de pré-incubação, foi adicionado no mesmo tubo, 250 µL de uma solução de ρNPαGal 2 mM preparada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os ensaios para a atividade de α-galactosidase foram conduzidos como descrito no item 3.6.1, exceto que o ensaio foi realizado na temperatura de 60°C.

O estudo da estabilidade térmica da α-galactosidase contida nas células imobilizadas foi realizado de maneira semelhante, exceto que foram utilizadas 4 esferas de alginato em cada ensaio.

Também foi determinada a estabilidade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas, durante 45 dias, na temperatura de 4°C. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente.

3.74. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Para determinar o efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres e imobilizadas de *D. hansenii*, os ensaios de atividade foram realizados utilizando-se concentrações crescentes do substrato ρNPαGal, como descrito no item 3.6.1, porém na temperatura 60^{o}C, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e concentrações de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 mM para a enzima contida nas células permeabilizadas livres e, nas concentrações de 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mM para a enzima contida nas células permeabilizadas e imobilizadas *D. hansenii*.

Os valores de $K_{M\ app}$ e $V_{max\ app}$ foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato, Curva de Michaelis-Menten, pelo programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

3.8. Ensaio de hidrólise de rafinose com as células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A hidrólise de rafinose, catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii*, foi avaliada de acordo com o seguinte ensaio: em erlenmeyer de 50 mL, foram adicionados 20 mL de solução de rafinose 10 mM e 1,4 mL de suspensão de células permeabilizadas (42 U). A mistura foi incubada a 50°C, em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick a 100 rpm, por períodos de 2, 4, 6 e 20 h. O ensaio de hidrólise da rafinose pela α-galactosidase contida nas células imobilizadas, foi realizado de maneira semelhante às células permeabilizadas livres, exceto que foram usados 10,25 g de esferas de alginato (1 U).

Após cada período de incubação, foi retirada uma alíquota da mistura de reação e a quantidade de açúcar redutor produzido foi determinada com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) pelo método de Miller (1956). Alíquotas de 50 a 100 µL da mistura de reação foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 900 a 950 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, e adicionado 1 mL do reagente DNS. As amostras foram fervidas por 5 min, deixadas em repouso por 10 min, a temperatura ambiente e, após este tempo, foram adicionados 2 mL de água. Os valores de absorbância obtidos a 550 nm foram transformados em

µmoles de açúcar redutor, utilizando uma curva padrão construída com 0 a 2 µmoles de glicose.

3.8.1. Ensaio de reutilização das esferas de alginato

Para testar a capacidade de reutilização das esferas de alginato, após o término do experimento descrito no item 3.8, as esferas foram separadas por filtração, lavadas com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e novamente incubadas em solução de rafinose 10 mM, conforme descrito no item 3.8.

Este procedimento foi repetido por mais uma vez, totalizando 2 reutilizações.

3.9. Hidrólise de RO em leite de soja

Para o preparo do extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja), 50 g de sementes de soja foram pesadas, lavadas em água fervente, adicionadas a 400 mL de água a 80^{o}C e colocadas em liquidificador por 5 min. O leite de soja foi filtrado e fervido durante 10 min.

Alíquotas de 10 mL do leite de soja foram transferidas para erlenmeyers de 25 mL, em triplicata. Em cada erlenmeyer foram adicionados 0,5 g de esferas de alginato (0,05 U) contendo as células imobilizadas e incubados a 60^{o}C, em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, 100 rpm, por períodos de 3, 6, 9 e 15 h.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos RO presentes no leite de soja, estas preparações livres das esferas de alginato foram liofilizadas e os RO extraídos de 20 a 30 mg do pó obtido. Os teores de RO determinados nos extratos tratados com a enzima foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.10. Extração de RO

A extração de RO no leite de soja antes e após o tratamento enzimático foi conduzida como descrito por Saravitz *et al.* (1987), com modificações. Aproximadamente 20 a 30 mg das amostras liofilizadas foram transferidas para

tubos tipo Eppendorf e utilizadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo, presente nas amostras foi retirada em 3 extrações sucessivas com 1 mL de éter de petróleo, a 42^{o}C, por 5 min. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80%, a 100^{o}C, por 5 min. Após cada extração, feita com éter de petróleo ou álcool 80%, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga tipo Eppendorf 5415C, 14.000 rpm, por 20 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50^{o}C, os açúcares foram ressuspendidos em 1 mL de etanol 80% e congelados a - 20^{o}C. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, passadas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a - 20^{o}C, para posterior análise por CLAE.

3.11. Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os RO extraídos do leite de soja tratados e não tratados enzimaticamente, foram analisados por CLAE, em cromatógrafo Shimadizu série 10A, equipado com detector de índice de refração, uma coluna em aço inox (25 X 0,465 cm) contendo a fase estacionária o grupo aminopropil (-NH_2). A mistura acetonitrila-água (80:20) em condições isocráticas foi a fase móvel. As análises foram realizadas a 35^{o}C, sob o fluxo de 1 mL/min, e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 4, 8 e 8% (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 μL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CLAE, equipado com o programa LC-10, versão 2.2 para Windows.

Parte 1

ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA PERMEABILIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.1.1. Estudo das condições de permeabilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Após o cultivo da levedura *D. hansenii* em meio apropriado (item 3.3 de Material e Métodos), as células foram submetidas a diversos tratamentos, com o objetivo de determinar as melhores condições para sua permeabilização e posterior imobilização.

4.1.1.1. Tempo de permeabilização das células

Foi avaliado o efeito do tempo de permeabilização na atividade da α-galactosidase presente nas células de *D. hansenii*. As atividades da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas com etanol 50%, pelos tempos de 5, 10 e 15 min estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividade da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1, permeabilizadas com etanol 50%, por diferentes tempos.

Tempo (min)	Atividade enzimática (μmol de ρNP min^{-1} g $célula^{-1}$) $\pm$ DP
5	64,87 $\pm$ 0,38
10	56,98 $\pm$ 0,95
15	49,50 $\pm$ 1,73

Os valores de atividade de α-galactosidase determinados nos tempos testados, mostrou relação inversa com o tempo de permeabilização. Maior atividade foi obtida quando as células foram permeabilizadas pelo menor tempo, 5 min. Nos tempos de 10 e 15 min, a enzima apresentou respectivamente 88 e 76% da atividade determinada com 5 mim de permeabilização. Como o aumento do tempo de permeabilização resulta em maior período de contato entre a enzima e o solvente, uma possível explicação para tal comportamento seria que o maior contato com o solvente orgânico, provavelmente resultou em maior

desestabilização da estrutura da enzima, com conseqüente diminuição da atividade.

4.1.1.2. Tipo de agitação e eficiência da permeabilização

As atividades da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii*, permeabilizadas com etanol 50%, durante 5 min, sob agitação lenta e rápida são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1, permeabilizadas com etanol 50%, sob duas velocidades de agitação.

Agitação	Atividade enzimática (μmol de ρNP min^{-1} g célula^{-1}) $\pm$ DP
Lenta	95,47 $\pm$ 1,92
Rápida	80,59 $\pm$ 1,89

As células permeabilizadas com etanol 50%, durante 5 min, sob agitação lenta, apresentam melhores atividades de α-galactosidase em relação às permeabilizadas sob agitação rápida.

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

Após a permeabilização das células de *D. hansenii*, estas foram submetidas a diversos tratamentos, com o objetivo de determinar as melhores condições para sua imobilização.

4.1.2.1. Efeito da relação célula:alginato na atividade de α-galactosidase das células imobilizadas

As células permeabilizadas de *D. hansenii* foram imobilizadas em gel de alginato de cálcio, conforme descrito no item 3.5 de Material e Métodos. Foi testada a melhor relação entre a concentração de células e de alginato de sódio

utilizados para formação de esferas de alginato, visando maior atividade de α-galactosidase.

Tabela 3 - Efeito da relação célula:alginato na atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1.

Célula:alginato (g : g)	Atividade enzimática (μmol de ρNP min^{-1} $esfera^{-1}$)	g cel/ esfera	Atividade enzimática (μmol de ρNP min^{-1} g $célula^{-1}$)
4:1	$6,56x10^{-4}$	$7,27x10^{-4}$	0,90
8:1	$7,46x10^{-4}$	$15,09x10^{-4}$	0,49
12:1	$8,81x10^{-4}$	$23,25x10^{-4}$	0,37

Como apresentado na Tabela 3, o aumento da relação célula: alginato promoveu um acréscimo, não proporcional, na atividade de α-galactosidase expressa por esfera. Entretanto, efeito contrário foi observado, quando a atividade de α-galactosidase foi expressa por grama de célula. Como o número de esferas de alginato formadas em todas as concentrações testadas foi aproximadamente o mesmo, esses resultados demonstraram que à medida que se aumentou a relação célula:alginato, a quantidade de célula por esfera aumentou proporcionalmente, entretanto a atividade de α-galactosidase não apresentou aumento significativo. Dessa forma, a maior atividade de α-galactosidase por g de célula foi determinada quando a relação célula:alginato foi de 4:1.

Buque *et al*. (2002), estudando a redução do 3-oxobutanoato de etila a 3-hidroxibutanoato de etila com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, relataram que a alta concentração de células por esferas de alginato diminuía a taxa de redução e que esse efeito estaria ligado às limitações de difusão.

Uma das grandes vantagens da imobilização de células em alginato é a possibilidade de uso de grandes concentrações de células imobilizadas por volume de gel. Entretanto, os resultados sugerem que existe um limite entre o aumento da concentração de células e a de atividade enzimática presente nas células imobilizadas. Uma possível explicação seria o fato de que grandes concentrações de células por esfera de alginato parecem aumentar as

dificuldades de difusão, tanto do substrato como do produto, diminuindo assim a atividade por grama de célula.

4.1.2.2. Efeito do tempo de reticulação na atividade de α-galactosidase e no diâmetro das esferas de alginato

Após a formação das esferas de alginato (item 3.5.3 de Material e Métodos) estas foram mantidas em solução de cloreto de cálcio para melhor formação da rede tridimensional do gel de alginato de cálcio. Após cada tempo de reticulação foram retiradas alíquotas e o diâmetro das esferas de alginato determinado com o auxílio de um paquímetro. Como representado na Tabela 4, não houve alteração do diâmetro das esferas de alginato e da atividade da α-galactosidase, em função do tempo de reticulação.

Tabela 4 – Efeito de tempo de reticulação na atividade da α-galactosidase e no diâmetro das esferas de alginato

Tempo de reticulação	Atividade enzimática (μmol ρNP min^{-1} g célula^{-1}) ± DP	Diâmetro das esferas (mm)
15 min	1,07 ± 0,02	2,3 a 2,8
12 h	1,08 ± 0,02	2,3 a 2,8

Ambos os tratamentos apresentaram partículas de 2,3 a 2,8 mm de diâmetro, sugerindo não haver influência do fator estudado no diâmetro médio das partículas.

A atividade enzimática foi muito semelhante nas esferas de alginato submetidas aos dois tempos de reticulação, mostrando que o cloreto de cálcio não tem efeito sobre a atividade da α-galactosidase. Assim, torna-se vantajoso o uso do tempo de reticulação de 12 h, pois tempos maiores de maturação em cloreto de cálcio, provavelmente proporcionam esferas de alginato com maior estabilidade, devido ao fortalecimento da rede tridimensional do gel de alginato. Becerra *et al*. (2001) trabalhando com células de *Kluyveromyces lactis* imobilizadas em alginato, observaram que, com tempo de reticulação de 5 h

foram obtidas partículas com 2,75 mm de diâmetro com alta atividade de β-galactosidase.

4.1.2.3. Efeito da imobilização das células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 na atividade da α-galactosidase

O ensaio para o estudo do efeito da imobilização em alginato de cálcio na atividade de α-galactosidase das células permeabilizadas de *D. hansenii* foi realizado como descrito no item 3.6 de Material e Métodos, exceto que, o ensaio foi realizado em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick a 150 rpm. Como apresentado na tabela 5 o valor de atividade da α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *D. hansenii* foi 99,80 µmol de ρNP min^{-1} g $célula^{-1}$. Entretanto após a imobilização (tabela 5) a atividade enzimática foi 4,90 de ρNP min^{-1} g $célula^{-1}$, ou seja, uma diminuição de 20,5 vezes no valor de atividade da α-galactosidase, contida nas células permeabilizadas, após a imobilização.

Tabela 5 – Efeito de tempo de reticulação na atividade da α-galactosidase e no diâmetro das esferas de alginato

	Atividade enzimática (µmol ρNP min^{-1} g $célula^{-1}$) ± DP
Células permeabilizadas livres	99,8 ± 5,06
Células permeabilizadas imobilizadas	4,90 ± 0,04

Jordão *et al*. (2001), trabalhando com células de *Kluyveromyces lactis* contendo β-galactosidase, relataram diminuição de 4,5 vezes na atividade de β-galactosidase após a imobilização em alginato.

A baixa capacidade de difusão é uma característica exibida por sistemas de imobilização em alginato, devido ao alto grau de ligações cruzadas da rede tridimensional deste gel, o que acaba por limitar a taxa de difusão tanto do substrato como também do produto (FLORIDO *et al*., 2001).

Entretanto, a baixa atividade enzimática dos sistemas de imobilização em alginato pode ser compensada pela capacidade reutilização, a qual leva a um aumento da produtividade final desses sistemas.

PARTE 2

CARACTERIZAÇÃO DA α-GALACTOSIDASE CONTIDA EM CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.2. Caracterização enzimática

4.2.1. Efeito do pH

Atividades de α-galactosidase consideráveis, acima de 80%, foram determinadas na faixa de pH entre 3,0 e 5,5, entretanto, a atividade máxima foi encontrada em pH 4,5. Em valores de pH acima de 6,5 a atividade reduziu drasticamente, sendo que a menor atividade foi observada em pH 8,0, 6% da atividade máxima (Figura 6).

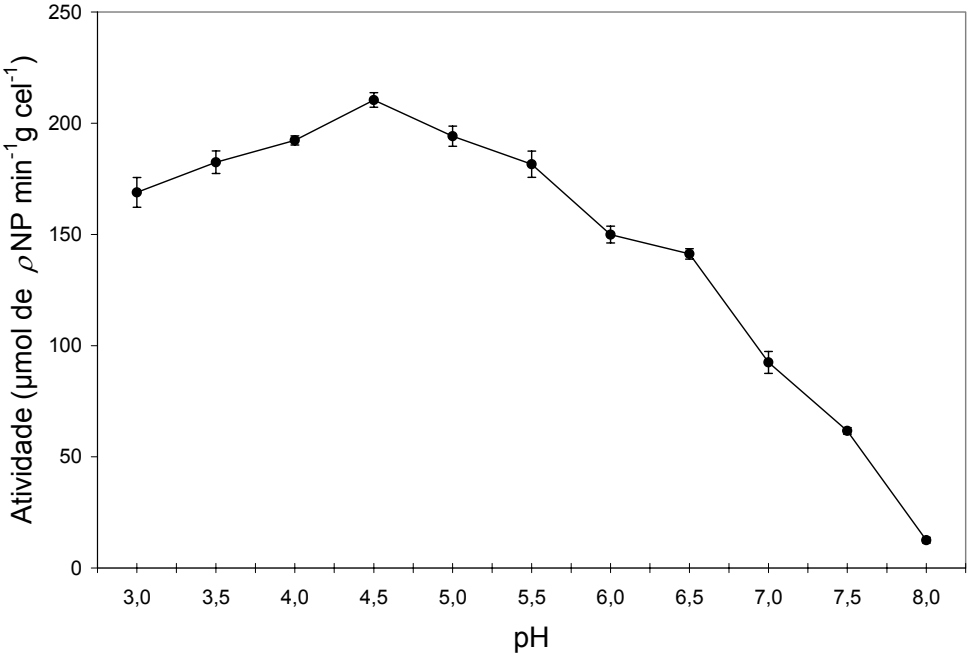

Figura 6 - Efeito do pH na atividade da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1, a 50°C.

A α-galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* estudada por Prashanth; Mulimani (2004) apresentou pH ótimo igual a 4,8. Kotwal *et al*. (1999) relataram valor de pH ótimo igual a 5,0 para a α-galactosidase intracelular do fungo *Humicola* sp. Viana (2005) trabalhando com α-galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* encontrou valor de pH ótimo igual a 5,0.

Em pH 3,0 e 7,5, a α-galactosidase contida nas células permeabilizadas mantiveram 80 e 29% de sua atividade máxima, respectivamente. Por outro lado, a α-galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* manteve 57 e 0% da atividade máxima, nesses respectivos valores de pH (VIANA, 2005). Isso sugere

que o confinamento da α-galactosidase nas células de *D. hansenii* permitiu a maior estabilidade desta enzima nos valores de pH testados, quando comparada com a enzima intracelular pura.

4.2.2. Efeito da temperatura

Maiores atividades de α-galactosidase, acima de 68%, foram detectadas entre as temperaturas de 45 e 65°C, entretanto, a temperatura ótima foi de 60°C. Em valores acima de 60°C a atividade enzimática diminuiu drasticamente, atingindo nulidade a partir de 80°C (Figura 7).

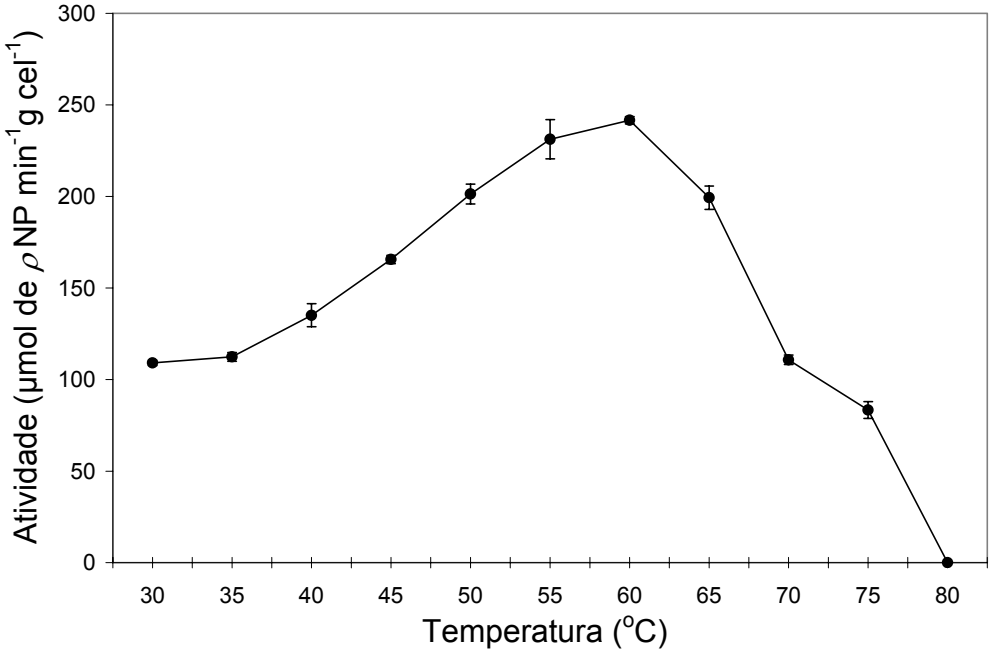

Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1, em pH 5,0.

A temperatura ótima relatada por Kotwal *et al*. (1999) para a α-galactosidase intracelular de *Humicola* sp foi de 65°C. Cavazzoni *et al*. (1987) determinaram a temperatura ótima da α-galactosidase intracelular da levedura *Candida javanica* de 75°C.

Viana (2005) determinou a temperatura ótima da α-galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* como sendo 55°C. Em comparação com os resultados obtidos por Viana, a enzima contida nas células permeabilizadas de *D.*

hansenii foi mais estável em temperaturas mais altas. A 65°C, a α-galactosidase contida nas células permeabilizadas manteve 82% de sua atividade máxima, enquanto que a enzima purificada manteve apenas 62% da sua atividade máxima (VIANA, 2005). Na temperatura de 70°C, enquanto a enzima contida nas células permeabilizadas manteve 62% da atividade máxima, a enzima purificada apresentou atividade nula (VIANA, 2005). Os resultados encontrados sugerem que o confinamento da α-galactosidase nas células de *D. hansenii* permitiu uma maior estabilidade desta enzima frente à temperaturas elevadas, permitindo assim uma maior atividade na faixa de temperatura de 65 a 80°C, em relação a enzima intracelular purificada.

4.2.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 60 e 70°C, por vários tempos. A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *D. hansenii* manteve 82% de sua atividade original quando pré-incubada a 60°C, por um período de 5 h, perdendo 74% de sua atividade com 45 h de incubação. A 70°C a enzima manteve 72% de sua atividade original por 1 h e manteve 42% de sua atividade após 20 h. Para ambas as temperaturas de incubação a enzima manteve 25% de sua atividade após 72 h (Figura 8).

Viana (2005) trabalhando com a α-galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* relatou que a enzima mantinha apenas 53% de sua atividade original quando pré-incubada a 65°C por 30 min, sendo inativada após 3 h de incubação nessa temperatura. A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *D. hansenii*, quando comparada com a enzima purificada (VIANA, 2005), demonstrou ser muito mais termoestável, mantendo 60% de sua atividade inicial quando incubada por 5 h a 70°C. Estes resultados sugerem que o confinamento da α-galactosidase nas células permeabilizadas de *D. hansenii* tornou a enzima mais resistente a longos períodos de incubação sob altas temperaturas. Esse aumento na estabilidade da α-galactosidase provavelmente se deve ao efeito do ambiente intracelular, mantido nas células permeabilizadas.

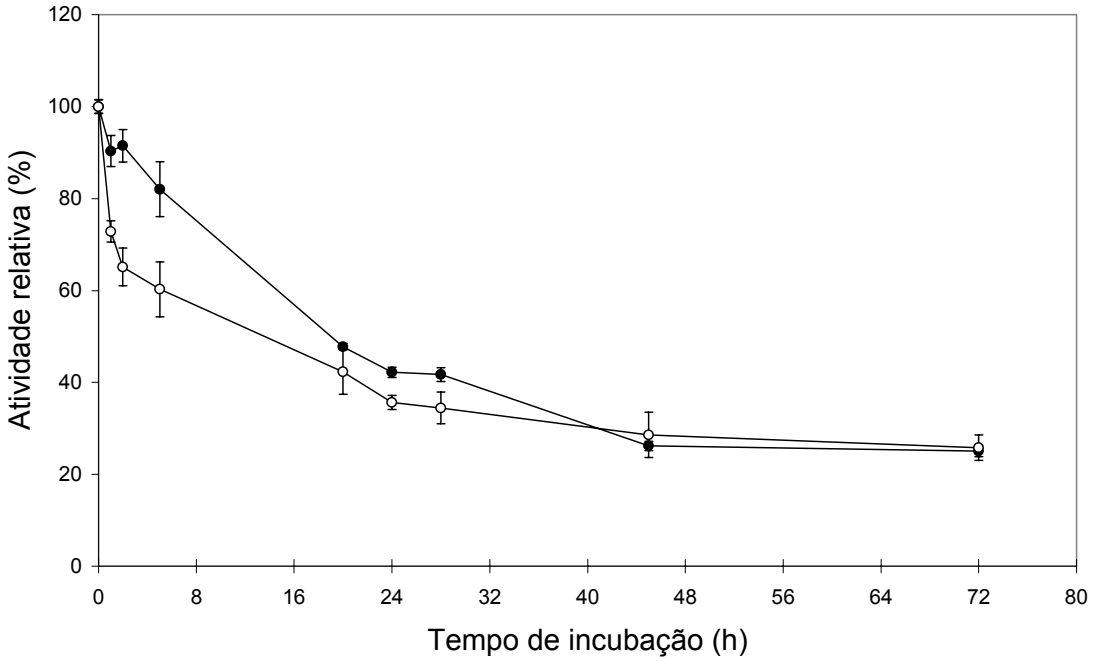

Figura 8 – Efeito da temperatura na estabilidade da α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1. As amostras foram pré-incubadas nas temperaturas de 60°C (•) e 70°C (o). As atividades relativas foram calculadas considerando-se atividade sem pré-incubação como 100%

4.2.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

O efeito da concentração do substrato ρNPαGal na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii*, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten (item 3.7.4 de Material e Métodos).

Os valores da constante cinética $K_{M\ app}$ e da velocidade máxima $V_{max\ app}$ para este substrato foram 0,30 mM e 350 µmol de ρNP min^{-1} g de $célula^{-1}$ respectivamente (Figura 9).

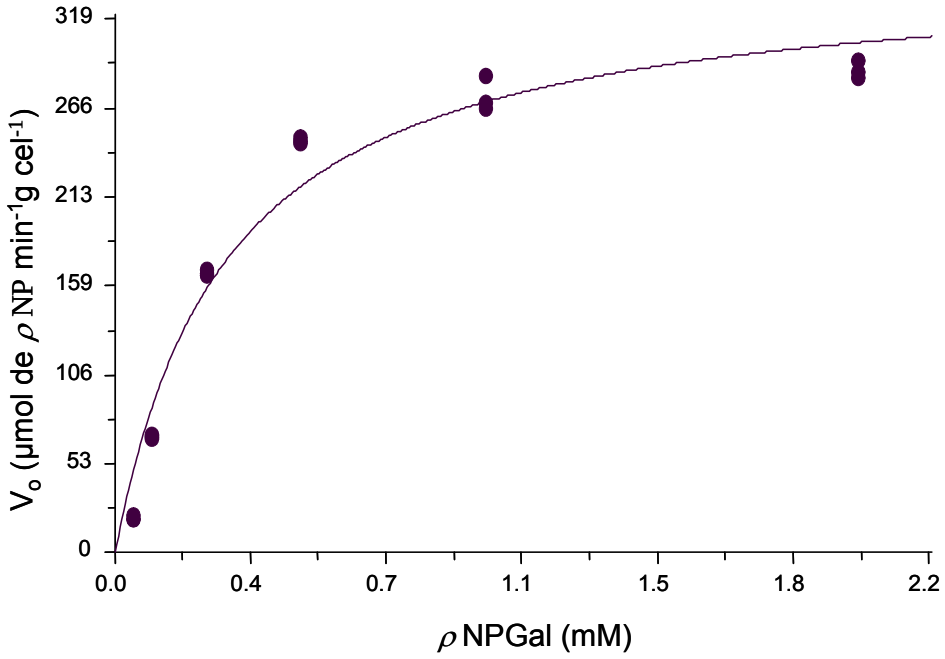

Figura 9 – Efeito da concentração do substrato ρNPαGal na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *D. hansenii* UFV-1.

Kotwal *et al*. (1999), relataram valor da K_M para α-galactosidase intracelular de *Humicola* sp. de 0,28 mM, com o ρNPαGal.

De acordo com Viana (2005), o valor da K_M para a α-galactosidase intracelular purificada de *D. hansenii* determinado com ρNPαGal foi 0,32 mM, valor muito próximo do obtido para a enzima contida nas células permeabilizadas (0,30 mM). Este fato sugere que processo de permeabilização das células com etanol 50% (v/v) não alterou a conformação da enzima e sua afinidade pelo substrato, mantendo aproximadamente o mesmo valor de K_M.

PARTE 3

CARACTERIZAÇÃO DA α-GALACTOSIDASE CONTIDA EM CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.3. Caracterização enzimática

4.3.1. Efeito do pH

A influencia do pH na atividade da α-galactosidase, contida nas células imobilizadas de *D. hansenii*, foi estudada na faixa compreendida entre 3,0 e 8,0. Atividades consideráveis, acima de 80% da atividade máxima, foram encontradas na faixa de pH entre 4,0 e 7,0, com a atividade máxima em pH 4,0. Em pH abaixo de 4,0 a atividade foi drasticamente reduzida sendo que a menor atividade foi encontrada em pH 3,0. Em pH 8,0 a enzima manteve 66% da atividade máxima (Figura 10).

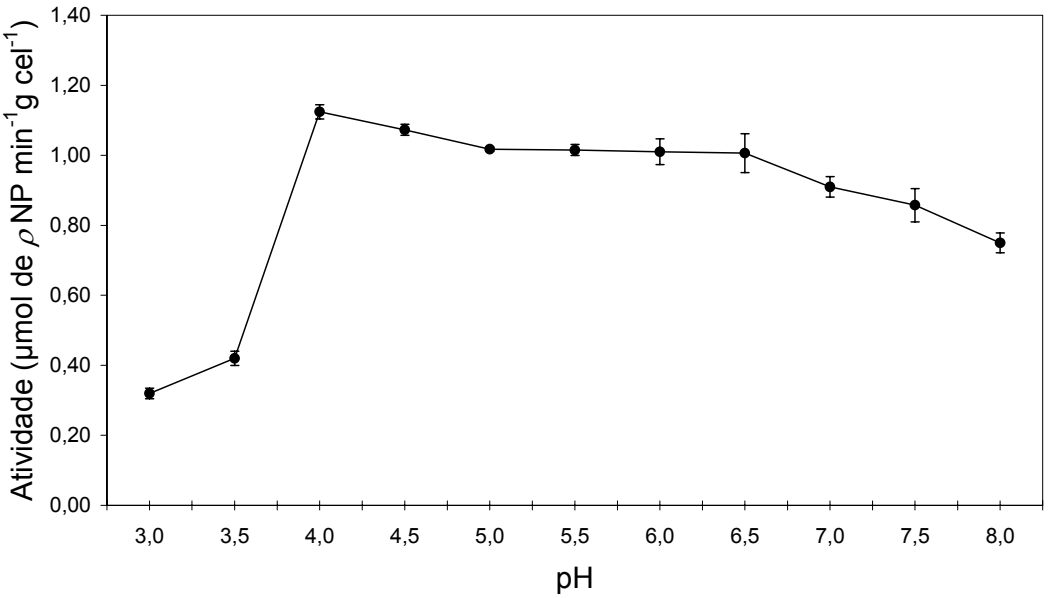

Figura 10 - Efeito do pH na atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, a 50°C.

Comparando as α-galactosidases contidas nas células permeabilizadas livres e imobilizadas de *D. hansenii* (Figura 11), foi observado que a enzima contida nas células imobilizadas manteve 67% de sua atividade máxima em pH 8,0 enquanto que a enzima contida nas células livres manteve apenas 6% de sua atividade máxima, nesse pH. A enzima contida nas células imobilizadas apresentou valor de pH ótimo igual a 4,0, ligeiramente mais ácido que o valor de 4,5 apresentado para a atividade máxima da enzima contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii* . Entretanto a enzima contida nas células

livres manteve 80% sua atividade original em pH 3,0, enquanto que a enzima contida nas células imobilizadas manteve apenas 28% sua atividade máxima, nesse pH.

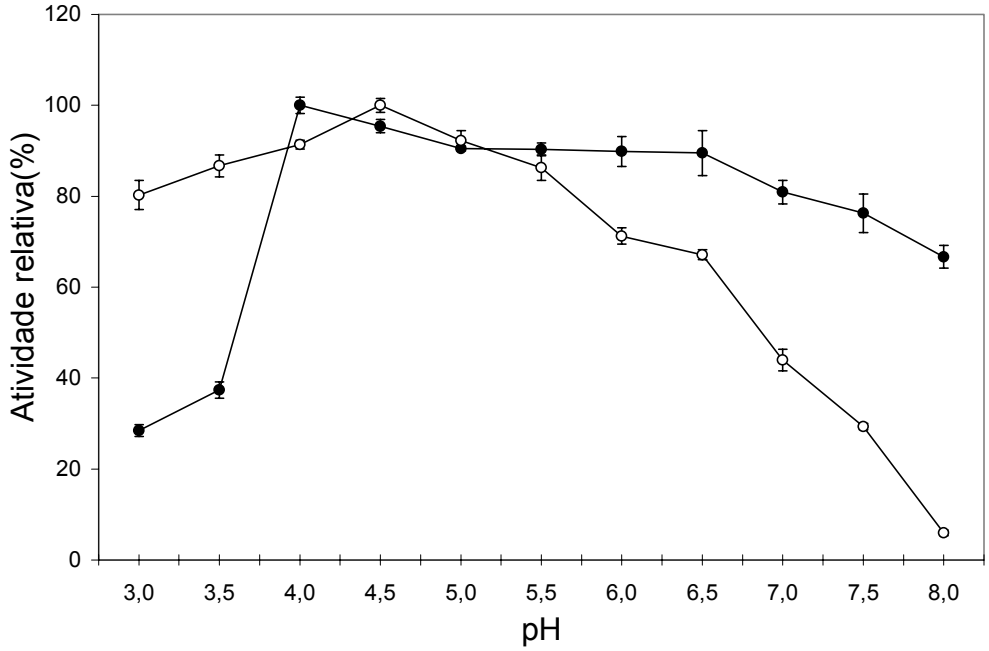

Figura 11 - Efeito do pH na atividade das enzimas α-galactosidase contida nas células imobilizadas (•) e livres (o) de *D. hansenii* UFV-1. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade obtida no pH ótimo de cada enzima como 100%.

Mudança do valor de pH ótimo para um valor mais ácido, após a imobilização em alginato de cálcio, também foi relatado por Adami *et al*. (1988) para células de *Trichosporon pullulans* utilizadas na hidrólise do dissacarídeo celobiose. Segundo esse autor, esta mudança pode ser explicada, em parte, pelo efeito do micro ambiente na matriz do gel de alginato de cálcio, particularmente devido à presença de cargas positivas dos íons Ca^{++} no suporte.

4.3.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* foi testado na faixa entre 30 e 80°C.

De acordo com os resultados, verificou-se que a elevação da temperatura promoveu aumento da atividade enzimática, atingindo o máximo em 70°C. Após

este valor, aumentos na temperatura resultaram em diminuição da atividade enzimática. Na temperatura de 80°C, a enzima manteve 82% da sua atividade máxima (Figura 12).

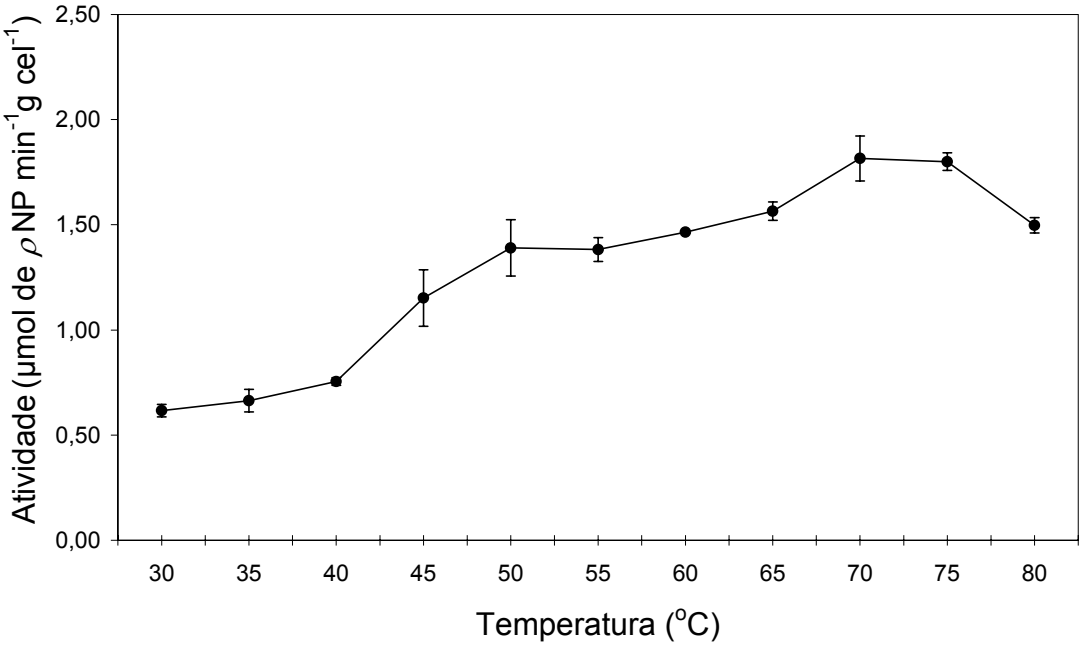

Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade da α-galactosidase contida em células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, em pH 5,0.

Como apresentado na Figura 13, na temperatura ótima da α-galactosidase contida nas células imobilizadas, 70°C, a enzima contida nas células livres manteve apenas 46% de sua atividade máxima. Na temperatura de 80°C, α-galactosidase contida nas células imobilizadas manteve 82% de sua atividade máxima, enquanto que a enzima contida nas células livres não possuía mais atividade. Como apresentado na Figura 13, a α-galactosidase contida nas células imobilizadas apresentou atividade máxima na temperatura de 70°C, enquanto que para a enzima contida nas células livres a temperatura ótima foi 60°C, ou seja, uma mudança de 10 unidades na temperatura ótima das α-galactosidases.

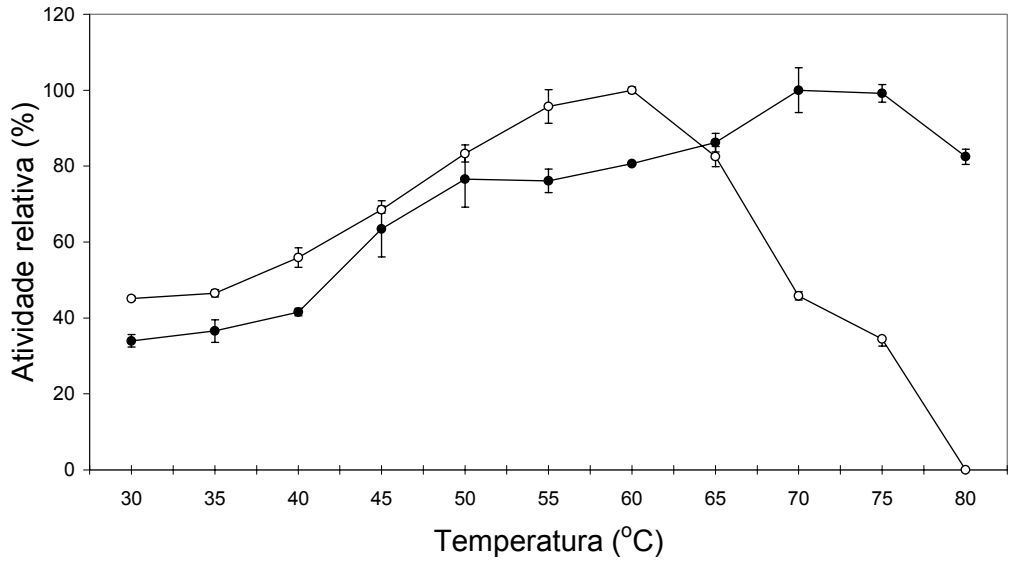

Figura 13 - Efeito da temperatura na atividade das α-galactosidases contidas nas células imobilizadas (•) e livres (o) de *D. hansenii* UFV-1. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade obtida na temperatura ótima de cada enzima como 100%.

Comportamento muito semelhante foi relatado por Viana (2005) para as α-galactosidases extracelulares de *D. hansenii*, livre e imobilizada em sílica. Entretanto o valor de temperatura ótima da enzima extracelular imobilizada foi de 80°C, superior ao valor de 70°C encontrado para α-galactosidase contida nas células de *D. hansenii* imobilizadas em alginato. Prashanth; Mulimani (2004) também relataram mudança no valor de temperatura ótima para a α-galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae*, a qual mudou de 50 para 57°C, quando a enzima foi imobilizada em alginato de cálcio.

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

4.3.3. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 60 e 70°C, por vários tempos. Inicialmente, foi observado aumento na atividade enzimática quando as células imobilizadas foram pré-incubadas por 5 h a 60°C. A enzima apresentou 213% da sua atividade

original após 72 h, a 60°C (Figura 14). Aumento semelhante da atividade enzimática foi observado quando as células imobilizadas foram pré-incubadas por 5 h na temperatura de 70°C. A enzima exibiu 157% da sua atividade original após incubação a 70°C, por 72 h. (Figura 14).

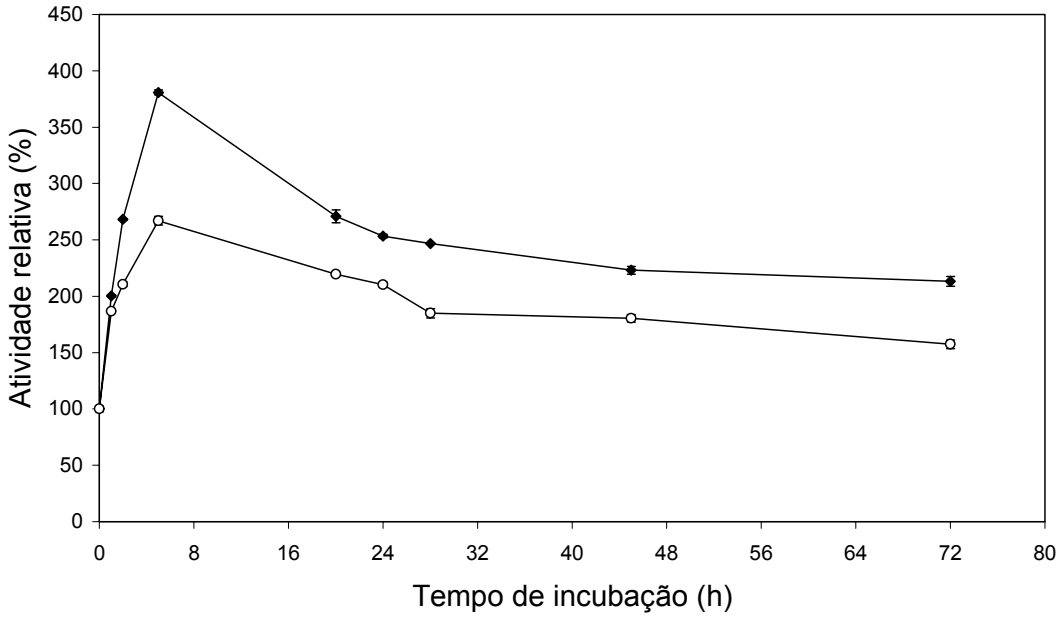

Figura 14 – Efeito da temperatura na estabilidade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1. As amostras foram pré-incubadas nas temperaturas de 60°C (•) e 70°C (o). As atividades relativas foram calculadas considerando-se atividade sem pré-incubação como 100%

Durante os ensaios de termoestabilidade foi observado que o volume das esferas de alginato aumentava conforme o tempo de pré-incubação, havendo aumentos de 50 e 100% do volume, com 2 e 5 h de incubação, respectivamente. O gel de alginato, assim como outros hidrogéis, possui em sua estrutura grupos hidrofílicos carregados. Em solução aquosa estes grupos são capazes de absorver água, com conseqüente aumento de volume das partículas do gel (SUDIPTO *et al.*, 2002). A tendência termodinâmica de absorver água é aparentemente contrabalanceada pela força resultante das ligações cruzadas dentro da rede tridimensional do gel. A transferência das esferas de alginato de alginato da temperatura de armazenamento, 4ºC, para as temperaturas dos ensaios, 60 e 70ºC, certamente promoveu um aumento da energia (térmica e

cinética) das moléculas do gel. A energia doada a essas moléculas provavelmente foi suficiente para romper algumas das ligações cruzadas entre os átomos de cálcio e as moléculas do alginato. A diminuição do número dessas ligações cruzadas leva ao afrouxamento da rede tridimensional facilitando a absorção de água pelo gel.

Dessa forma, o aumento da atividade de α-galactosidase observado quando as esferas de alginato foram pré-incubadas a 60 e 70ºC, provavelmente foi decorrente do aumento do volume das esferas de alginato, devido ao aumento do tamanho dos poros dentro da matriz do gel de alginato, o que levou à diminuição das dificuldades de difusão de substrato e produto.

Saraydin *et al.*, (2002) trabalhando com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de acrilamida-ácido maléico para produção de álcool etílico, relataram que a produção do álcool aumentava, conforme crescia a capacidade do gel de absorver água e inchar ("swelling"), provavelmente devido a maior facilidade de transporte de nutrientes para dentro do gel.

A atividade da α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* também foi avaliada na temperatura de 4°C, durante 45 dias. Após este período a enzima manteve 89% de sua atividade original.

4.3.4. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

O efeito da concentração do substrato ρNPαGal na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *D. hansenii*, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten.

Os valores de $K_{M\ app.}$ e da velocidade máxima $V_{max\ app}$ para este substrato foram 0,82 mM e 3,88 µmol de ρNP min^{-1} g célula^{-1} respectivamente (Figura 15).

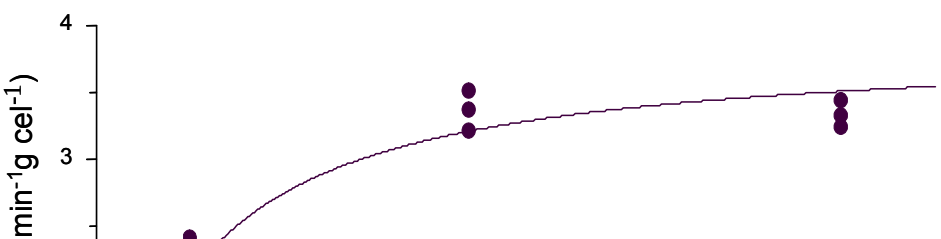

Figura 15 – Efeito da concentração do substrato ρNPαGal na velocidade da reação catalisada pela α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1.

Como apresentado na Figura 9, a α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres apresentou um valor da $K_{M\ app}$ menor, 0,30 mM, para o substrato ρNPαGal quando comparado com o valor de 0,82 mM para a enzima contida nas células permeabilizadas e imobilizadas (Figura 15). Prashanth; Mulimani (2004) também relataram alteração de 0,83 para 1,42 mM no valor da $K_{M\ app}$ para o substrato ρNPαGal, quando a α-galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em alginato de cálcio. Segundo Bodalo *et al.* (1991), o valor da K_M aumentava de 0,28 para 0,44 mM após a imobilização da enzima β-galactosidase em alginato de cálcio.

PARTE 4

HIDRÓLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE PELA α-GALACTOSIDASE CONTIDA NAS CÉLULAS DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1

4.4.1. Hidrólise do oligossacarídeo rafinose pela α-galactosidase contida nas células de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Para estudar a capacidade de hidrólise do oligossacarídeo rafinose pela enzima α-galactosidase contida nas células permeabilizadas, livres e imobilizadas de *D. hansenii*, os ensaios de hidrólise foram realizados conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos e a eficiência da hidrólise avaliada através da quantificação de açúcar redutor formado, conforme o item 3.6.2 de Material e Métodos.

4.4.1.1. Hidrólise de rafinose pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii* reduziu 66,50% da concentração de rafinose com em 2 h de ensaio. Com 4 h e 6 h de ensaio, a concentração de rafinose foi reduzida em 76,08 e 78,54%, respectivamente, e com 20 h, 96,34% da rafinose em solução foi hidrolisada (Tabela 6).

Tabela 6 - Hidrólise da rafinose 10 mM pela α-galactosidase contida em células permeabilizadas livres de *D. hansenii* UFV-1.

Tempo de hidrólise (h)	Concentração de açúcar redutor (mM) ± DP	Redução de rafinose (%)
0	0,00	0,00
2	6,65 ± 0,21	66,50
4	7,61 ± 0,11	76,08
6	7,85 ± 0,10	78,54
20	9,63 ± 0,19	96,34

Esses resultados mostram que as duas primeiras horas de ensaio foram as mais efetivas para a hidrólise da rafinose.

Uma possível explicação para a diminuição da taxa de reação seria a inibição da α-galactosidase contida em células de *D. hansenii* pela galactose formada e acumulada em solução, como produto da reação de hidrólise da rafinose. Galactose é descrita como um inibidor de várias α-galactosidases. Prashanth; Mulimani (2004) relataram que a α-galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* apresentou comportamento semelhante para a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose em leite de soja, provavelmente devido ao efeito de inibição pelo produto galactose. Guimarães *et al.* (2001) e Viana (2005) estudando o efeito de vários açúcares na atividade das α-galactosidases de soja e purificada de *D. hansenii* relataram que D-galactose foi um inibidor competitivo e acompetitivo, respectivamente.

Também a diminuição do poder de hidrólise pode ter sido devido à crescente perda da estabilidade da enzima, decorrente do longo período de incubação em temperatura elevada, uma vez que a enzima manteve aproximadamente 50% de sua atividade quando incubada por 20 h a 60°C.

4.4.1.2. Hidrólise da rafinose pela α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *D. hansenii*, durante a primeira utilização, foi capaz de reduzir 53,92% da concentração de rafinose com 2 h de ensaio. Com 4 h e 6 h, a concentração de rafinose foi reduzida em 56,92 e 61,86%, respectivamente, e após 20 h, 75,54% da rafinose em solução foi hidrolisada (Tabela 7).

Tabela 7 - Hidrólise da solução de rafinose 10 mM pela α-galactosidase contida em células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, durante a primeira utilização.

Tempo de hidrólise (h)	Concentração de açúcar redutor (mM) ± DP	Redução de rafinose (%)
0	0,00	0,00
2	5,39 ± 0,14	53,92
4	5,69 ± 0,08	56,92
6	6,19 ± 0,07	61,86
20	7,55 ± 0,19	75,54

Esses dados mostram que a α-galactosidase contida nas células imobilizadas apresentou comportamento semelhante ao descrito para a α-galactosidase contida nas células permeabilizadas livres de *D. hansenii* (Tabela 6), sendo mais eficiente nas primeiras horas de ensaio.

Como apresentado nas Tabelas 6 e 7, a α-galactosidase contida em células livres de *D. hansenii* reduziu 96,34% da concentração de rafinose em 20 h de ensaio, enquanto que a enzima contida nas células imobilizadas, nesse mesmo tempo, reduziu 75,54% na primeira utilização (Tabela 7). Apesar de ter apresentado um menor percentual de redução de rafinose, o que pode ser explicado pela dificuldade de difusão de substratos e produtos em decorrência do processo de imobilização das células em alginato, as células imobilizadas podem ser reutilizadas, tornando o processo geral mais eficiente e vantajoso.

Dessa forma, foi avaliada a eficiência de hidrólise da rafinose, reutilizando mais duas vezes as células imobilizadas de *D. hansenii* (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Hidrólise da solução de rafinose 10 mM pela α-galactosidase contida em células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, durante a segunda utilização.

Tempo de Hidrólise (h)	Concentração de açúcar Redutor (mM) ± DP	Redução de Rafinose (%)

0	0,00	0,00
2	5,36 ± 0,04	53,60
4	5,70 ± 0,44	57,00
6	5,70 ± 0,49	57,00
20	5,78 ± 0,30	57,82

Tabela 9 - Hidrólise da solução de rafinose 10 mM pela α-galactosidase contida em células imobilizadas de *D. hansenii* UFV-1, durante a terceira utilização.

Tempo de hidrólise (h)	Concentração de açúcar redutor (mM) ± DP	Redução de rafinose (%)
0	0,00	0,00
2	5,65 ± 0,02	56,50
4	5,72 ± 0,11	57,20
6	5,85 ± 0,12	58,50

Como mostrado nas Tabelas 8 e 9, mesmo com três utilizações das células imobilizadas, não houve perda expressiva da capacidade de hidrólise do açúcar rafinose. Esses dados confirmam que a perda da atividade enzimática decorrente do processo de imobilização das células em alginato pode ser compensada pela reutilização das mesmas.

Alteriis *el al*. (2004) trabalhando com células de *Kluyveromyces lactis* imobilizadas em alginato de cálcio, para a produção da enzima glucoamilase, relataram que o nível de produção da enzima pelas células imobilizadas se mantinha inalterado durante uma semana de uso em bioreator. Wang *et al*. (1998) trabalhando com células de *Absidia orchidis* contendo a enzima β-hidroxilase e imobilizadas em alginato de cálcio, para a síntese do antiinflamatório hidrocortisona, relataram alta estabilidade das células imobilizadas que foram utilizadas por 6 vezes sem nenhuma perda significante de atividade. Ettayebi *et al*. (2003), imobilizaram células de *Candida tropicalis* em alginato de cálcio, para a biodegradação de polifenóis em efluente da indústria de óleo de oliva. Os autores

relataram que a imobilização em alginato cálcio protegia as células contra os efeitos tóxicos dos fenóis, permitido que a capacidade de biodegradação dos fenóis fosse estável por 20 ciclos de fermentações.

4.4.2. Hidrólise de RO em extrato hidrossolúvel de soja pela α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Uma vez que foram estabelecidas a melhores condições de permeabilização e imobilização das células de *D. hansenii*, as células permeabilizadas e imobilizadas foram avaliadas quanto à capacidade em reduzir os oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes no leite de soja. O ensaio para hidrólise de RO presentes no leite de soja foi realizado conforme descrito no item 3.10, seguido da extração de RO (item 3.11) e análise de RO por CLAE (item 3.12). A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no leite de soja, em função do tempo de incubação com as células imobilizadas.

Os resultados estão apresentados na Figura 16 e os valores das porcentagens de redução dos RO estão mostrados na Tabela 10.

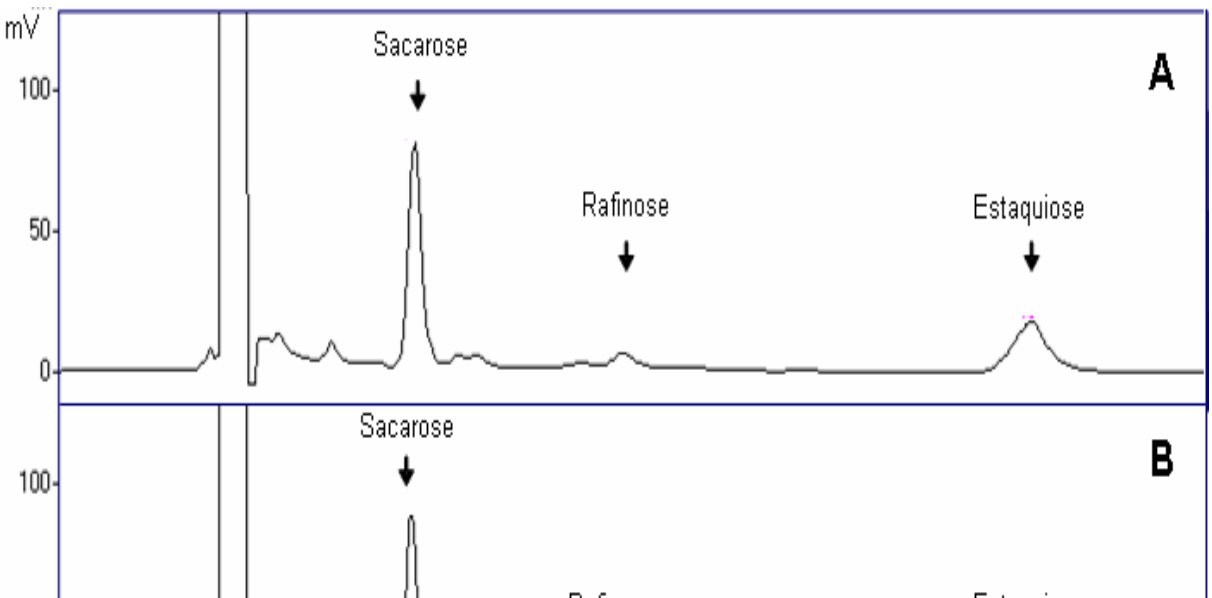

Figura 16 - Cromatograma comparativo da hidrólise de RO no leite de soja pela enzima α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* nos tempos 0 h **(A)**, 3 h **(B)** e 6 h **(C).**

Tabela 10 – Concentração dos açúcares solúveis presentes no leite de soja tratado com a enzima α-galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii*

Tempo de hidrólise (h)	Concentração (mg%)* ± DP		
	Rafinose	Estaquiose	Sacarose
0	0,79 ± 0,05	5,84 ± 0,99	8,78 ± 0,47
3	0,59 ± 0,04	0,39 ± 0,03	9,22 ± 2,36

6	0,0	0,0	11,75 ± 0,77

* mg de açúcar por 100 mg de extrato seco

O tratamento utilizado permitiu a redução de 25,57% dos teores de rafinose e 93,23% dos teores de estaquiose presentes no leite de soja, com 3 h de incubação a 60°C (Tabela 10). No período de 6 h de incubação a 60°C, 100% da rafinose e da estaquiose presentes no leite de soja foram hidrolisadas. Em concordância, os teores de sacarose, produto da hidrólise dos RO pela α-galactosidase, aumentaram (Figura 16), indicando principalmente atividade de α-galactosidase e não de invertase no processo. Esses resultados confirmaram o potencial das células permeabilizadas e imobilizadas de *D. hansenii* na redução dos teores desses açúcares no leite de soja.

As condições de tratamento do leite de soja estabelecidas nesse estudo, particularmente a permeabilização das células de *D. hansenii* anterior à imobilização, associada a agitação empregada durante o tratamento (100 rpm), provavelmente foram fatores que facilitaram o transporte dos substratos rafinose e estaquiose presentes no leite de soja para o interior das células, sendo estes hidrolisados pela α-galactosidase intracelular, e os produtos liberados no meio.

Viana (2005) utilizando células permeabilizadas de *D. hansenii* para hidrólise dos RO no leite de soja, relatou redução de 70% e 100% dos teores de rafinose e estaquiose, respectivamente, após 6 h de incubação a 60°C. Prashanth; Mulimani (2004) relataram que a α-galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de cálcio foi capaz de reduzir 81% dos oligossacarídeos de rafinose em 12 h a 50°C. A α-galactosidase de *Gibberella fujikuroi* imobilizada em gel de poliacrilamida reduziu 66% dos oligossacarídeos de rafinose após 3 h de incubação a 50°C (THIPPESWAMY; MULIMANI, 2002).

O processamento dos RO presentes no leite de soja, utilizado as células permeabilizadas e imobilizadas de *D. hansenii* demonstrou ser bastante eficiente, podendo ser altamente vantajoso para a indústria, pois elimina as etapas de extração e purificação da enzima, aumentando a praticidade do processo, gerando economia de tempo e de custos.

Esse processo também é bastante seguro, o que é extremamente interessante, visto que se destina à aplicação no tratamento de alimentos para

consumo humano e animal. Além da levedura *D. hansenii* não ser patogênica, o alginato, utilizado como suporte na imobilização das células, também não é tóxico, sendo ambos, levedura e alginato já encontrados normalmente em alimentos processados.

5. CONCLUSÕES

- Tratamentos excessivos para permeabilização das células da levedura, como excesso de agitação e ou tempo de contato prolongado com o solvente, levaram a diminuição da atividade de α-galactosidase.

- As células permeabilizadas apresentaram diminuição na atividade de α-galactosidase após a imobilização em alginato de cálcio.

- A imobilização das células permeabilizadas em alginato de cálcio promoveu alteração nos valores de pH e temperatura ótimos da α-galactosidase intracelular.

- A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas, livres ou imobilizadas apresentaram atividades máximas em pH ácido.

- A α-galactosidase, contida nas células permeabilizadas livres ou imobilizadas, demonstrou alta termoestabilidade.

- Incubação, em altas temperaturas, das células permeabilizadas e imobilizadas, promoveu aumento da atividade de α-galactosidase.

- A α-galactosidase contida nas células permeabilizadas e imobilizadas de *D. hansenii* foi eficiente na hidrólise dos RO presentes no extrato hidrossolúvel de soja, sugerindo grande potencial na utilização industrial, para processamento destes açúcares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, A.; CAVAZZOMI, V.; TREZZI, M.; CRAVERI, R. Cellobiose hydrolysis by *Trichosporon pullulans* cells immobilized in calcium alginate. **Biotechnology Bioengineering**, v.32, p.391-395, 1988.

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α-galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.

ALTERIIS, E.; SILVESTRO, G.; POLETTO, M.; ROMANO, V.; CAPITANIO, D.; COMPAGNO, C; PARASCANDOLA, P. *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase. **Journal of Biotechnology**, v.109, p.83-92, 2004.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A.M.; MENDEZ, J.B.; SISO, M.I.G. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.506 – 512, 2001.

BEKERS, M.; VENTINA, E.; KARSAKEVICA, A.; VINA, I.; RAPOPORT, A.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LINDE, R. Attachment of yeast to modified stainless steel wire spheres, growth of cells and ethanol production. **Process Biochemistry**, v.35, p.523-530, 1999.

BELLAVER, C.; SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. **Anais**. EMBRAPA-SPI, p.183-199, 1999.

BINTSIS, T.; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R.K. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.68–77, 2003.

BIRK, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seed-overview. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.44, p.26S–30S, 1996.

BOLUMAR, T.; SANZ, Y.; ARISTOY, M.C.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.227– 232, 2003a.

BOLUMAR, T.; SANZ, Y.; ARISTOY, M.C.; TOLDRÁ, F. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.141– 151, 2003b.

BODALO, A.; GOMEZ, E.; GOMEZ, J.L.; BASTIDA, M.F.; MÁXIMO, D.F. A comparison of different methods of β-galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v.26, p.349-353, 1991.

BUQUE, E.M.; CHIN-JOE, I.; STRAATHOF, A.J.J.; JONGEJAN, J.A.; HEIJNEN, J.J. Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology***,* v.31, p. 656-664, 2002.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A.; CRAVERI, R. α-Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.555-559, 1987.

CHAMPLUVIER, B.; KAMP, B.; ROUXHERT, P. Preparation and Properties of β-galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.611-617, 1988.

CLARK, A.H.; ROSS-MURPHY, S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**, v.83, p.57–192, 1987.

COOK, P.E. Fungal ripened meats and meat products. In G. Campbell-Platt and P.E. Cook (ed.); **Fermented meats**. Champman e Itall, London, United Kingdom, p.110-129, 1995.

CRUZ, R.; PARK, Y.K. Production of fungal α-galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. **Journal Food Science**, v.47, p.1973-1975, 1982.

DECLEIRE, M.; DE CAT, W.; HUYNH, N.V. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ β-galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.9, p.300-302, 1987.

DE LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. **Food Structure**, v.11, p.33-46, 1992.

DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.

DEY, P.M. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, **New York: Academic Press**, p.53-129, 1985.

DEY, P.M. In: Methods in plant biochemistry. **London: Academic Press**, p.189-218, 1990.

DUFFUS, C.M.; SLAUGHTER, J.C. Seeds and their uses. **New York: John Wiley**, p.1-34, 1980.

DURÁ, A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a glutaminase from *Debaryomyces hansenii* sp. **International Journal Food Microbiology**, v.76, p.117-126, 2002.

EISELT, P.; YEH, J.; LATVALA, R.K.; SHEA, L.D.; MOONEY, D.J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials**, v.21, p.1921–1927, 2000.

ELIKASES-LECHNER, F.; GINIZINGER, W. The yeast flora of surface-ripened cheeses. **Milchwissenschaft**, v.8, p.458-462, 1995.

ENCINAS, J.P.; LOPES-DÍAZ, T.M.; GARCIA-LOPEZ, A.O.; MORENO, B. Yeast populations on Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.54, p.203-208, 2000.

ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; JAMAI, L.; TAHRI-JOUTI M.A.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, M. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. **FEMS Microbiology Letters**, v.223, p.215-219, 2003.

FLORIDO, E.B.; GARIBAY, M.C.; RUIZ, L.G.; AZAOLA, A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.37, p.513-519, 2001.

FRÍAS, J.; DÍAZ-POLLÁN, C.; HEDLEY, C. L.; VIDAL-VALVERDE, C. Evolution and kinetics of monosaccharide, disaccharide and α-galactosides during germination of lentils. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung**, v.202, p.35–39, 1996a.

FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; KOZLOWSKA, H.; GORECKI, R.; HONKE, J.; HEDLEY, C. L. Evolution of soluble carbohydrates during the development of pea, faba bean and lupin seeds. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung**, v.203, p.27–32, 1996b.

FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H.; MIZUNO, H. Crystal Structure of Rice α-Galactosidase Complexed with D-Galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.20313-20318, 2003.

GARMAN, S. C.; HANNICK, L.; ZHU, A.; GARBOCZI, D. N. The 1.9 Å structure of α-N-acetylgalactosaminidase: molecular basis of glycosidase deficiency diseases. **Structure**, v.10, p.425–434, 2002.

GENARI, A.N.; PASSOS, F.V.; PASSOS, F.M.L. Configuration of a Bioreactor for Milk Lactose Hydrolysis. **Journal of Dairy Science,** v.86, p. 2783-2789, 2003.

GITZELMANN, R.; AURICCHIO, S. The handling of soy α-galactoside by a normal and galactosemic child. **Pediatrics**, v.36, p.231-232, 1965.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery**, v.31, p.267–285, 1998.

GRYTA, M. The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. **Desalination**, v.142, p.79–88, 2002.

GUIMARÃES, V.M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of α-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

HYAMS, D. Curve Expert 1.3: A comprehensive curve fitting system for Windows. Copyright ©, 1997.

HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R. L. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols-review and survey. **Seed Science Research**, v.4, p.385–405, 1994.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible benefical and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v.6, p.755-768, 1996.

JI, H.; MOURAD, H.; FRIED, E.; DOLBOW, J. Kinetics of thermally-induced swelling of hydrogels. **International Journal of Solids and Structures** , v.43, p.1878-1907, 2006.

JIN, Y.L.; SPEERS, R.A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International,** v.31, p.421-440, 1998.

JORDÃO, R.B.; BRANDI, I.V.; PASSOS, F.M.L. Stabilization of the activity of β-galactosidase in permeabilized immobilized cells for hydrolysis of lactose in milk. **Journal of Food Biochemistry**, v.25, p. 257-266, 2001.

KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R., The immobilization of whole cells-engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v.40, p.1321-1354, 1985.

KHARE, S.K.; KRISHNA, J. MUNISHWAR, N.G. Entrapment of wheat phytate in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.19, p.193-198, 1994.

KONDO, A.; LIU, Y.; FURUTA, M.; FUJITA, Y.; MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabization of recombinant flocculent yeast with alcohol. **Enzyme and Microbial Technoloy**, v.27, p.806-811, 2000.

KOTWAL, S. M.; GOTE, M. M.; KHAN, M. I.; KHIRE, J. M. Production, purification and characterization of a constitutive intracellular α-galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola sp*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.661-667, 1999.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v.21, p.377–397, 2004.

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

KUO, T. M.; VAN MIDDLESWORTH, F. K.; WOLF, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemisty**, v.36, p.32–36, 1988.

LARSSON, S.; JOHANSSON, L. A.; SVENNINGSSON, M. Soluble sugars and membrane lipids in winter wheats (*Triticum aestinum L.*) during cold acclimation. **European Journal of Agronomy**, v.1, p.85-90, 1993.

LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G.A. Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.434–438, 1998.

LÉPINGLE, A.; CASAREGOLA, S.; NEUVÉGLISE, C.; BON, E.; NGUYEN, H.-V.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; GAILLARDIN, C. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeast: 14. *Debaryomyces hansenii var hansenii*. **FEBS Letters**, v.487, p.82-86, 2000.

LIMA, A.W. O; ANGNES, L. Biocatálise em meios-aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas. **Química nova**, v.22, p.229-243, 1999.

LOWELL, C. A.; KUO, T. M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. **Crop Science**, v.29, p.459–465, 1989.

MARGARITIS, A.; MERCHANT, F.J.A. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.2, p.339–393, 1984.

MATHEW, C.D.; BALASUBRAMANIAM, K. Mechanism of action of α-galactosidase. **Phytochemistry**, v.26, p.1299-1300, 1987.

MESSINA, MJ. Legumes and soybeans overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.439-450, 1999.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry***,* v.31, p.426-428, 1956.

MIRALLES, G.; BAUDOIN, R.; DUMAS, D.; BAPTISTE, D.; HUBERT, P.; STOLTZ, J.F.; DELLACHERIE, E.; MAINARD, D.; NETTER, P.; PAYAN, E. J. Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: *In vitro* engineering of cartilage. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.57 p.268-278, 2001.

MONTEIRO, M.R.P. **Avaliação bioquímica e nutricional do extrato hidrossolúvel obtido de farinha de soja desengordurada e emulsificada.** Viçosa, MG: UFV, p.56 (Tese M.S), 2000.

MOREIRA, A.M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.99-104, 1999.

NAVARRO, J.M.; DURAND, G. Modification of yeast metabolism by immobilization on to porous glass. **European Journal of Applied Microbiology**, v.4, p.243-254, 1977.

NIGAM, S.; TSAO, I..; SAKODA, A.; WANG, H. Y. Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. **Biotechnology Techniques**, v.2, p.271-276, 1988.

NOBRE, A.; LUCAS, C.; LEÃO, C. Transport and Utilization of Hexoses and Pentoses in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii.* **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.35494-3598, 1999.

NORTON, S.; D'AMORE, T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.365-375, 1994.

NURSEVIN ÖZTOP, H.; YASEMIN ÖZTOP, A.; ERDENER KARADAĞ; YASEMIN IŞIKVER; DURSUN SARAYDIN. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.114-119, 2003.

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

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-319, 2000.

PARK, T.G; HOFFMAN, A.S. Immobilization of *Arthrobacter simplex* in a thermally reversible hydrogel: effect of temperature cycling on steroid conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.152-159, 1990.

PETERBAUER, T.; MACH, L.; MUCHA, J.; RICHTER, A. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum L.*) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. **Planta**, v.215, p.839–846, 2002.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v.11, p.185-197, 2001.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. **Plant Physiology**, v.117, p.165-172, 1998.

PETERSEN, K.M.; WESTALL, S.; JESPERSEN, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses, **Journal Dairy Science**, v.85, p.478-486, 2002.

PILKINGTON, P.H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N.A.; RUSSELL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v.104, p.19-31, 1998.

PRASHANTH, S.J.; MULIMANI, V.H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α-galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochemistry**, v.40, p.1199-1205, 2004.

SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Jr. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, v.83, p.185-189, 1987.

SARAYDIN, D.; OZTOP, H.N.; KARADAG, E.; OZTOP, A.Y.; ISIKVER, Y.; GUVEN, O. The use of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on radiation crosslinked acrylamide-maleic acid hydrogel carriers for production of ethyl alcohol. **Process Biochemistry**, v.37, p.1351-1357, 2002.

SHAPIRO, L.; COHEN, S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. **Biomaterials**, v.18, p.583–590, 1997.

SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. Chemical composition of the seed. In: A. K. Smith and S. J. Circle (ed.); **Soybeans**: Chemistry and technology, Westport: The AVI Publishing, v.1, p.61-92, 1972.

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

STANO, J.; TOKHTAEVA, E.; MICIETA, K.; FULMEKOVA, M.; VARADINOVA, M.; FOLTAN, V.; DURICEK, M. Melibiase in immobilized cells of watermelon. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, p.65-68, 2005.

STEGGERDA, F.R.; DIMMICK, J.F. Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.19, p.120-124, 1966.

STEGGERDA, F.R.; RICHARDS, E.A.; RACKIS, J.J. Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.121, p.1235-1239, 1974.

STEWART, G.G.; RUSSEL, I. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. **Journal of the Institute of Brewing**, v.92, p.537-558, 1986.

STRAUSS, M.L.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.182-190, 2001.

SUAREZ, F.L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J.K.; LOHRMANN, T.T.; KERR, P.S.; LEVITT, M.D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.135-139, 1999.

SUDIPTO, K. D.; ALURU, N. R.; JOHNSON, B.; CRONE, W. C.; BEEBE, D. J.; MOORWE, J. Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: models, experiments, and simulations. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v.11, p. 544-555, 2002.

THIPPESWAMY, J.S.; MULIMANI, V.H. Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α-galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v.38, p.635-640, 2002.

VAN DER SLUIS, C.; STOFFELEN, C.J.; CASTELEIN, S.J; ENGBERS, G.H; TER SCHURE, E.G.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Immobilized salt-tolerant yeasts: application of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for flavour production. **Journal of Biotechnology**, v.88, p.129-139, 2001.

VIANA, P. A. **Caracterização cinético-bioquímica e aplicações biotecnológicas de α-galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.170. (Tese M.S), 2005.

WANG, J.; CHEN, C.Z.; LI, B.A; ZHANG, J.; YU, Y. Production of Hydrocortisone from Cortexolone-21-Acetate by Immobilized *Absidia orchidis* in Cosolvent-Containing Media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.368-373, 1998.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo