
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração Microbiologia Aplicada

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
PECTINASES EXTRACELULARES
PURIFICADAS DE *Aspergillus giganteus***

Danielle Biscaro Pedrolli



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração Microbiologia Aplicada).

**Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração Microbiologia Aplicada**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
PECTINASES EXTRACELULARES
PURIFICADAS DE *Aspergillus giganteus***

Danielle Biscaro Pedrolli

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleonora Cano Carmona

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração Microbiologia Aplicada).

Março - 2008

Dedico esse trabalho ao meu marido Gerson, pelos 8 anos de muito carinho e paciência, e por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos pessoais

Agradeço ao meu maravilhoso maridinho Gerson, sem ele meu caminho teria sido muito mais difícil;

Aos meus pais Dulce e Edno, ao meu irmão Fabinho, aos meus dois anjinhos, meus primos Danilo e Marília, aos meus avós Hilde e Honorato, aos meus tios Ana e Edmo, por todo o amor que me deram;

À professora Eleonora, pela confiança e investimento em mim, e por tudo que me ensinou durante esses seis anos;

Ao meu amigo Maurício, pelo carinho e amizade de sempre;

À Carmem e ao Beto, pela amizade e por sempre estarem dispostos a me ajudar;

À Raquel, pela grande amizade e pela ajuda no início da minha iniciação científica;

A Talita e a Keli, por tornarem mais divertidos meus dias de trabalho;

Ao César, meu companheiro de laboratório e de cursinho, à Adriana e à Joyce, pelo convívio diário e pela ajuda que sempre me deram.

Ao Dayson, meu grande amigo, por tudo que passamos juntos durante nosso primeiro ano de graduação;

A uma amiga que fez minhas segundas e sextas feiras serem perfeitas neste ano de 2007, com quem eu aprendi muito em tão pouco tempo de amizade, à Katita;

A todos que me acompanharam durante os cinco anos que estive no Cursinho Práxis, coordenadores, professores e alunos.

Enfim a todos os amigos que encontrei durante os meus cinco anos de graduação e mais dois anos de mestrado em Rio Claro.

Agradecimentos técnicos

Agradeço a Fapesp, pelo apoio financeiro desde a graduação;
A CPKelco Limeira, pela doação de pectina.

ÍNDICE

	Página
1. Introdução.	1
1.1 Substâncias pécticas.	1
1.2 Enzimas pectinolíticas.	4
1.3 Pectinases microbianas.	6
1.4 Aplicações.	8
1.5 Fermentação submersa	10
1.6 Purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas	11
1.7 Famílias de PG e PL.	11
1.8 O fungo <i>Aspergillus giganteus</i>	12
2. Objetivos	14
3. Material e Métodos	16
3.1 Cultivo e manutenção da linhagem	16
3.2 Determinação das atividades enzimáticas	16
3.2.1 Atividade poligalacturonase	16
3.2.2 Atividade pectina liase	16
3.3 Determinação de proteínas.	17
3.4 Purificação da principal poligalacturonase.	17
3.4.1 Precipitação com sulfato de amônio.	17
3.4.2 Ensaio de teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica	17
3.4.3 Cromatografia de troca iônica	18
3.4.4 Cromatografia de exclusão molecular.	18
3.5 Purificação da pectina liase	19
3.5.1 Ensaio do teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH	19
3.5.2 Cromatografia de troca aniônica	19
3.5.3 Cromatografia de troca catiônica.	19
3.5.4 Cromatografia de exclusão molecular	20
3.6 Eletroforese.	20

3.7	Caracterização das enzimas purificadas	21
3.7.1	Influência do pH sobre as atividades PG e PL.	21
3.7.2	Influência da temperatura sobre as atividades PG e PL . . .	21
3.7.3	Estabilidade térmica das atividades PG e PL	21
3.7.4	Estabilidade em diferentes pHs das atividades PG e PL. . .	21
3.7.5	Identificação dos produtos de reação	22
3.7.6	Especificidade por substrato	22
3.7.7	Determinação dos parâmetros cinéticos.	22
3.7.8	Sensibilidade da atividade enzimática a determinadas substâncias.	23
4.	Resultados e Discussão.	24
4.1	Purificação da enzima poligalacturonase	24
4.1.1	Precipitação com sulfato de amônio.	24
4.1.2	Ensaio do teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica	26
4.1.3	Cromatografia de troca iônica	28
4.2	Caracterização da poligalacturonase purificada.	32
4.2.1	Determinação da massa molar da poligalacturonase.	32
4.2.2	Determinação do pH ótimo e temperatura ótima da atividade PG	32
4.2.3	Determinação da estabilidade térmica e em diferentes pHs da PG.	35
4.2.4	Especificidade por substrato da atividade PG.	37
4.2.5	Identificação dos produtos de hidrólise da PG	38
4.2.6	Parâmetros cinéticos da atividade PG.	39
4.2.7	Sensibilidade da atividade PG a diferentes substâncias	41
4.3	Purificação da principal pectina liase	43
4.3.1	Ensaio do teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica	43
4.3.2	Cromatografia de troca aniônica	46
4.3.3	Cromatografia de troca catiônica.	47
4.3.4	Cromatografia de exclusão molecular.	48

4.4 Caracterização da pectina liase purificada.	53
4.4.1 Determinação da massa molar da poligalacturonase.	53
4.4.2 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima da atividade PL I.	53
4.4.3 Determinação da estabilidade térmica e em diferentes pHs da PL I.	56
4.4.4 Especificidade por substrato da atividade PL I	58
4.4.5 Efeito do Ca^{2+} na atividade da PL I	58
4.4.6 Identificação dos produtos de hidrólise da PL I.	60
4.4.7 Parâmetros cinéticos da atividade PL I	62
4.4.8 Sensibilidade da atividade PL I a diferentes substâncias . . .	64
5. Conclusões	67
6. Referências Bibliográficas.	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura básica da molécula de pectina	3
Figura 2. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécticas.	5
Figura 3. Atividade PG no filtrado de cultura de <i>A. giganteus</i> em diferentes faixas de saturação com sulfato de amônio.	25
Figura 4. Perfil cromatográfico em DEAE Sephadex A-50 da poligalacturonase de <i>A. giganteus</i> presente no sobrenadante de precipitação com sulfato de amônio	28
Figura 5. Eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida de amostras contendo a PG de <i>A. giganteus</i>	31
Figura 6. Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade PG purificada.	33
Figura 7. Estabilidade térmica (a) e em diferentes pHs (b) da PG purificada.	36
Figura 8. Cromatograma em camada delgada dos produtos de hidrólise do ácido poligalacturônico e da pectina pela ação da PG de <i>A. giganteus</i>	39
Figura 9. Gráficos duplo-recíprocos para a reação catalisada pela poligalacturonase de <i>A. giganteus</i> sobre (a) ácido poligalacturônico e (b) pectina de citrus com 34 % de esterificação	40
Figura 10. Perfil cromatográfico em DEAE Sephadex A-50 da pectina liase de <i>A. giganteus</i> presente no filtrado bruto	46
Figura 11. Perfil cromatográfico em CM Sephadex C-50 da pectina liase de <i>A. giganteus</i> proveniente da cromatografia de troca aniônica	48
Figura 12. Eletroforese denaturante em gel gradiente de poliacrilamida (8-18 %) das amostras provenientes de: (a) DEAE Sephadex A-50; (b) CM Sephadex C-50 pico 2; (c) CM Sephadex C-50 PL I; (d) Sephadex G-100 pico 3 (PL I)	50

Figura 13. Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade PL I purificada.	54
Figura 14. Estabilidade térmica (a) e em diferentes pHs (b) da PL I purificada	57
Figura 15. Influência do Ca^{2+} sobre atividade PL I purificada de <i>A. giganteus</i>	59
Figura 16. Cromatograma em camada delgada dos produtos de reação da pectina de citrus pela ação da PL I de <i>A. giganteus</i>	61
Figura 17. Gráficos duplo-recíprocos para a reação catalisada pela PL I de <i>A. giganteus</i> sobre (a) pectina de citrus com 72 % de esterificação e (b) pectina de citrus com 34 % de esterificação.	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Teste em tubo para seleção do trocador iônico a ser utilizado na cromatografia de troca iônica para a purificação da poligalacturonase de <i>A. giganteus</i>	27
Tabela 2. Purificação da poligalacturonase de <i>A. giganteus</i>	30
Tabela 3. Comparação entre as condições ótimas de atividade de poligalacturonases purificadas.	34
Tabela 4. Atividade PG de <i>A. giganteus</i> sobre diferentes substratos.	37
Tabela 5. Parâmetros cinéticos da atividade PG de <i>A. giganteus</i> . . .	41
Tabela 6. Efeito de substâncias sobre a atividade PG de <i>A. giganteus</i>	42
Tabela 7. Teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica para purificação da pectina liase de <i>A. giganteus</i>	45
Tabela 8. Purificação da pectina liase de <i>A. giganteus</i>	52
Tabela 9. Comparação entre as condições ótimas de atividade de liases purificadas	55
Tabela 10. Atividade PL I de <i>A. giganteus</i> sobre diferentes substratos.	58
Tabela 11. Parâmetros cinéticos da atividade PL I de <i>A. giganteus</i> . .	64
Tabela 12. Efeito de substâncias sobre a atividade PL I de <i>A. giganteus</i>	65

RESUMO

O fungo *Aspergillus giganteus* produz uma única poligalacturonase (PG) quando cultivado em meio líquido com pectina de citrus como única fonte de carbono, e pelo menos três pectina liases (PL) quando cultivado em meio líquido com resíduo de laranja como fonte de carbono. A PG de *A. giganteus* foi purificada em duas etapas: precipitação de proteínas com 70% de saturação com sulfato de amônio e troca aniônica. A PG purificada apresentou massa molar de $69,7 \pm 0,07$ kDa. A máxima atividade da enzima foi observada em pH 6,0 a 55-60°C, sendo essa estável em meio neutro e alcalino. A PG apresentou meias-vidas de 115, 18 e 6 min quando incubada a 40, 50 e 55 °C, respectivamente. A enzima mostrou-se ativa sobre substratos de qualquer grau de metilação, com maior especificidade para substratos de baixa ou nenhuma metilação, apresentando $V_{\max}$ 669,6 e 602,8 $\mu\text{mol/mg.min}$, K_m 3,25 e 1,16 mg/mL, k_{cat} 770 e 690 s^{-1} sobre pectina de citrus 34 % esterificada e ácido poligalacturônico, respectivamente. A PG apresentou atividade exo liberando apenas ácido galacturônico como produto de hidrólise. 2-Mercaptoetanol, DTT, Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ e Na^+ agiram como estimulantes da atividade PG. Já Hg^{2+} , EDTA, citrato de sódio, ácido iodoacético, SDS, Ba^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} inibiram essa atividade enzimática. A principal pectina liase de *A. giganteus*, a PL I, foi purificada em três etapas: troca aniônica, troca catiônica e filtração em gel. A massa molar da PL I foi estimada em $55,7 \pm 1,4$ kDa. A máxima atividade da enzima foi obtida em pH 8,5 a 50°C. A PL I apresentou meias-vidas de 19, 9 e 6 min a 40, 45 e 50°C, respectivamente. As maiores atividades da PL I foram observadas em pectinas de citrus com 34 e 72% de metilação, nas quais apresentou $V_{\max}$ 1.488,1 e 1.129,8 U/mg.min, respectivamente, e K_m 4,8 mg/mL para ambos os substratos. O padrão de degradação da pectina de 34% indica ação endo, liberando mono-, di e trigalacturonatos. Co^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} induziram a atividade da PL I. Já Mn^{2+} , 2-mercaptoetanol, EDTA, ácido iodoacético, PMSF e SDS inibiram essa atividade enzimática.

ABSTRACT

Aspergillus giganteus produces one polygalacturonase (PG) on liquid medium with citrus pectin as the only carbon source, and at least three pectin lyases (PL) with orange waste. Homogenous PG was obtained after two steps: protein precipitation with 70 % ammonium sulphate saturation and anion-exchange chromatography. The purified PG showed molecular weight of 69.7 ± 0.07 kDa. The enzyme exhibited maximal activity at pH 6.0 and 55-60 °C, and was stable in neutral and alkaline medium. The half-life for PG at 40, 50 and 55 °C was 115, 18 and 6 min, respectively. The enzyme was active on substrates with any methyl-esterification degree, and hydrolysed better low esterified and not esterified substrates, showing $V_{\max}$ 669.6 and 602.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, K_m 3.25 and 1.16 mg/mL, k_{cat} 770 and 690 s^{-1} on 34 % esterified citrus pectin and polygalacturonic acid, respectively. The unique soluble product released in the reaction with pectin and polygalacturonic acid was monogalacturonic acid, and according to this results the enzyme can be classified as exoPG. PG activity enhanced in presence of 2-mercaptoethanol, DTT, Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ and Na^+ , and was completely inhibited in presence of Hg^{2+} . EDTA, sodium citrate, iodoacetic acid, SDS, Ba^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} inhibited enzyme activity. The main PL from *A. giganteus* was called PL I and was purified after three steps: anion-exchange and cation-exchange chromatographies, and gel filtration. The purified PL I showed molecular weight of 55.7 ± 1.4 kDa. The enzyme exhibited maximal activity at pH 8.5 and 50 °C, and was stable in neutral and acid medium. The half-life for PL I at 40, 45 and 50 °C was 19, 9 and 6 min, respectively. The enzyme was more active on citrus pectins with 34 and 72% of esterification, showing $V_{\max}$ 1,488.1 and 1,129.8 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively, and K_m 4.8 mg/mL on both substrates. The degradation pathern on 34% esterified pectin suggest PL I has endo activity. Co^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} enhanced PL I activity. However, Mn^{2+} , 2-mercaptoethanol, EDTA, iodoacetic acid, PMSF e SDS inhibited PL I.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de energia tem despertado a atenção para recursos renováveis, particularmente resíduos agrícolas e florestais, cujos maiores componentes são: celulose, amido, lignina, xilano e pectina. Estes materiais têm atraído considerável atenção por se tratarem de fontes alternativas de energia renováveis e suprimento alimentar, bem como por estarem abundantemente disponíveis. Muitos microrganismos são capazes de utilizar estas substâncias como fonte de carbono e energia, através da produção de diferentes enzimas em diferentes ambientes (ANTRANIKIAN, 1992; KAUR *et al.*, 2004).

1.1 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular e alta complexidade, encontradas em vegetais superiores. Formam a parede celular primária e são os principais componentes da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular encontrada entre as paredes celulares adjacentes de células vegetais jovens. São largamente responsáveis pela integridade e coesão dos tecidos vegetais (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; ALKORTA *et al.*, 1998).

Três grandes grupos de polissacarídeos pécticos são conhecidos, todos contendo ácido D-galacturônico em maior ou menor extensão (Figura 1). Homogalacturonana (HG) é um polímero linear que consiste em uma cadeia principal formada por ácido D-galacturônico, a qual pode encontrar-se acetilada e/ou metil-esterificada. Diferentes graus de esterificação podem ser apresentados pela HG: totalmente metil-esterificada (pectina), parcialmente metil-esterificada (ácido pectínico) ou isenta de metilação (ácido péctico ou poligalacturônico). Frequentemente utiliza-se o termo pectina para designar qualquer um dos três tipos de substâncias pécticas (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; NAIDU, PANDA, 1998; LANG, DÖRNENBURG, 2000). Ramnogalacturonana I (RGI) consiste em uma cadeia que alterna resíduos de ácido galacturônico com resíduos de ramnose, cadeias laterais de resíduos de açúcares neutros como galactose, arabinose e xilose podem ser encontradas ligadas covalentemente aos resíduos de galacturonato ou aos de ramnose. Ramnogalacturonana II (RGII), apesar do nome, possui cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de galacturonato (WILLATS *et al.*, 2006). Recente Vincken e colaboradores (2003) propuseram um modelo de estrutura da molécula de pectina em que HG e RGII seriam longas cadeias laterais ligadas a RGI.

Nos frutos verdes a pectina encontra-se em sua forma insolúvel (protopectina), associada a microfibrilas de celulose, o que confere rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, enzimas presentes no fruto alteram a estrutura da pectina tornando-a mais solúvel. Tais alterações envolvem quebra da cadeia da pectina ou das cadeias laterais (KASHYAP *et al.*, 2001).

Substâncias pécticas tendem a assumir uma estrutura de gel quando porções de HG estão interligadas, formando uma rede tridimensional cristalina na qual água e solutos ficam retidos. Muitos fatores podem determinar essa geleificação dentre eles a temperatura, tipo de pectina, grau de esterificação, grau de acetilação, pH, presença de cálcio, açúcares e outros solutos. Em pectinas de alta esterificação as zonas de junção são formadas pela interligação de HG através de pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre

grupos metoxil. Em pectinas de baixa esterificação essas junções são formadas pela ligação entre grupos carboxila livres através de íons cálcio (WILLATS *et al.*, 2006).

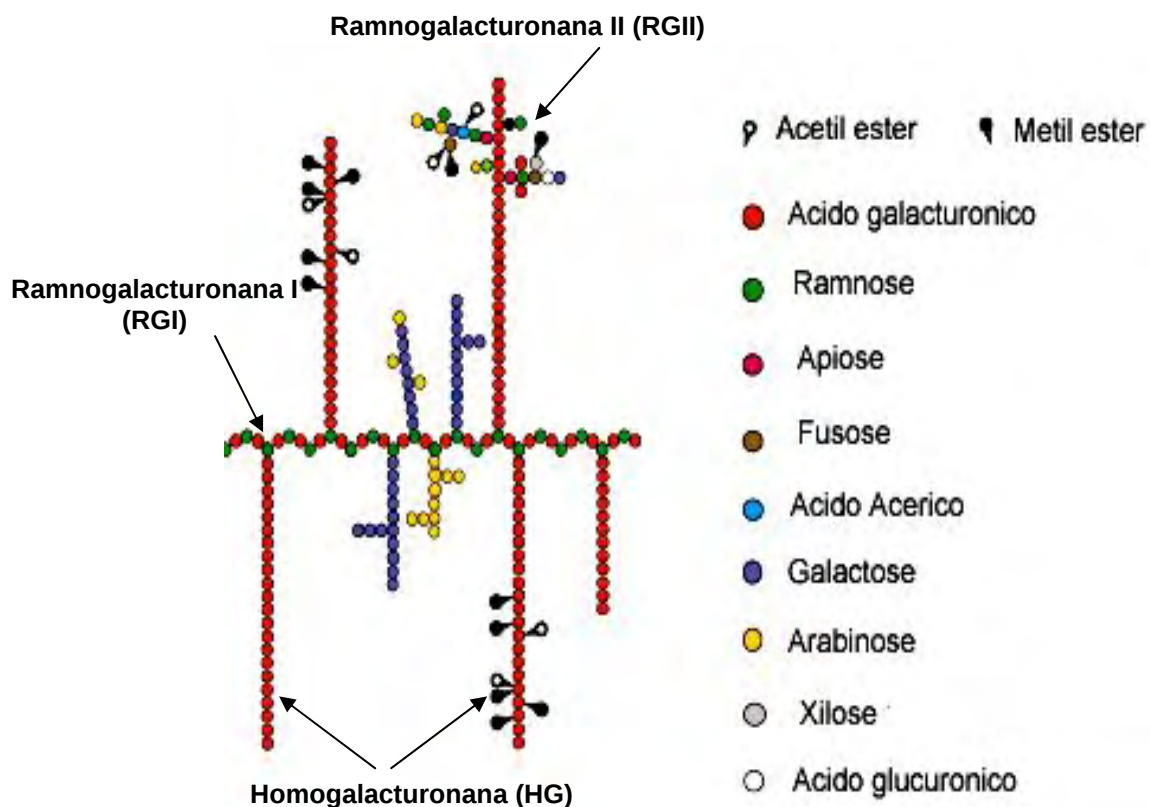


Figura 1. Estrutura básica da molécula de pectina (WILLATS *et al.*, 2006).

Pectina e polissacarídeos pécticos estão sendo considerados alimentos bioativos. Substâncias pécticas são usadas no setor farmacêutico como agentes desintoxicantes, e são bem conhecidas por seu efeito antidiarréico. A pectina, sendo um carboidrato coloidal, age como um lubrificante no intestino, revestindo a mucosa com polissacarídeo e promovendo peristalse normal sem causar irritação, o que faz dela um aditivo adequado a alimentos infantis (LANG, DÖRNENBURG, 2000).

1.2 Enzimas pectinolíticas

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal, através de reações de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases).

As enzimas pectinolíticas mais bem conhecidas e estudadas são aquelas que degradam as cadeias de HG da pectina.

As pectina metil esterases (PE) promovem a desesterificação dos grupos metoxil da pectina, produzindo metanol e ácido péctico. Estas enzimas agem, preferencialmente, em um grupo metil-éster de uma unidade de galacturonato próxima a uma outra não esterificada.

As pectina acetil esterases promovem a desacetilação das cadeias de HG da molécula de pectina.

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, e são classificadas de acordo com sua preferência pelo substrato: polimetilgalacturonases (PMG) agem sobre a pectina, preferencialmente com alto grau de metilação, liberando 6-metil-D-galacturonato; poligalacturonases (PG) agem sobre o ácido péctico (ácido poligalacturônico), liberando D-galacturonato. Os dois grupos são, ainda, subdivididos em endopectinases, as quais atuam ao acaso sobre ligações internas, e exopectinases, que removem moléculas de ácido D-galacturônico a partir da extremidade não redutora (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; KASHYAP *et al.*, 2001).

As liases catalisam a clivagem de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ por transeliminação. São divididas em: pectina liases (PL), que atuam sobre a molécula de pectina, produzindo unidades de 6-metil- Δ -4,5-D-galacturonato; e pectato liases (PGL), que clivam o ácido péctico, liberando Δ -4,5-D-galacturonato. Pectato liases possuem absoluta dependência de Ca^{2+} , sofrendo, portanto, forte inibição por agentes quelantes como EDTA. Já as pectina liases não apresentam tal dependência, porém podem ser estimuladas na presença de Ca^{2+} e outros cátions (JAYANI *et al.*, 2005).

As liases também são classificadas em endo e exopectinases (PITT, 1988; ROMBOUTS, PILNIK, 1980), porém todas as pectina liases descritas até hoje são endoenzimas (SINITSYNA *et al.*, 2007). A Figura 2 mostra um esquema da ação de várias formas de pectinases sobre o substrato.

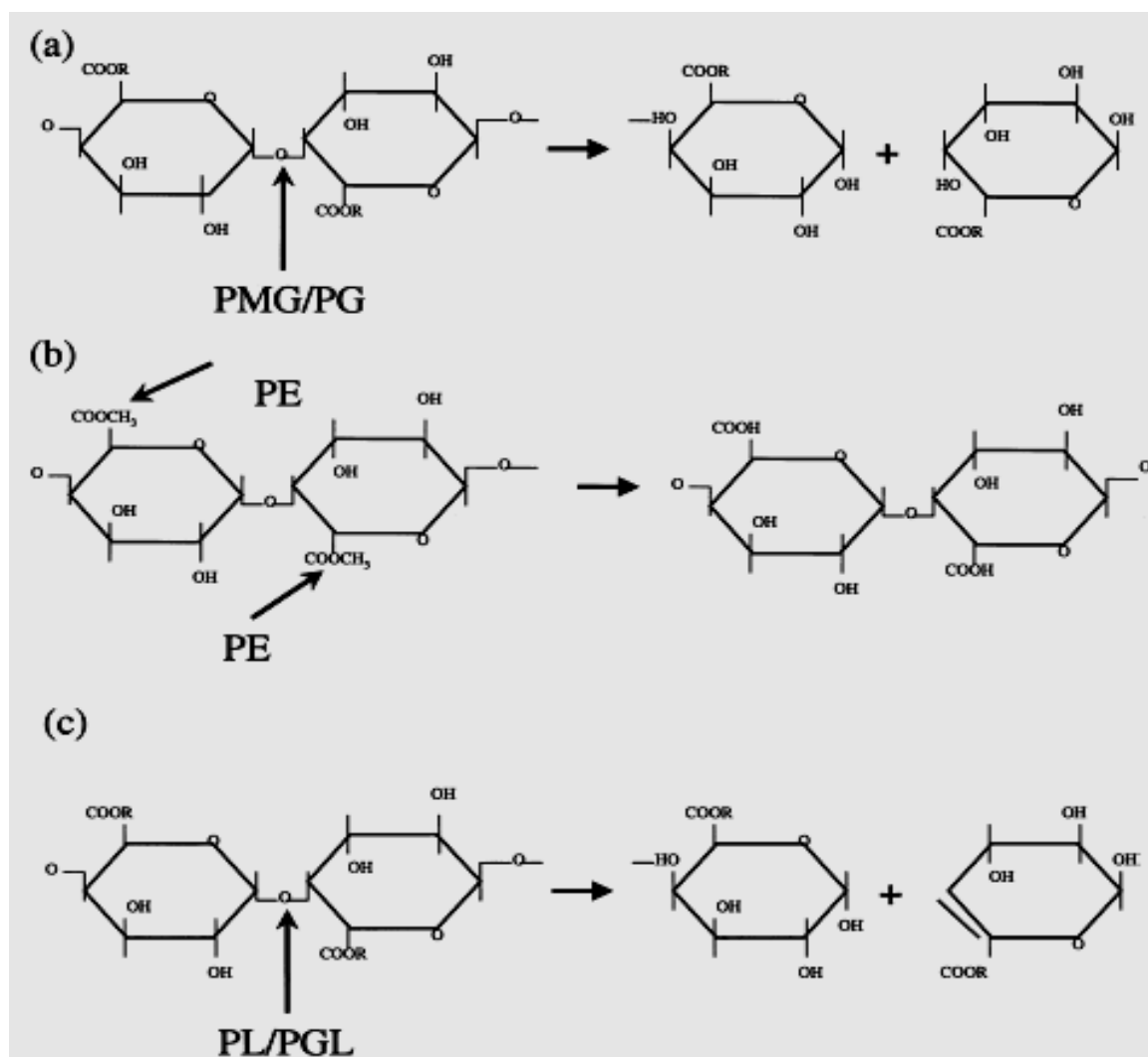


Figura 2. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécicas. (a) $R = H$ para PG e CH_3 para PMG, (b) PE e (c) $R = H$ para PGL e CH_3 para PL. A seta indica o lugar onde as pectinases atuam sobre as substâncias pécicas. PG: poligalacturonase, PMG: polimetilgalacturonase, PE: pectinesterase, PGL: pectato liase, PL: pectina liase (GUMMADI, PANDA, 2003).

A degradação completa da molécula de pectina envolve ainda a ação de enzimas que degradam a cadeia de ramnogalacturonana.

RG ramnohidrolases promovem a clivagem hidrolítica da cadeia de ramnogalacturonana liberando ramnose da extremidade não redutora (MUTTER *et al.*, 1994).

RG galacturonohidrolases liberam ácido galacturônico da extremidade não redutora da cadeia de ramnogalacturonana via hidrólise (MUTTER *et al.*, 1998).

RG hidrolases promovem a hidrólise de ligações internas em RG, liberando oligômeros saturados (MUTTER *et al.*, 1998).

RG liases promovem a transeliminação de ligações internas de RG entre um resíduo de ramnose e um de galacturonato, liberando um oligômero com um resíduo insaturado de galacturonato na extremidade não redutora, e um resíduo de ramnose na extremidade redutora do outro oligômero (MUTTER *et al.*, 1996).

RG acetilesterases promovem a hidrólise dos grupos acetil da molécula de ramnogalacturonana (SEARLE-VAN LEEUWEN *et al.*, 1992).

Xilogalacturonases promovem a clivagem hidrolítica da ligação entre resíduos de galacturonato que possuem cadeia lateral de xilose da molécula de RG, liberando dímeros xilose-ácido galacturônico (VLUGT-BERGMANS *et al.*, 2000).

1.3 Pectinases microbianas

Enzimas pectinolíticas são comuns na natureza, sendo produzidas por bactérias, fungos, leveduras, insetos, nemátodos, protozoários e plantas. Pectinases microbianas são importantes no processo de fitopatogênese, na simbiose e na decomposição da matéria vegetal, contribuindo para o ciclo natural do carbono. O ataque do patógeno à planta é normalmente iniciado por enzimas pécticas, devido ao fato das substâncias pécticas estarem mais acessíveis que outras fibras (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; HOONDAL *et al.*, 2002). Pectinases são abundantes entre os fungos saprofíticos, sendo que

tecidos mortos de plantas representam a maioria dos substratos para microrganismos produtores de poligalacturonases (LANG, DÖRNENBURG, 2000).

Estudos de produção de enzimas microbianas têm revelado múltiplas formas de pectinases, as quais diferem em sua massa molecular e nas suas propriedades cinéticas (DEVI, RAO, 1996; MINJARES-CARRANCO *et al.*, 1997; NAIDU, PANDA, 2003). Muitos microrganismos possuem mais que um gene codificador de PG. *Aspergillus niger*, um dos fungos mais estudados com relação à síntese de poligalacturonase, possui uma família completa de genes codificadores de PG, a qual produz várias isoenzimas com consideráveis diferenças em relação à especificidade por substrato, padrão de clivagem e pH ótimo de atividade (LANG, DÖRNENBURG, 2000; BUSSINIK *et al.*, 1992; PARENICOVA *et al.*, 1998). O entendimento da estrutura e da estabilidade destas isoenzimas possibilita o desenvolvimento de processos biocatalíticos economicamente mais competitivos (DEVI, RAO, 1996).

Como a pectina não pode entrar na célula microbiana, tem sido sugerido que compostos estruturalmente relacionados a este substrato podem induzir a produção de enzimas pecticas pelos microrganismos. Assim, a liberação de produtos de baixa massa molecular pela ação das enzimas pectinolíticas estimularia a síntese das mesmas (FRAISSINET-TACHET, FEVRE, 1996; COOPER, 1983).

Estudos de produção de poligalacturonase por *A. niger* (MALDONADO *et al.*, 1989a) e *Fusarium oxysporum* (DI PIETRO, RONCERO, 1998) mostraram que a síntese destas enzimas é induzida pela pectina assim como pelos ácidos poligalacturônico e galacturônico ao nível transcricional. Entretanto, a repressão catabólica da síntese de PG parece ocorrer ao nível traducional (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; MALDONADO *et al.*, 1989b).

A repressão catabólica da síntese de enzimas pectinolíticas pela glicose, frutose e intermediários da via glicolítica tem sido observada em muitos microrganismos (LEONE, VAN DEN HEUVEL, 1986; FRAISSINET-TACHET, FEVRE, 1996; RUNCO *et al.*, 2001; FAWOLE, ODUNFA, 2003).

Fungos filamentosos são amplamente utilizados pela indústria devido a sua capacidade de produzir eficientemente vários tipos de enzimas. Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm uma longa história de aplicação na indústria alimentícia e de bebidas (KAZUHIRO, 2002). As preparações de pectinases comerciais usadas no processamento de alimentos são, geralmente, derivadas de *Aspergillus* sp. e, tradicionalmente, são misturas de poligalacturonase, pectina liase e pectinesterase (LANG, DÖRNENBURG, 2000).

1.4 Aplicações

As pectinases podem ser utilizadas em uma grande variedade de processos industriais. Para tanto, é imprescindível o conhecimento das melhores condições de produção assim como o conhecimento das características físico-químicas destas enzimas (KIRK *et al.*, 2002).

Pectinases ácidas são amplamente utilizadas na extração, clarificação e despectinização de sucos de fruta, maceração de vegetais para produção de pastas e purês, e na fabricação de vinhos, sendo freqüentemente produzidas por fungos, especialmente por *Aspergillus niger*. O esmagamento de frutas ricas em pectina produz um suco com alta viscosidade, o qual permanece ligado à polpa na forma de uma massa gelatinizada. Isto dificulta a extração do suco de fruta por prensagem ou por outro método mecânico. Com a adição de pectinases, o suco de fruta é mais facilmente obtido e com maior rendimento, a viscosidade diminui e a estrutura de gel é desintegrada, havendo um aumento na sua capacidade de concentração (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). A extração de sucos através da maceração enzimática pode produzir um aumento no rendimento acima de 90 % se comparada ao processo mecânico convencional, além das melhorias nas características organolépticas (cor, sabor), nutritivas (vitaminas) e tecnológicas (melhor filtração) do suco (ROMBOUTS, PILNIK, 1980).

Em muitos processos, as enzimas pécticas são utilizadas em associação a outras enzimas, tais como celulasas e hemicelulasas (BHAT,

2000). A combinação de pectinases e celulases tem sido relatada por proporcionar um rendimento acima de 100 % no processamento de sucos (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). Soares e colaboradores (2001) obtiveram um aumento de 3 a 4 vezes no rendimento do suco de papaia, banana e pêra através da extração enzimática, comparada à convencional.

O tratamento enzimático pode reduzir em 62 % a viscosidade do suco de maçã. Quando este suco despectinizado é submetido a ultrafiltração, o fluxo de permeação é 3 vezes maior do que quando o suco não despectinizado é processado. Tal fato deve-se à redução da viscosidade do suco e à redução na quantidade total de pectina. A molécula de pectina causa severa obstrução da membrana de ultrafiltração (ALVAREZ *et al.*, 1998).

Pectinases alcalinas são, geralmente, produzidas por bactérias, principalmente *Bacillus* spp, sendo também produzidas por alguns fungos e leveduras (KAPOOR *et al.*, 2000; KASHYAP *et al.*, 2000; HOONDAL *et al.*, 2002). Podem ser utilizadas no pré-tratamento de águas residuais provenientes de indústrias de processamento de alimentos vegetais, contendo material pectináceo; preparo de fibras têxteis como linho, juta e cânhamo; fermentação de café e chá; extração de óleo vegetal; e tratamento da polpa de papel (KASHYAP *et al.*, 2001; HOONDAL *et al.*, 2002; KAPOOR *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000).

A biolimpeza (“bioscouring”) com enzimas pectinolíticas é uma alternativa ecologicamente mais correta para remover as impurezas não-celulósicas do algodão cru, tornando sua superfície mais hidrofílica. A pectina contribui para a hidrofobicidade do algodão cru e, sua degradação pelas enzimas pectinolíticas facilita a remoção das ceras e provoca uma considerável redução no consumo de água e produtos químicos e na quantidade de efluentes gerados. Em contraste às drásticas condições alcalinas comumente usadas, o tratamento com pectinases não afeta as cadeias de celulose e evita danos às fibras (KLUG-SANTNER *et al.*, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2006). Klug-Santner e colaboradores (2006) descreveram

a remoção uniforme de 80 % da pectina contida em tecido de algodão pela ação de uma endo-pectato liase purificada de *Bacillus pumilus* BK2.

Durante a produção de papel, o branqueamento alcalino da polpa com peróxido de hidrogênio solubiliza polissacarídeos, os quais interferem no processo. Parte destes polissacarídeos são pectinas ou ácidos poligalacturônicos. A habilidade do ácido poligalacturônico de se complexar com polímeros catiônicos (demanda catiônica) depende fortemente de seu grau de polimerização, sendo que, monômeros, dímeros e trímeros de ácido galacturônico não causam uma demanda catiônica mensurável, mas cadeias longas provocam altas demandas catiônicas. Pectinases podem despolimerizar o ácido poligalacturônico, e assim, diminuir a demanda catiônica de soluções de pectina e diminuir o filtrado do branqueamento com peróxido (REID, RICARD, 2000; REID, RICARD, 2004).

Segundo Angayarkanni e colaboradores (2002) a adição de pectinases associadas a celulasas, hemicelulasas e proteinases na fermentação da folha de chá aumenta em 5% os parâmetros de qualidade do chá.

A introdução de enzimas como catalisadores efetivos, trabalhando sob condições brandas, resulta em significativa conservação de recursos como energia e água para benefício tanto da indústria em questão, como do meio ambiente (KIRK *et al.*, 2002).

1.5 Fermentação submersa

A fermentação submersa é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica. É possível que haja uma estreita relação entre a morfologia da cultura de fungos, em fermentação submersa, e a produção de enzimas pelos mesmos (PIRT, 1975; COURI, 2003). Os organismos miceliais podem existir em duas formas diferentes: em agregados (pelletes), com hifas entrelaçadas, ou na forma de filamentos homogêneos dispersos no meio. Nesse último caso, cada hifa encontra-se exposta aos nutrientes deste meio. Já os agregados podem ser frouxos, permitindo um fluxo de meio entre as hifas entrelaçadas, ou

compactos, impossibilitando a penetração do substrato, exceto por difusão, sendo esta limitada pelo raio do agregado. Nos núcleos dos agregados compactos e dos agregados frouxos com grande diâmetro, as células tendem a sofrer autólise, perdendo assim seu citoplasma, causando maior heterogeneidade no agregado, se comparado à forma de filamentos. A determinação de uma ou outra forma das colônias parece estar relacionada a fatores como natureza do substrato, nutrientes contidos no meio e condições de cultivo como agitação e pH. É muito difícil deduzir as relações gerais entre as variações das condições de cultivo, a produção de metabólitos e a morfologia fúngica, já que muitos parâmetros influenciam essas interrelações, e as relações entre muitos desses parâmetros ainda não são bem compreendidas (PIRT, 1975; PAPAGIANNI, 2004).

1.6 Purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas

O estudo de uma enzima em estado bruto não indica se a degradação do substrato se deve à ação de uma única enzima ou a um sistema multienzimático agindo em sinergia. A purificação e caracterização de enzimas constituem linhas de pesquisa importantes, pois permitem a distinção entre os diferentes componentes do complexo enzimático e o conhecimento dos mecanismos de ação de cada um deles sobre o substrato, suas características bioquímicas e regulação.

Contreas-Esquivel e Voget (2004) purificaram a PGI de *Aspergillus kawakii* 470 vezes, com uma recuperação de 40 % da atividade inicial, utilizando uma estratégia de três etapas: precipitação com acetona, troca iônica em Q-Sepharose e filtração em Sephacryl S-100.

Martins e colaboradores (2007) obtiveram a purificação da única PG secretada por *Thermoascus aurantiacus* com um fator de 21 vezes e recuperação de 24,6 % após uma filtração em gel de Sephadex G-75, e troca iônica com SP Sepharose.

Celestino e colaboradores (2006) purificaram uma pectinase de *Acrophialophora nainiana* com atividade tanto exo-poligalacturonase, quanto

pectina liase, com um fator de 9,37 e recuperação de 60,6 % após as etapas de filtração em gel usando Sephacryl S-100, troca iônica em DEAE-Sepharose, e outra filtração em gel com Sephadex G-50.

A pectina liase do *Bacillus* sp. DT7 foi purificada por Kashyap e colaboradores (2000) 131,8 vezes após as etapas de precipitação com sulfato de amônio, troca iônica em DEAE-Sepharcel e filtração em gel de Sephadex G-150.

Como pode ser observado, as técnicas de purificação convencionais como precipitação de proteínas com sulfato de amônio ou solventes orgânicos, cromatografia de troca iônica e filtração em gel, tem sido eficientemente utilizadas na purificação de enzimas do complexo pectinolítico.

1.7 Famílias de PG e PL

As poligalacturonases são classificadas na família 28 das glicosil-hidrolases. Nesta família estão as endo-poligalacturonases (EC 3.2.1.15); exo-poligalacturonases (EC 3.2.1.67); exo-poligalacturonosidases (EC 3.2.1.82); ramnogalacturonases (EC 3.2.1.-) e as endo-xilogalacturonana hidrolases (EC 3.2.1). As enzimas desta família possuem, em seu sítio catalítico, um resíduo de aspartato funcionando como nucleófilo, e um outro atuando como doador de próton. A família 1 de polissacarídeo-liases aloja as endo-pectato liases (EC 4.2.2.2); as exo-pectato liases (EC 4.2.2.9) e as pectina liases (EC 4.2.2.10). Ambas as famílias apresentam em suas estruturas motivos de hélices β paralelas (<http://www.cazy.org/index.html>).

1.8 O fungo *Aspergillus giganteus*

Aspergillus giganteus é uma espécie do grupo Clavati (VARGA *et al.*, 2004), caracterizada por muitas estipes longas e colônias de diâmetro ligeiramente maior que as de *Aspergillus clavatus* (KLICH, PITT, 1988). Cresce em solução de ágar Czapek cerca de 5 a 6 cm, num período de 10 a 14 dias, à temperatura de 24 a 26 °C. O crescimento é caracterizado pela extensa

superfície, micélio vegetativo submerso e desenvolvimento precoce de abundantes conidióforos altos, que ao final do período de crescimento apresentam-se fototrópicos e, geralmente, são mais abundantes nas áreas marginais (RAPPER, FENNELL, 1965).

Os membros do grupo *Clavati* são comumente encontrados no solo de regiões tropicais e em alimentos como cereais (KLICH, PITT, 1988), desenvolvendo-se sobre esterco de vários animais, e sua presença no solo está freqüentemente associada a esses substratos (RAPPER, FENNELL, 1965).

Em linhagens de *A. giganteus* já foi verificada a produção de substâncias como esteróides, enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar óleo palmítico (RAPPER, FENNELL, 1965), ribotoxinas com atividade anti-tumoral (MARTINEZ-RUIZ *et al.*, 1999) e proteína antifúngica AFP (THEIS *et al.*, 2005). A linhagem de *Aspergillus giganteus* utilizada neste trabalho já foi caracterizada quanto à produção de xilanases (COELHO, CARMONA, 2003), e de pectinases (PEDROLI *et al.*, 2008; PEDROLI, 2005).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Purificar as principais poligalacturonase e pectina liase secretadas por *A. giganteus* nas melhores condições de cultivo já estabelecidas para obtenção de cada uma destas atividades;
- Determinar as seguintes propriedades físico-químicas das enzimas purificadas: massa molar, pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e em diferentes pHs, especificidade por substrato, parâmetros cinéticos, sensibilidade a íons metálicos e a agentes quelantes e identificar os produtos das reações catalisadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo e manutenção da linhagem

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem do fungo *Aspergillus giganteus* (CCT 3232) obtida de solo brasileiro, da Estação Ecológica da Juréia-Itatins, região da Mata Atlântica, Peruíbe, Estado de São Paulo (ATTILI, 1995). O referido fungo foi cultivado em meio sólido de Vogel contendo sacarose 1,5 % (m/v) e agar 1,5 % (m/v) (VOGEL, 1956). Após inoculação, as culturas foram incubadas por 7 dias a 28 °C e utilizadas como fonte de esporos.

Suspensões de conídios em água destilada esterilizada, contendo $1,0 \times 10^7$ esporos/mL, foram inoculadas em meio líquido de Vogel. O cultivo foi realizado nas condições ótimas de produção já estabelecidas para essas enzimas pectinolíticas. Para produção de poligalacturonase foi utilizado 1 % (m/v) de pectina de citrus (72 % de esterificação) como fonte de carbono em pH 3,5, e o cultivo foi realizado por 4,5 dias a 30 °C, sob agitação de 120 rpm. Para a produção de pectina liase utilizou-se 2 % (m/v) de resíduo de laranja, em pH 7,0, cultivo em condição estacionária por 8 dias a 30 °C.

O micélio foi separado por filtração a vácuo, e o filtrado de cultura (filtrado bruto) utilizado como fonte de pectinases extracelulares.

3.2 Determinação das atividades enzimáticas

3.2.1 Atividade poligalacturonase

A atividade poligalacturonase foi determinada por meio de incubação do filtrado de cultura ou da enzima purificada (20 a 200 μ L) com ácido poligalacturônico 1% (m/v) em tampão acetato de sódio pH 5,5 ou imidazol-NaOH pH 6,0 ambos a 0,05 M, em um volume final de 5 mL, a 55 °C, condição previamente determinada como ótima para a atividade PG de *A. giganteus* (PEDROLLI *et al.*, 2008). Em intervalos de tempo adequados, a reação foi interrompida com o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), e o substrato não hidrolisado foi separado da mistura por meio de centrifugação. Em seguida foi realizada a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), utilizando-se ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de grupos redutores por minuto.

3.2.2 Atividade pectina liase

A atividade pectina liase foi determinada de acordo com PITT (1988), nas condições ótimas previamente determinadas para a atividade PL de *A. giganteus* (PEDROLLI, 2005). O filtrado bruto, contendo pectina liase, ou a enzima purificada (0,333 mL), foi incubado com CaCl_2 0,1 M (0,333 mL) e pectina 1 % (m/v) em tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5 (1,67 mL), a 50 °C. Em intervalos de tempo adequados, a reação foi interrompida com solução de ZnSO_4 9 % (w/v), o meio de reação foi alcalinizado com NaOH 0,5 M, e o substrato restante foi separado por centrifugação. A 5 mL de sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,04 M, sendo o meio acidificado com 0,750 mL de HCl 0,1 M e por fim, 0,250 mL de água destilada foram acrescentados. A mistura foi aquecida em banho-maria de água fervente por 30 min e posteriormente resfriada. A quantificação do produto de reação foi realizada pela leitura da absorbância no comprimento de onda 550 nm. Uma

unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que aumenta em 0,010 a absorbância nesse comprimento de onda.

3.3 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Nas frações recolhidas das colunas de troca iônica e de filtração em gel, os níveis de proteína total foram estimados por medida da absorbância no comprimento de onda 280 nm.

3.4 Purificação da poligalacturonase

3.4.1 Precipitação com sulfato de amônio

O filtrado de cultura, obtido nas condições otimizadas para a produção de poligalacturonase, foi centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até 70 % de saturação. O precipitado foi separado por centrifugação e o sobrenadante foi dialisado contra tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 a 4 °C.

3.4.2 Ensaio do teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH

Para determinar as melhores condições de ligação da enzima à resina de troca iônica e sua recuperação, a amostra foi submetida a um teste em tubo de ensaio com uma resina catiônica, CM Sephadex C-50, e outra aniônica, DEAE Sephadex A-50. Para a resina catiônica foi utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M no intervalo de pH 4,0 - 5,5, e para a aniônica foram testados os pHs 6,0 a 7,0 com tampão imidazol-NaOH 0,05 M e de 7,0 a 8,0 com tampão Tris-HCl 0,05 M. A eluição foi realizada com 0,5 M de NaCl no

mesmo tampão, sendo determinadas as atividades enzimáticas no sobrenadante antes e depois da adição do sal.

3.4.3 Cromatografia de troca iônica

A amostra dialisada, contendo atividade poligalacturonase, obtida após a adição do sulfato de amônio, foi cromatografada em coluna de troca aniônica empacotada com a resina DEAE Sephadex A-50 (17 x 2,2 cm) e equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. O fluxo da coluna foi ajustado para 48 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinadas as atividades poligalacturonase nas frações eluídas. Foram reunidas as frações correspondentes ao pico de atividade.

3.4.4 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra de poligalacturonase obtida após a cromatografia de troca iônica foi liofilizada, dissolvida em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, e aplicada em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-100 (64 x 2,6 cm), equilibrada na mesma solução. O fluxo da coluna foi ajustado para 18 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinadas as atividades poligalacturonase das frações obtidas. Foram determinados os volumes das frações para se estimar o volume de eluição da poligalacturonase e sua massa molar, em relação aos padrões utilizados na calibração da coluna (fosforilase B 97 kDa, SAB 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa, lactalbumina 14,4 kDa).

3.5 Purificação da principal pectina liase

3.5.1 Ensaio do teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH

Para determinar as melhores condições de ligação da enzima à resina de troca iônica e sua recuperação, a amostra foi submetida a um teste em tubo de ensaio com uma resina catiônica, CM Sephadex C-50, e outra aniônica, DEAE Sephadex A-50. Para a resina catiônica foi utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M no intervalo de pH 4,0 - 5,5, e para a aniônica foram testados os pHs 6,0 a 7,0 com tampão imidazol-NaOH 0,05 M e de 7,0 a 8,0 com tampão Tris-HCl 0,05 M. A eluição foi realizada com 0,5 M de NaCl no mesmo tampão, sendo determinadas as atividades enzimáticas no sobrenadante antes e depois da adição do sal.

3.5.2 Cromatografia de troca aniônica

O filtrado bruto contendo atividade pectina liase foi dialisado contra tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 e cromatografado em coluna de troca aniônica empacotada com a resina DEAE Sephadex A-50 (17 x 2,2 cm) e equilibrada no mesmo tampão. O fluxo da coluna foi ajustado para 48 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinadas as atividades enzimáticas nas frações. Foram reunidas as frações correspondentes ao pico de atividade.

3.5.3 Cromatografia de troca catiônica

A amostra obtida após a etapa de cromatografia de troca aniônica foi dialisada contra tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e cromatografada em coluna de troca catiônica com resina CM Sephadex C-50 (17 x 2,2 cm), equilibrada no mesmo tampão. O fluxo da coluna foi ajustado para 48 mL/h,

sendo coletadas frações de 3,0 mL. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinadas as atividades enzimáticas nas frações eluídas. Foram reunidas as frações correspondentes aos picos de atividade.

3.5.4 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra de pectina liase correspondente a PL I, obtida após a cromatografia de troca catiônica, foi liofilizada, dissolvida em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, e aplicada em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-100 (64 x 2,6 cm), equilibrada na mesma solução. O fluxo da coluna foi ajustado para 18 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinadas as atividades pectina liase das frações obtidas. Foram determinados os volumes das frações para se estimar o volume de eluição da pectina liase e sua massa molar, em relação aos padrões utilizados na calibração da coluna (fosforilase B 97 kDa, SAB 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa, lactalbumina 14,4 kDa).

3.6 Eletroforese

A pureza e a massa molar das amostras obtidas após as etapas de purificação foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições denaturantes (PAGE-SDS), conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando-se gel gradiente, com concentração variando de 8 a 18 % (m/v). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 (v/v) em tampão de amostra (glicerol 27 % ,v/v; SDS 6 % ,m/v; azul de bromofenol 0,01 % ,m/v; em Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8), na presença de 10 % (v/v) de β -mercaptoetanol e aquecidas durante 5 min em água fervente. A eletroforese foi realizada sob corrente de 150 V em tampão Tris/glicina/SDS pH 8,3. Após a corrida, o gel foi fixado e corado com coomassie brilliant blue R-250 0,1 % (m/v), em metanol:

ácido acético: água (5: 2: 5, v/v/v), e descorado com a mesma solução, sem corante (HAMES, RICKWOOD, 1990).

3.7 Caracterização das enzimas purificadas

3.7.1 Influência do pH sobre as atividades PG e PL

Para se determinar o pH ótimo das atividades poligalacturonase e pectina liase purificadas, as amostras foram incubadas com o substrato, em tampões de diferentes valores de pH, sendo acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 – 5,5), imidazol-NaOH 0,05 M (pH 6,0 – 6,5) e Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0 - 8,0).

3.7.2 Influência da temperatura sobre as atividades PG e PL

As enzimas purificadas foram incubadas com substrato, no pH de máxima atividade para cada enzima, em diferentes temperaturas, de 35 a 75 °C, a fim de se determinar a temperatura ótima dessas atividades enzimáticas.

3.7.3 Estabilidade térmica das atividades PG e PL

A estabilidade térmica das enzimas purificadas foi avaliada como atividade residual, após sua incubação em temperaturas entre 40 e 55 °C, na ausência de substrato. Em determinados intervalos de tempo, foram retiradas alíquotas dessas amostras e imediatamente determinadas suas atividades.

3.7.4 Estabilidade em diferentes valores de pH das atividades PG e PL

A estabilidade em diferentes valores de pH foi determinada como atividade residual, após incubação das enzimas purificadas por 24 h, sem substrato, a 4 °C, em tampões de diferentes valores de pH, sendo glicina-HCl 0,05 M (pH 3,0 – 3,5), acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 - 5,5), imidazol-NaOH

0,05 M (pH 6,0 - 6,5), Tris-HCl 0,05 M (pHs 7,0 a 8,5), e glicina-NaOH 0,05 M (pH 9,0 – 10,0).

3.7.5 Identificação dos produtos de reação

A identificação dos produtos das reações catalisadas pelas enzimas purificadas foi realizada através de cromatografia em camada delgada em cromatoplasmas de sílica gel 60 (10 x 15 cm), utilizando-se ácido mono-, di- e trigalacturônico como padrões, e azul de timol 0,1 % como indicador. As cromatografias foram desenvolvidas duas vezes em cuba saturada com o sistema solvente acetato de etila/ ácido acético/ ácido fórmico/ água na proporção 9:3:1:4 (v). As revelações foram feitas com aplicação da solução orcinol 0,2 % em ácido sulfúrico e metanol (10: 90 mL) seguida de aquecimento a 105 °C em estufa por 5 min, conforme descrito por Fontana e colaboradores (1988).

3.7.6 Especificidade por substrato

A atividade PG foi avaliada em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 a 55 °C, utilizando-se como substrato ácido poligalacturônico, pectinas de citrus com 34, 72 e 90 % de esterificação, e pectina de maçã com 75 % de esterificação. Os mesmos substratos foram utilizados na avaliação da atividade PL, tendo sido a enzima, neste caso, incubada em tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5.

3.7.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade poligalacturonase foi avaliado incubando-se a enzima em diferentes concentrações de ácido poligalacturônico (0,4 a 6,0 mg/mL) e de pectina de citrus com 34 % de esterificação (2,0 a 14,0 mg/mL). Para a atividade pectina liase, tal efeito foi avaliado incubando-se a enzima em diferentes

concentrações de pectina de citrus com 34 % de esterificação (1,0 a 10,0 mg/mL) e de pectina de citrus com 72 % de esterificação (1,0 a 8,0 mg/mL).

As constantes Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima das reações (V_{max}) foram estimadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934).

3.7.8 Sensibilidade da atividade enzimática a determinadas substâncias

A sensibilidade das enzimas PG e PL purificadas a determinadas substâncias foi avaliada através da incubação dessas enzimas com substrato e tampão adequado, na presença das seguintes substâncias: NaCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, NH_4Cl , $BaCl_2$, $MnSO_4$, $CuCl_2$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, SDS (dodecil-sulfato de sódio), citrato de sódio, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), DTT (ditiotreitól), 2-mercaptoetanol, ácido iodoacético. As concentrações testadas para cada substância foram 2 e 10 mM, sendo que nos casos em que o sal testado provocou excessiva gelatinização do substrato, a concentração de 10 mM foi substituída por 5 mM, para o desenvolvimento da metodologia de determinação da atividade enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação da enzima poligalacturonase

4.1.1. Precipitação com sulfato de amônio

Foram realizadas precipitações com três amostras de 50 mL do filtrado bruto obtido nas condições otimizadas para a produção de poligalacturonase. Na primeira, foram utilizadas as faixas de saturação com sulfato de amônio de 0 a 30 %, 30 a 60 % e 60 a 90 %, sendo dosadas as atividades nos precipitados obtidos e no sobrenadante de 90 % de saturação. Como pode ser observado na Figura 3, a poligalacturonase começa a precipitar a partir de 60% de saturação com sulfato de amônio, e mesmo após 90 % de saturação ainda resta atividade enzimática no sobrenadante.

Considerando esse resultado, foi realizado um segundo experimento de precipitação, no qual foram testadas as faixas de 60 a 70 %, 70 a 80 % e 80 a 90 % de saturação, sendo dosadas as atividades apenas nos precipitados obtidos. Conforme mostra a Figura 3, uma quantidade insignificante da enzima (0,5 %) precipitou na faixa de 60 a 70 % de saturação, podendo-se considerar que a precipitação ocorreu de fato após 70 %.

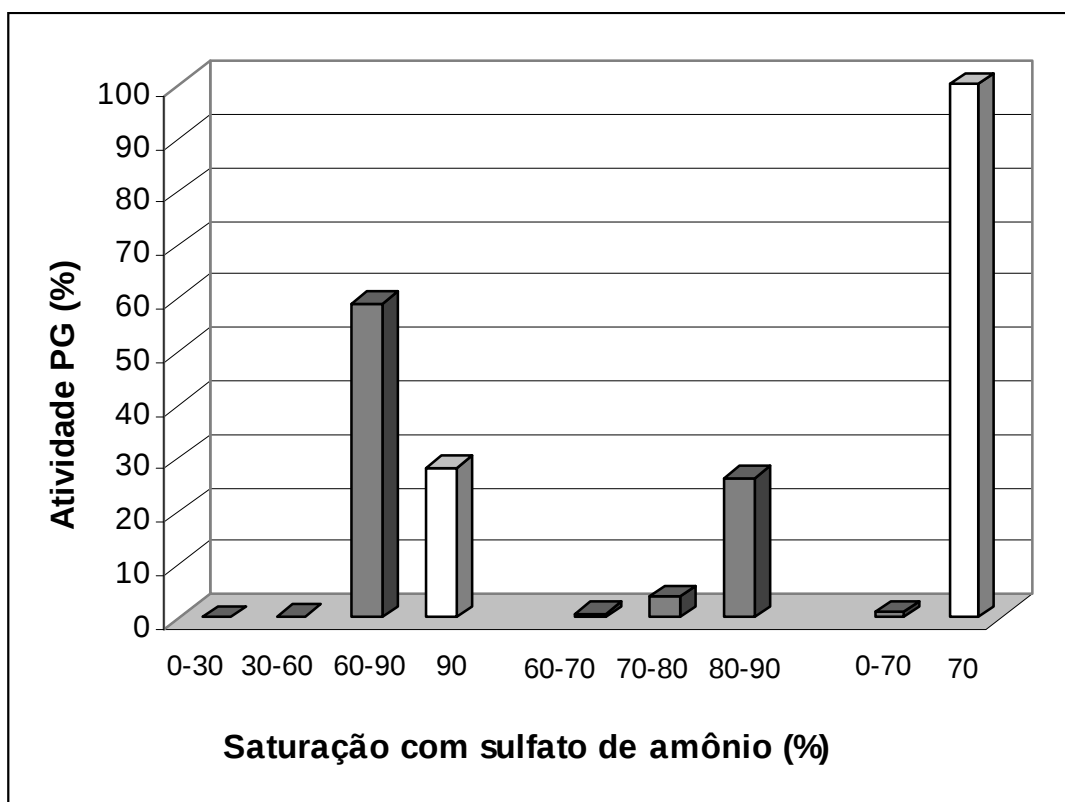


Figura 3. Atividade PG no filtrado de cultura de *A. giganteus* em diferentes faixas de saturação com sulfato de amônio. ■ precipitado; □ sobrenadante.

No terceiro experimento, a amostra foi saturada a 70 %, tendo sido dosada a atividade tanto no sobrenadante, quanto no precipitado. Novamente, uma fração de 0,5 % da atividade PG foi encontrada no precipitado de 70 %, permanecendo no sobrenadante 99,5 % da enzima. Optou-se então por utilizar o sobrenadante de 70 % de saturação com sulfato de amônio como primeira etapa de purificação. Apesar de não precipitar a PG, a saturação com 70 % de sulfato de amônio propiciou purificação da enzima, pois outras proteínas foram precipitadas e, portanto, eliminadas da amostra. Esta estratégia também se mostrou interessante por clarificar a amostra, eliminando alguns pigmentos que poderiam prejudicar o desenvolvimento das etapas seguintes.

4.1.2. Ensaio do teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica

O sobrenadante de 70 % de saturação com sulfato de amônio foi dialisado e equilibrado nos tampões utilizados no ensaio do teste em tubo: tampão acetato de sódio 0,05 M nos pHs 4,0 e 5,5, e Tris-HCl 0,05 M nos pHs 7,0, 7,5 e 8,0. Foram escolhidos pHs dentro da faixa 4,0 a 8,0 pois nessas condições a enzima possui alta estabilidade (PEDROLLI *et al.*, 2008), sendo que os pHs 6,0 e 6,5 não foram testados devido ao fato de que os tampões recomendados para cada resina nestes pHs afetam a atividade da enzima.

Os trocadores iônicos utilizados foram: o catiônico CM Sephadex C-50, e o aniônico DEAE Sephadex A-50.

A poligalacturonase foi totalmente adsorvida pela resina em pH 4,0 para trocador catiônico e pH 8,0 para aniônico (Tabela 1). Porém, em pH 4,0 a recuperação foi muito menor do que em pH 8,0, no qual a enzima é mais estável. Nos outros pHs testados houve apenas uma adsorção parcial da enzima.

Com base nos resultados obtidos pelo teste em tubo, a condição escolhida para o desenvolvimento de uma cromatografia de troca iônica como segunda etapa de purificação foram: resina DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão Tris-HCl pH 8,0.

Tabela 1. Teste em tubo para seleção do trocador iônico a ser utilizado na cromatografia de troca iônica para a purificação da poligalacturonase de *A. giganteus*.

Trocador	pH	Não adsorvida		Adsorvida e Recuperada	
		Atividade total (U)	Atividade relativa (%)	Atividade total (U)	Atividade relativa (%)
Catiônico	4,0	—	—	1,071	31,4
Catiônico	5,5	0,312	9,1	2,185	64,1
Aniônico	7,0	0,583	17,1	3,133	91,9
Aniônico	7,5	0,963	28,3	2,403	70,5
Aniônico	8,0	—	—	3,408	100

4.1.3. Cromatografia de troca iônica

O perfil de eluição da amostra na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50 está apresentado na Figura 4.

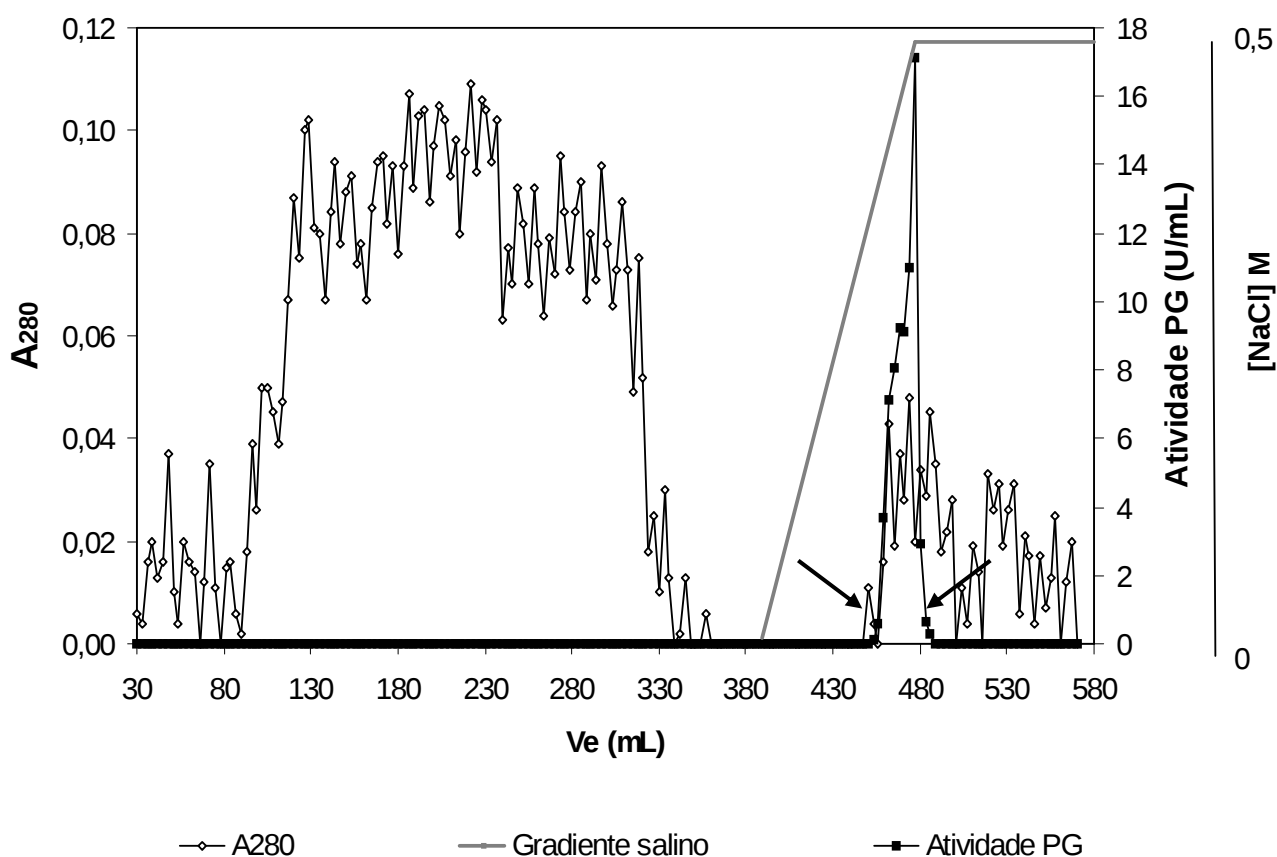


Figura 4. Perfil cromatográfico em DEAE Sephadex A-50 da poligalacturonase de *A. giganteus* presente no sobrenadante de precipitação com sulfato de amônio. Tampão: Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. As setas indicam a primeira e a última fração reunidas.

A enzima foi eluída em um único pico de atividade, fato que indica a secreção de apenas uma poligalacturonase pelo microrganismo nas condições de cultivo utilizadas. A produção de apenas uma forma de poligalacturonase não é fato comum entre os fungos pectinolíticos. Chellegatti e colaboradores

(2000) detectaram a produção de 11 PGs por *Penicillium frequentans* em meio com pectina, polipectato de sódio ou ácido monogalacturônico. Para *Botrytis cinerea* (CABANNE, DONÈCHE, 2002) e *Aspergillus carbonarius* (DEVI, RAO, 1996) foram descritas 2 e 3 isoformas de PGs, respectivamente.

É provável que, em condições de cultivo diferentes das utilizadas neste trabalho, o fungo *A. giganteus* possa produzir outras PGs. NITURE, PANT (2004) detectaram a secreção de apenas uma PG em cultivos em meio líquido de *Fusarium moliniforme*, porém em cultivos semi-sólidos, foi detectada a presença de uma segunda PG bioquimicamente distinta da primeira. A produção de várias enzimas capazes de degradar o mesmo substrato em diferentes condições constitui um mecanismo de adaptação dos microrganismos a diferentes ambientes.

A purificação da PG de *A. giganteus* foi obtida por uma estratégia de duas etapas: precipitação de proteínas com sulfato de amônio e troca iônica do sobrenadante da precipitação em DEAE Sephadex A-50, tendo-se obtido um fator de purificação final de 28,1 (Tabela 2).

Para a primeira etapa, utilizando-se o sobrenadante da precipitação com sulfato de amônio a 70 % de saturação, obteve-se purificação de 4,1 vezes e recuperação de 99,5 % da atividade inicial, sendo que a atividade específica foi elevada para 60,6 U/mg de proteína após esta etapa.

Tabela 2. Purificação da poligalacturonase de *A. giganteus*.

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto dialisado	242,7	16,3	14,9	100,0	1,0
Precipitação de proteínas com (NH ₄) ₂ SO ₄	241,5	4,0	60,4	99,5	4,05
DEAE Sephadex A-50 pH 8,0	209,7	0,5	419,4	86,4	28,1

A amostra obtida após a segunda etapa, uma troca iônica em DEAE Sephadex A-50 pH 8,0, apresentou uma atividade específica de 419,4 U/mg de proteína, tendo sido recuperada 86,4 % da atividade inicial total.

Como pode ser observado pela presença de uma única banda na Figura 5, a enzima apresentou homogeneidade eletroforética após essas duas etapas de purificação.

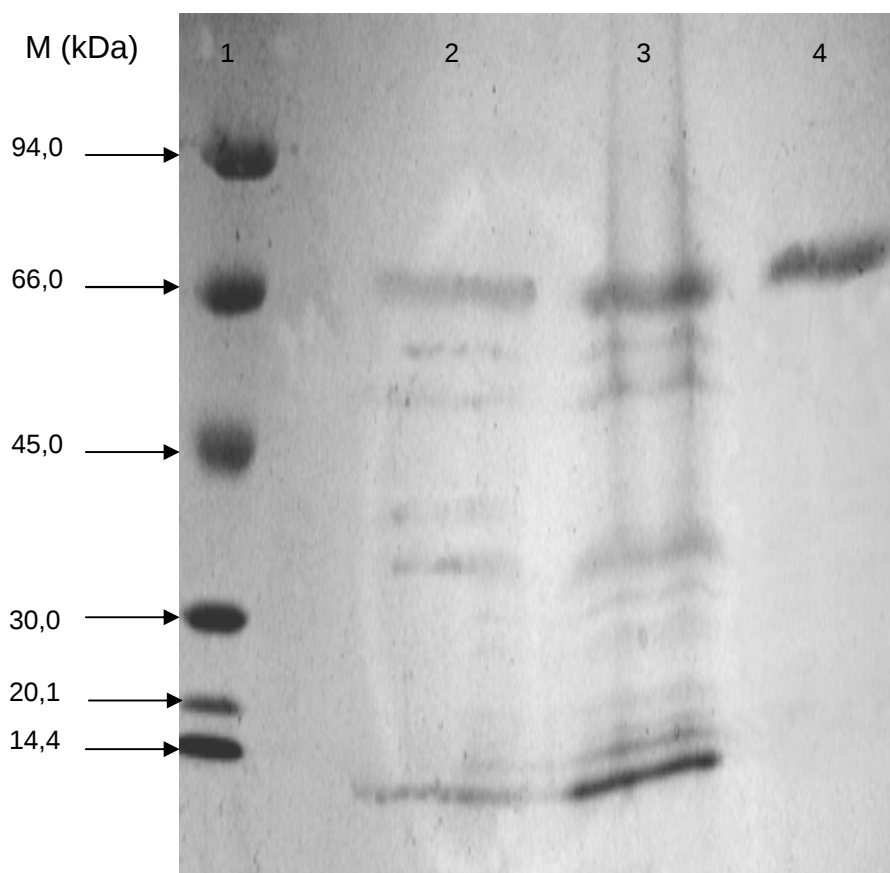


Figura 5. Eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida de amostras contendo a PG de *A. giganteus*: 1-padrões de massa molar; 2-amostra da precipitação com sulfato de amônio; 3-filtrado bruto; 4-amostra obtida na troca iônica. Os padrões utilizados foram foforilase b (94,0 kDa), soro albumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa).

A enzima foi recuperada com alto grau de eficiência, sendo perdida apenas 13,6 % da atividade inicial. Tal fato está relacionado principalmente a estabilidade da enzima a alterações de pH e força iônica, e ao número reduzido de etapas de purificação utilizadas.

4.2 Caracterização da poligalacturonase purificada

4.2.1 Determinação da massa molar da poligalacturonase

Para determinar a massa molar da PG purificada foram empregadas duas técnicas, a eletroforese (PAGE-SDS), em condição desnaturante, e a cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel), que permite a determinação da massa molar da proteína nativa.

Por eletroforese (Figura 5), a massa molar da PG foi estimada em 69,7 kDa, acima do valor geralmente apresentado pelas poligalacturonases fúngicas, entre 40 e 60 kDa (JAYANI *et al.*, 2005).

Para realização da filtração em gel, a PG purificada foi aplicada em uma coluna de resina Sephadex G-100 (limite de exclusão 4 – 150 kDa), equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8. A poligalacturonase foi eluída em um único pico, sendo sua massa molar estimada em 69,8 kDa por este método, valor este muito próximo daquele obtido por PAGE-SDS.

4.2.2 Determinação do pH e temperatura ótimos da atividade PG

A enzima poligalacturonase purificada teve sua atividade avaliada em diferentes pHs, variando de 4,0 a 8,0. A maior atividade PG foi obtida em pH 6,0 com tampão imidazol-NaOH 0,05 M (Figura 6a).

As poligalacturonases produzidas por fungos filamentosos comumente apresentam pH ótimo de atividade enzimática entre 3,0 e 5,0 (Tabela 3).

Poligalacturonases alcalinas são, em geral, produzidas por bactérias. Kapoor e colaboradores (2000) relataram pH ótimo 10,0 para a atividade PG obtida de *Bacillus* sp. MG-cp-2.

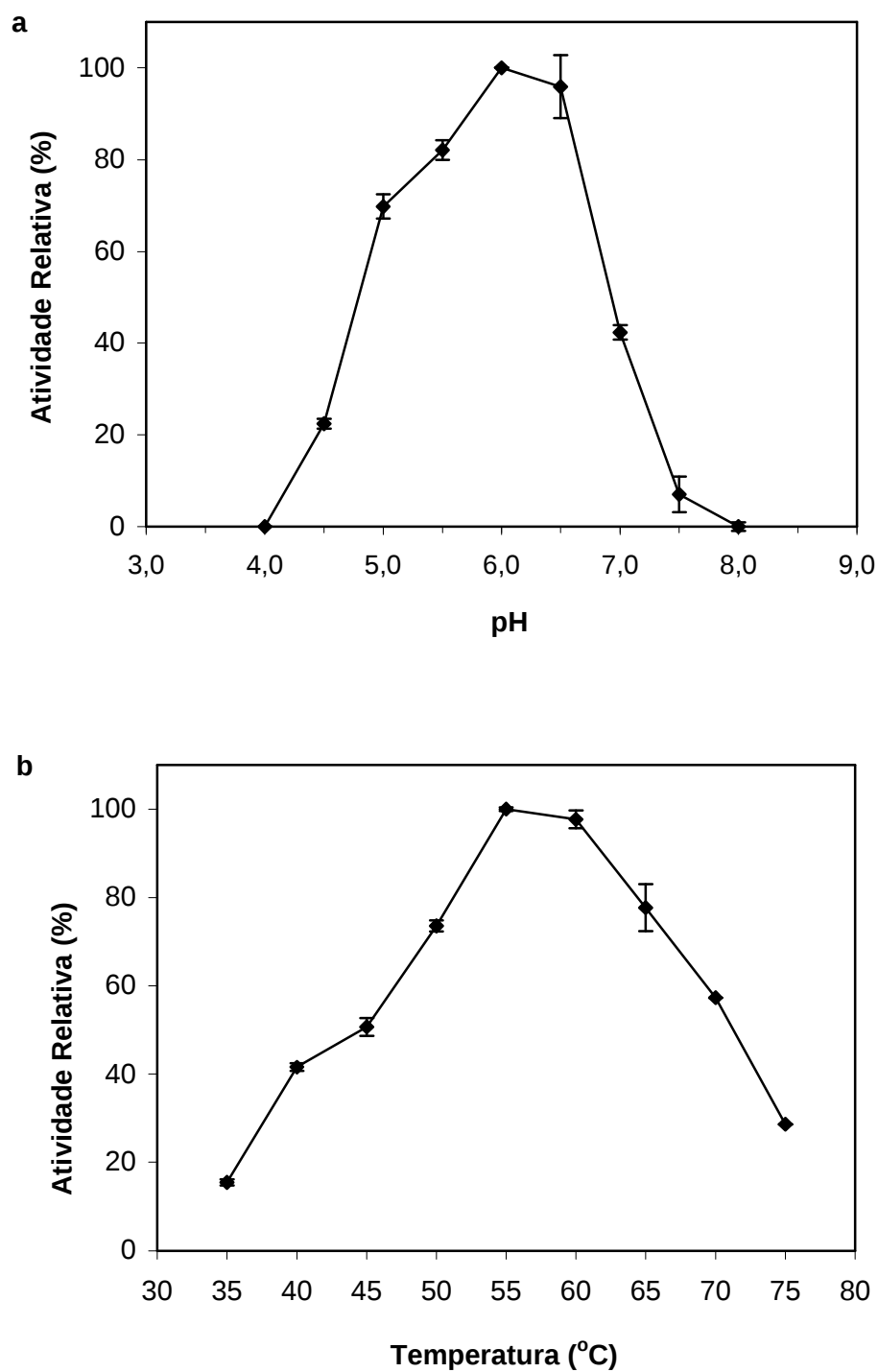


Figura 6. Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade PG purificada. Em (a): acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0–5,5), imidazol-NaOH 0,05 M (pH 6,0–6,5) e Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0 - 8,0). Em (b): imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0.

A atividade PG purificada foi avaliada em diferentes temperaturas, variando de 35 a 75 °C. A máxima atividade foi obtida a 55 °C, sendo que a 60 °C a enzima apresentou 97,7 % de sua atividade máxima (Figura 6b).

Temperaturas entre 50 e 60 °C são comumente relatadas como ótimas para a atividade PG (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre as condições ótimas de atividade de poligalacturonases purificadas.

Fonte	Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima	Referência
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Exo PG I	4,0	55	Devi, Rao, 1996
	Exo PG II	4,1	50	Devi, Rao, 1996
	Exo PG III	4,3	55	Devi, Rao, 1996
<i>Aspergillus giganteus</i>	Exo PG	6,0	55	Presente trabalho
<i>Aspergillus kawakii</i>	Endo PGI	4,5	50	Contreas-Esquivel, Voget, 2004
<i>Aspergillus niger</i>	PG	4,6	40	Dinu et al., 2007
<i>Bacillus</i> sp.	Exo PG	7,0	60	Kobayashi et al., 2001
<i>Fusarium moliniforme</i>	Endo PG I	4,8	45	Niture, Pant, 2004
	Endo PG II	5,3	40	Niture, Pant, 2004
<i>Mucor flavus</i>	Endo PGL	3,5-5,5	45	Gadre et al., 2003
Pectinase CCM*	PG	4,0	50	Ortega et al., 2004a
Pectinex 3XL*	PG	4,7	50	Ortega et al., 2004a
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo PG I	3,9	50	Chelegatti et al., 2002
	Exo PG II	5,0	50	Barense et al., 2001
	Exo PG III	5,8	50	Barense et al., 2001
Rapidase C80*	PG	4,0	55	Ortega et al., 2004a
<i>Rhizopus oryzae</i>	Endo PG	4,5	45	Saito et al., 2004
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Endo PG	5,5	60-65	Martins et al., 2007

*Nomes comerciais

4.2.3 Determinação da estabilidade térmica e em diferentes pHs da PG

A enzima poligalacturonase de *A. giganteus* purificada foi avaliada quanto a sua estabilidade nas temperaturas de 40, 50 e 55 °C (Figura 7a). Após 20 min de incubação a 40 °C, a enzima manteve 100 % de sua atividade, sendo constatada meia-vida de 115 min nessa temperatura. A 50 °C foi observada uma meia-vida de 18 min, e a 55 °C a desnaturação da enzima se deu rapidamente, sendo constatada uma meia-vida de 6 min.

As PGs de *Aspergillus japonicus* (SEMENOVA *et al.*, 2003) e *A. niger* (NAIDU, PANDA, 2003) apresentaram, a 50 °C, meias-vidas de 5 e 20 min, respectivamente. As três PGs purificadas de *Aspergillus carbonarius* apresentaram termoestabilidades bastante distintas entre si, quando incubadas a 46 °C, com meias-vidas de 6, 10 e 32 min (DEVI, RAO, 1996).

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da poligalacturonase purificada em diferentes pHs, a enzima foi incubada por 24h a 4 °C, em diferentes tampões, sem substrato. As soluções tampão utilizadas foram: glicina-HCl (pH 3 e 3,5), acetato de sódio (pH 4 a 5,5), imidazol-NaOH (pH 6 e 6,5), Tris-HCl (pH 7 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 9 a 10). Após a incubação, a atividade residual foi determinada a 55 °C em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0.

Alta estabilidade foi observada no intervalo de pH testado (Figura 7b), sendo que mais de 95 % da atividade PG foi mantida após a incubação em meio neutro e alcalino, entre pH 6,5 e 10,0.

As poligalacturonases fúngicas normalmente apresentam maior estabilidade em meio ácido. As PGs purificadas de *Thermoascus aurantiacus* (MARTINS *et al.*, 2007), *Aspergillus kawakii* (CONTREAS-ESQUIVEL, VOGET, 2004) e *Rizopus oryzae* (SAITO *et al.*, 2004) apresentaram atividade acima de 90 % apenas quando incubadas em pH 5,0 e 5,5 (24 h a 25 °C); 4,5 e 5,0 (30 min a 50 °C); e entre 4 e 6 (30 min a 50 °C), respectivamente. Já a PG purificada de *Mucor flavus* manteve mais de 90 % de sua atividade quando incubada de pH 2,5 a 6,0 por 20 h a 20 °C (GADRE *et al.*, 2003).

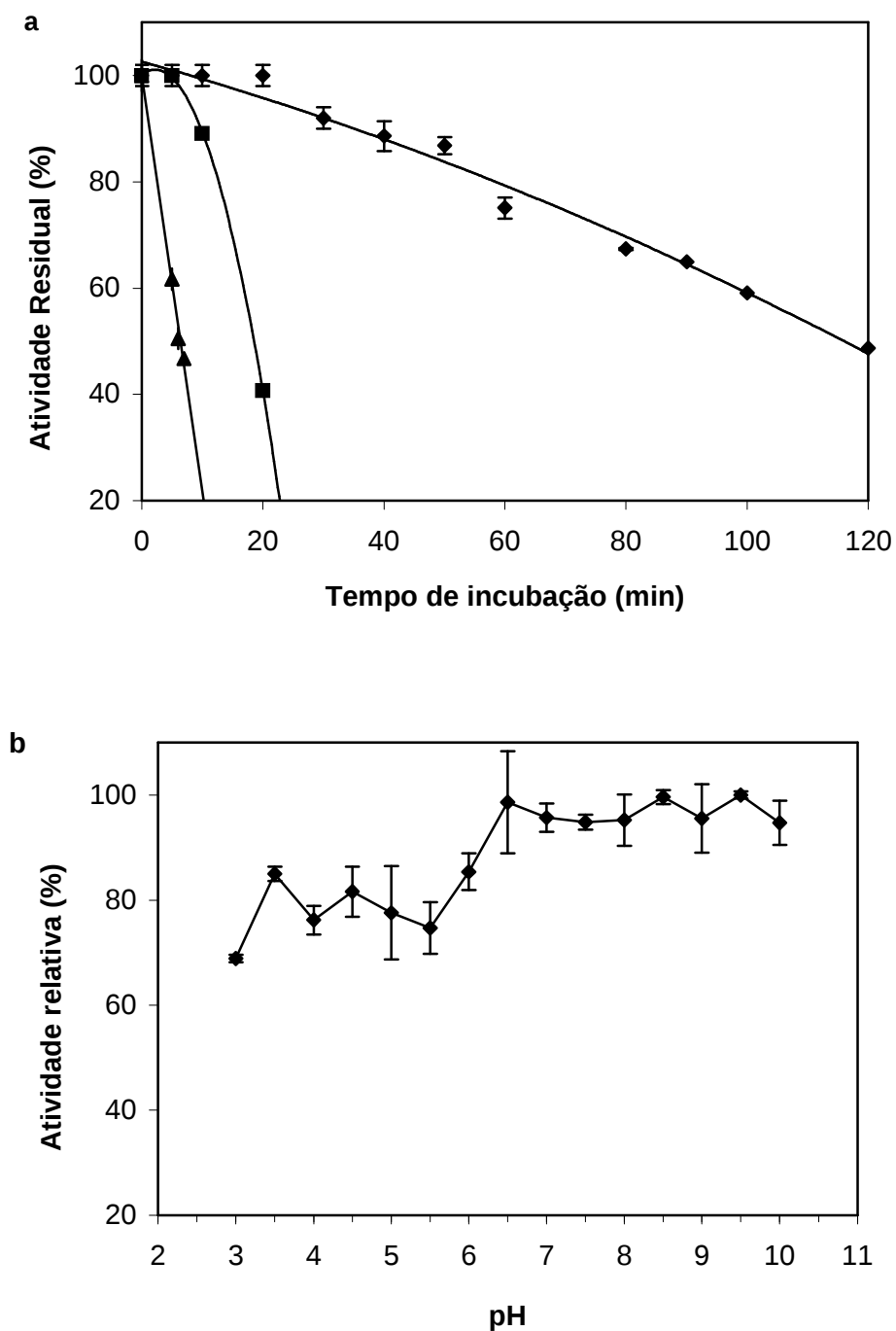


Figura 7. Estabilidade térmica (a) e em diferentes pHs (b) da PG purificada. Em (a): ♦ 40 °C, ■ 50 °C, ▲ 55 °C. Em (b): glicina-HCl 0,05 M (pH 3,0 – 3,5), acetato de sódio 0,05 M (pH 4,0 - 5,5), imidazol-NaOH 0,05 M (pH 6,0 - 6,5), Tris-HCl 0,05 M (pHs 7,0 a 8,5), e glicina-NaOH 0,05 M (pH 9,0 – 10,0).

4.2.4 Especificidade da atividade PG por substrato

A atividade PG foi avaliada sobre diferentes substratos em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 a 55 °C (Tabela 4). A enzima mostrou-se ativa sobre todas as substâncias pécnicas testadas, apresentando preferência por substratos de baixa ou nenhuma esterificação, confirmando sua classificação como uma poligalacturonase.

Tabela 4. Atividade PG de *A. giganteus* sobre diferentes substratos.

Substrato	PG (U/mL)	PG (%)
Pectina de citrus (MD 34%)	7,20 ± 0,2	100 ± 2,8
Ácido poligalacturônico	6,83 ± 0,2	94,9 ± 2,8
Pectina de citrus (MD 72%)	3,74 ± 0,3	51,9 ± 4,2
Pectina de citrus (MD 90%)	1,91 ± 0,1	25,5 ± 1,4
Pectina de maçã (MD 75%)	1,72 ± 0,06	23,9 ± 0,8

MD: grau de metilação do grupo carboxila.

Considerando o desvio padrão, não houve diferença entre as atividades sobre o ácido poligalacturônico e a pectina de citrus com 34 % de esterificação. Pouco mais de 50 % da atividade foi observada em pectina de citrus com média esterificação. Apesar de também apresentar grau de esterificação médio, a pectina de maçã foi degradada com baixa eficiência, com resultado semelhante ao apresentado na reação sobre a pectina de citrus com alta esterificação.

A PG de *A. niger* (DINU *et al.*, 2007) também apresentou alta especificidade para o ácido poligalacturônico e para pectinas de baixa esterificação. Já a endoPG de *Termonascus aurantiacus* (MARTINS *et al.*, 2007) apresentou alto nível de atividade enzimática somente sobre a pectina de citrus com 26 % de esterificação, e apenas 23 % desta atividade sobre ácido poligalacturônico.

As PGs microbianas em geral apresentam alta especificidade apenas por substrato não esterificado (KOBAYASHI *et al.*, 2001; GADRE *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2004; CONTREAS-ESQUIVEL, VOGET, 2004).

4.2.5 Identificação dos produtos de hidrólise da PG

A identificação dos produtos da atividade PG sobre o ácido poligalacturônico e sobre a pectina de citrus com 34 % de esterificação foi realizada através de cromatografia em camada delgada. Esses substratos foram escolhidos por terem proporcionado os maiores valores de atividade. A hidrólise dos dois substratos foi interrompida após 30 min, 2 h e 20 h. O único produto solúvel identificado nos hidrolisados de ambos os substratos foi o ácido monogalacturônico (Figura 8), indicando atividade exopoligalacturonase da enzima em estudo.

São classificadas como exoenzimas as poligalacturonases que produzem apenas ácido monogalacturônico (KOBAYASHI *et al.*, 2001; CABANNE, DONÈCHE, 2002) ou os ácidos mono- e digalacturônicos (DEVI, RAO, 1996) a partir da hidrólise de substâncias pécticas. Já as endopoligalacturonases apresentam produtos de hidrólise solúveis de tamanhos variados que vão desde ácido monogalacturônico até oligossacarídeos. Gadre e colaboradores (2003) identificaram na reação da endoPG de *Mucor flavus* sobre ácido poligalacturônico produtos que variavam de uma a doze unidades de ácido galacturônico.

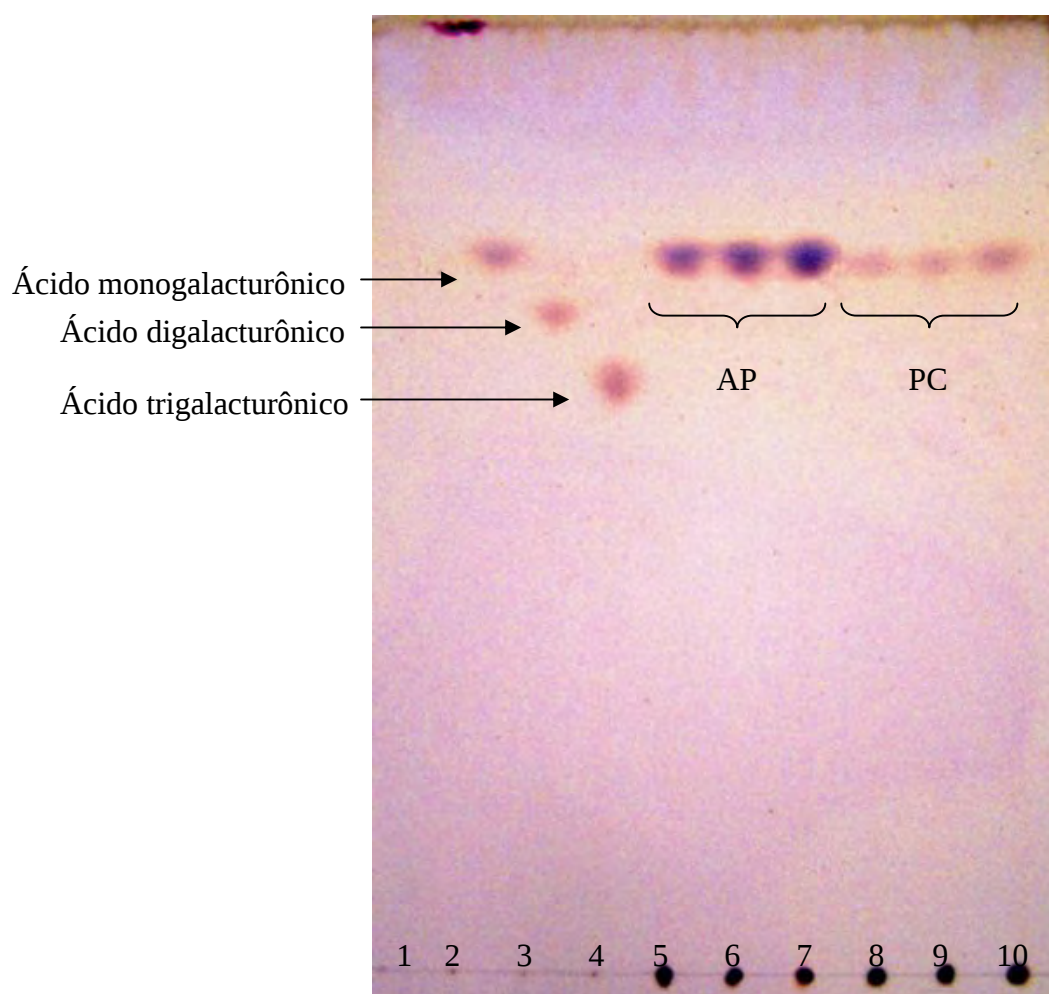


Figura 8. Cromatograma em camada delgada dos produtos de hidrólise do ácido poligalacturônico e da pectina pela ação da PG de *A. giganteus*. 1 azul de bromotimol; 2 ácido monogalacturônico; 3 ácido digalacturônico; 4 ácido trigalacturônico; 5, 6 e 7 produtos do ácido poligalacturônico (AP) hidrolisado por 30 min, 2 h, e 20 h, respectivamente; 8, 9 e 10 produtos da pectina (PC) hidrolisada por 30 min, 2 h e 20 h, respectivamente.

4.2.6 Parâmetros cinéticos da atividade PG

Os parâmetros cinéticos da atividade PG foram determinados com os substratos ácido poligalacturônico e pectina de citrus com 34 % de esterificação, conforme procedimento proposto por Lineweaver e Burk (1934).

A representação gráfica do duplo-recíproco ($1/V_0 \times 1/[S]$) apresentou-se linear, confirmando o comportamento michaeliano da enzima sobre ambos os substratos (Figura 9).

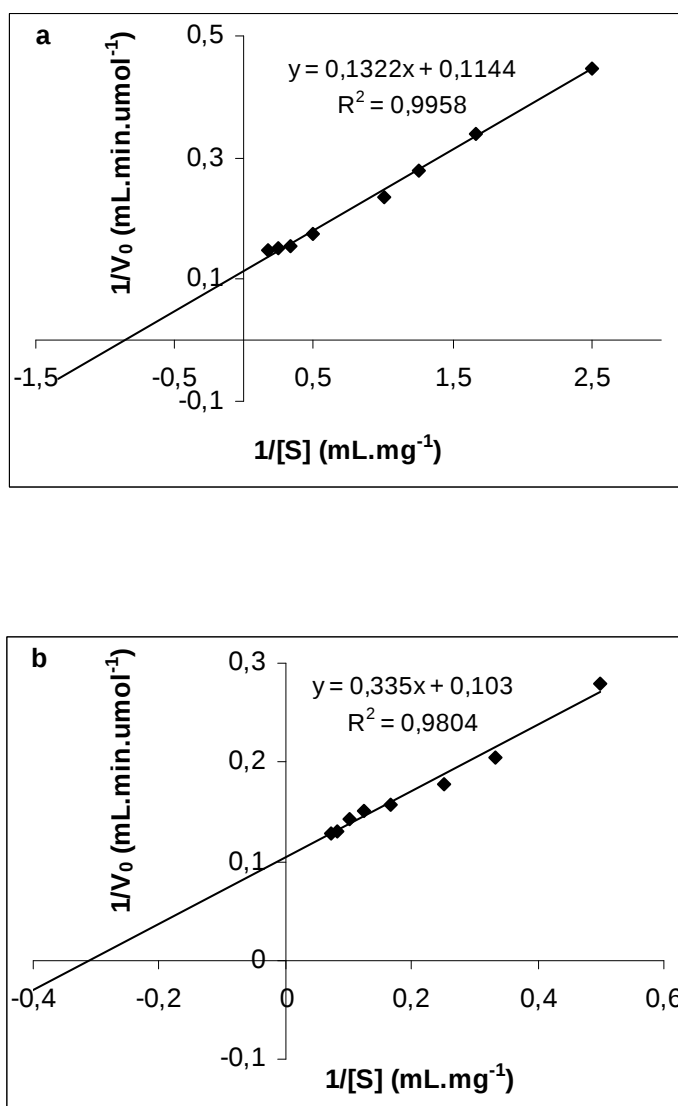


Figura 9. Gráficos duplo-recíprocos para a reação catalisada pela poligalacturonase de *A. giganteus* sobre (a) ácido poligalacturônico e (b) pectina de citrus com 34 % de esterificação. A atividade enzimática foi avaliada em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 a 55 °C.

Como mostra a Tabela 5, a PG de *A. giganteus* apresentou maior $V_{\max}$ com pectina de citrus correspondendo ao valor de $9,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Porém, o valor de K_m observado com ácido poligalacturônico foi 2,8 vezes menor do que o apresentado em pectina, o que sugere maior afinidade da enzima pelo substrato sem esterificação.

A enzima apresentou número de renovação (k_{cat}) maior em pectina, confirmando a maior velocidade de catálise sobre esse substrato. Já em relação à eficiência catalítica, avaliada pela relação k_{cat}/K_m , a PG de *A. giganteus* se mostrou 2,5 vezes mais eficiente ao hidrolisar o ácido poligalacturônico do que a pectina de citrus.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da atividade PG de *A. giganteus*.

Parâmetro cinético	Ácido poligalacturônico	Pectina de citrus 34 %
$V_{\max} (\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1})$	8,7	9,7
$V_{\max} (\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1})$	602,8	669,6
$K_m (\text{mg/mL})$	1,16	3,25
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	690	770
$k_{\text{cat}}/K_m (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$	126,6	50,3

4.2.7 Sensibilidade da atividade PG a diferentes substâncias

A atividade PG foi determinada em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 na presença de várias substâncias, como mostrado na Tabela 6. As concentrações testadas foram 2 e 10 mM, sendo que, nos casos em que o sal testado provocou excessiva gelatinização do substrato, a concentração de 10 mM foi reduzida para 5 mM.

A atividade da enzima foi fortemente favorecida em presença de 2-mercaptoetanol (2 e 10 mM) e de DTT (10 mM), os quais proporcionam um ambiente redutor no meio reacional, preservando os grupos –SH dos resíduos de cisteína (SCOPES, 1994).

O PMSF, conhecido por inibir enzimas com resíduos de serina e cisteína no sítio catalítico, provocou forte inibição da atividade PG na

concentração de 10 mM. Nessa mesma concentração o ácido iodoacético inibiu em aproximadamente 34 % a atividade enzimática. O ácido iodoacético promove a acetilação dos grupos –SH dos resíduos de cisteína (NELSON, COX, 2004). Os resultados apresentados pelas quatro últimas substâncias citadas indicam que resíduos de cisteína são importantes para a catálise pela PG de *A. giganteus*.

Tabela 6. Efeito de substâncias sobre a atividade PG de *A. giganteus*.

Substância	Atividade PG (%)*		
	2 mM	5 mM	10 mM
2-Mercaptoetanol	142,6 ± 2,6	—	146,1 ± 0,4
DTT	100 ± 0,4	—	135,2 ± 7,9
MnSO ₄	114,9 ± 8,4	132,5 ± 1,1	—
CoCl ₂	120,9 ± 3,5	119,0 ± 0,8	—
MgSO ₄	112,3 ± 1,5	—	120,2 ± 8,0
NH ₄ Cl	114,9 ± 4,0	—	107,7 ± 6,1
NaCl	100 ± 2,2	—	114,3 ± 1,3
CaCl ₂	100 ± 2,3	—	94,7 ± 5,2
ZnSO ₄	102,8 ± 9,7	88,5 ± 1,0	—
SDS	102,8 ± 6,2	—	79,1 ± 2,6
Ácido iodoacético	101,8 ± 8,3	—	66,1 ± 0,2
BaCl ₂	91,9 ± 7,5	86,3 ± 0,4	—
Pb(CH ₃ COO) ₂	89,7 ± 1,8	87,5 ± 6,6	—
PMSF	89,7 ± 3,5	—	25,4 ± 1,1
Citrato de sódio	82,5 ± 4,0	—	71,6 ± 0,9
EDTA	77,2 ± 3,5	—	21,5 ± 0,4
CuCl ₂	49,2 ± 6,1	48,2 ± 1,3	—
HgCl ₂ **	0	—	0

*Controle: 100 % ± 5,7

**Em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5

Dentre os cátions testados, o Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} e NH_4^+ ativaram a PG nas duas concentrações testadas. O Na^+ aumentou a atividade PG apenas em concentração mais elevada (10 mM). O Ca^{2+} não apresentou efeito significativo em ambas as concentrações. O Zn^{2+} também não apresentou efeito significativo na concentração de 2 mM, porém inibiu levemente a atividade PG na concentração de 5 mM. Já o Ba^{2+} e o Pb^{2+} apresentaram leve inibição em ambas as concentrações testadas (2 e 5 mM). O Cu^{2+} inibiu fortemente a atividade PG, reduzindo-a a pouco menos da metade, e o único íon capaz de inibir completamente a atividade PG foi o Hg^{2+} . A presença de alguns cátions de metais pesados como Hg^{2+} e Pb^{2+} no meio reacional pode ativar moléculas de oxigênio, acelerando a oxidação de grupos $-\text{SH}$ (SCOPES, 1994). A PG de *Termoascus aurantiacus* também foi completamente inativada na presença de Hg^{2+} (MARTINS *et al.*, 2007).

A inibição da atividade por citrato de sódio e EDTA, principalmente a forte inibição por este último na concentração de 10 mM, indicam dependência da enzima por cátions. O substrato utilizado apresenta-se neutralizado com íons sódio (poligalacturonato de sódio), e a interação desse íon com EDTA pode explicar essa inibição da atividade PG de *A. giganteus*. Já é conhecida a cátion-dependência de algumas poligalacturonases, particularmente com relação ao Ca^{2+} e Na^+ (KAPOOR *et al.*, 2000; SEMENOVA *et al.*, 2003; KAUR *et al.*, 2004).

4.3 Purificação da principal pectina liase

4.3.1. Ensaio do teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH

O filtrado bruto foi dialisado e equilibrado nos tampões utilizados no ensaio do teste em tubo: tampão acetato de sódio 0,05 M nos pHs 4,5 e 5,5, e imidazol-NaOH 0,05 M nos pHs 6,0, 6,5 e 7,0. Foram escolhidos pHs dentro da faixa 3,0 a 7,0 pois nessas condições a enzima apresenta alta estabilidade. Os pHs abaixo de 4,0 não são indicados para as resinas tipo Sephadex e,

portanto, não foram utilizados. Os trocadores iônicos utilizados foram: o catiônico CM Sephadex C-50, e o aniônico DEAE Sephadex A-50.

A pectina liase foi adsorvida, pelo menos parcialmente, em todos os trocadores utilizados nos vários pHs, apresentando maior adsorção e recuperação na resina aniônica em pH 6,0 (Tabela 7).

Apesar de nenhuma das condições testadas apresentar 100% de adsorção, a condição de maior adsorção da atividade PL, a resina DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão imidazol-NaOH pH 6,0, foi escolhida para o desenvolvimento da cromatografia de troca iônica. Esse resultado e o da precipitação com sulfato de amônio sugerem que diferentes isoformas da enzima estão presentes na amostra.

Tabela 7. Teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH a serem utilizados na cromatografia de troca iônica para purificação da pectina liase de *A. giganteus*.

Trocador	pH	Não adsorvida		Adsorvida e Recuperada	
		Atividade total (U)	Atividade relativa (%)	Atividade total (U)	Atividade relativa (%)
Catiônico	4,5	885,6 ± 80,3	59,4 ± 5,4	676,8 ± 66,2	45,4 ± 4,4
Catiônico	5,5	491,4 ± 29,5	32,9 ± 2,0	1017,0 ± 48,4	68,3 ± 3,2
Aniônico	6,0	64,8 ± 3,9	4,3 ± 0,3	1231,2 ± 78,9	82,6 ± 5,3
Aniônico	6,5	102,8 ± 2,8	6,9 ± 0,2	1080,0 ± 15,3	72,5 ± 1,0
Aniônico	7,0	199,8 ± 2,5	13,4 ± 5,5	1027,8 ± 82,2	69,0 ± 5,5

4.3.2. Cromatografia de troca aniônica

O filtrado bruto dializado contendo pectina liase foi submetido à cromatografia de troca iônica nas condições acima mencionadas, tendo sido a amostra eluída com dois gradientes salinos de 100 mL, o primeiro de 0 a 0,5 M e o segundo de 0,5 a 1,0 M, como mostra a Figura 10.

A atividade pectina liase foi eluída em um único pico que se estendeu por 73 frações (219 mL), fato que pode ter sido causado pela sobreposição de dois ou mais picos. As frações correspondentes ao pico de atividade obtido com a passagem do gradiente salino foram reunidas.

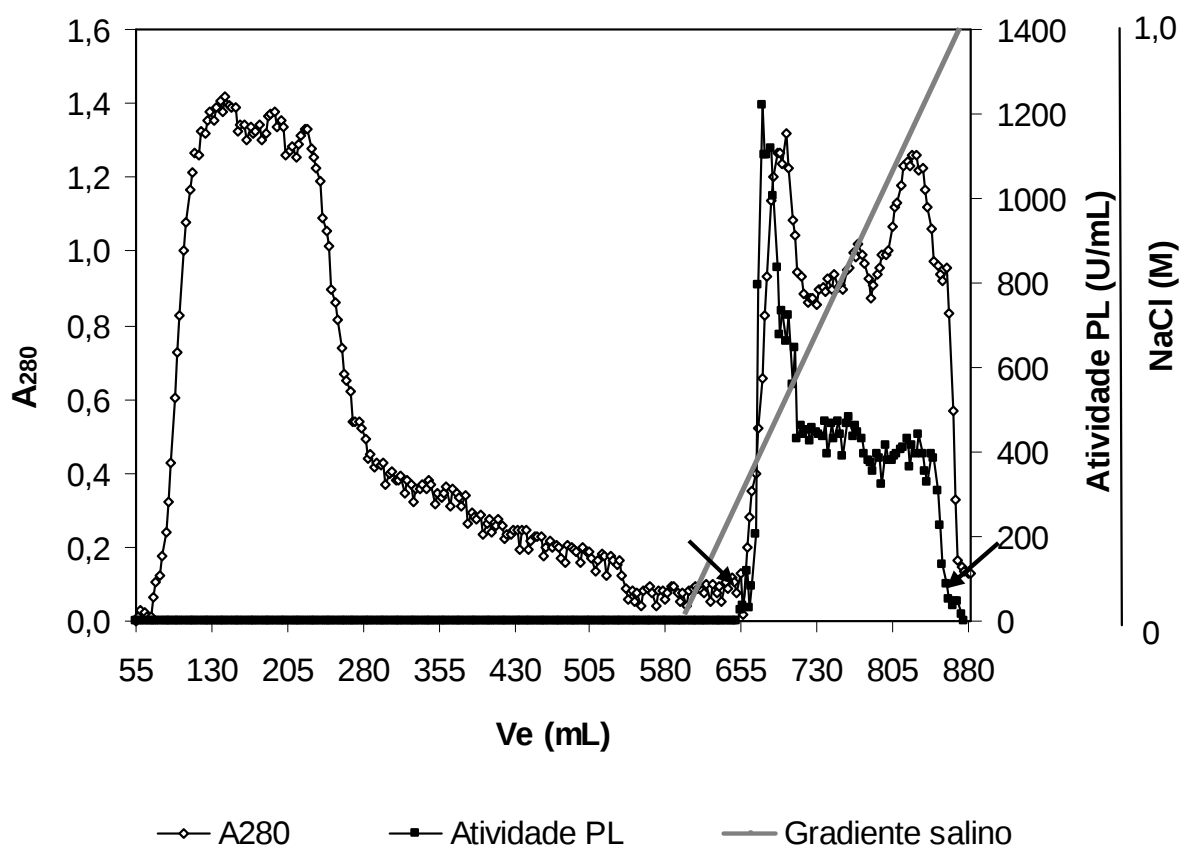


Figura 10. Perfil cromatográfico em DEAE Sephadex A-50 da pectina liase de *A. giganteus* presente no filtrado bruto. Tampão: imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0. As setas indicam a primeira e a última fração reunidas. Foram coletadas frações de 3,0 mL a um fluxo de 48 mL/h.

4.3.3 Cromatografia de troca catiônica

A amostra proveniente da coluna de troca aniônica foi dialisada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, e em seguida cromatografada em CM Sephadex C-50 equilibrada no mesmo tampão. A eluição foi realizada com 200 mL de gradiente salino (NaCl) de 0 a 0,5 M.

Como pode ser observado na Figura 11, três picos de atividade PL foram obtidos nesta etapa, sendo que o primeiro pico não foi adsorvido a resina. O segundo e terceiro picos foram eluídos muito próximos, com uma pequena sobreposição. O pico 3, por apresentar maior atividade total (52.540,0 U), foi considerado correspondente a principal pectina liase produzida por *A. giganteus*, nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho, sendo, portanto denominado PL I.

Uma eletroforese de cada um dos picos revelou que o maior deles, o pico 3 (PL I), apresentava-se como uma banda predominante com traços de contaminantes, enquanto que os picos 1 e 2 apresentaram perfil eletroforético de várias bandas (Figura 12).

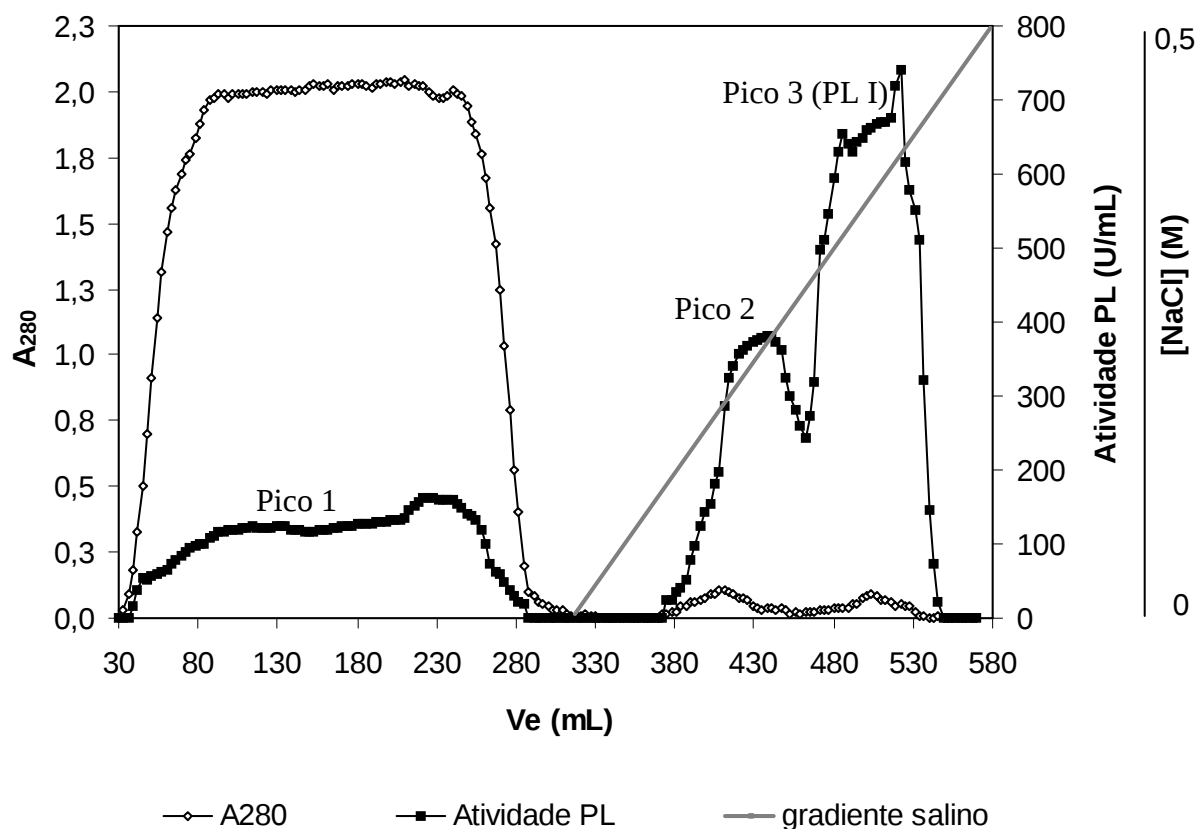


Figura 11. Perfil cromatográfico em CM Sephadex C-50 da pectina liase de *A. giganteus* proveniente da cromatografia de troca aniônica. Tampão: acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. Foram coletadas frações de 3,0 mL a um fluxo de 48 mL/h.

4.3.4 Filtração em gel

O pico 3, obtido na etapa de cromatografia de troca catiônica, foi reunido, dialisado em acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, liofilizado e, em seguida, submetido a filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 equilibrada na mesma solução. A enzima pectina liase foi eluída em um único pico.

A purificação da principal PL produzida por *A. giganteus* foi então obtida após três etapas de cromatografia, como pode ser observado na Figura 12. O

filtrado bruto foi cromatografado em DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão imidazol-NaOH 0,05 M pH 6,0 e, a amostra recolhida dessa coluna foi cromatografada em CM Sephadex C-50 equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. Após esses dois passos, a principal pectina liase de *A. giganteus* não apresentou homogeneidade eletroforética, porém já se mostrou como o principal componente da amostra em solução contendo apenas traços de contaminantes, como pode ser observado na Figura 12c. Por fim, o pico 3 (PL I), reunido após a cromatografia de troca catiônica, foi cromatografado em Sephadex G-100. Como pode ser observado na Figura 12d, a amostra obtida nesta última etapa apresentou homogeneidade eletroforética.

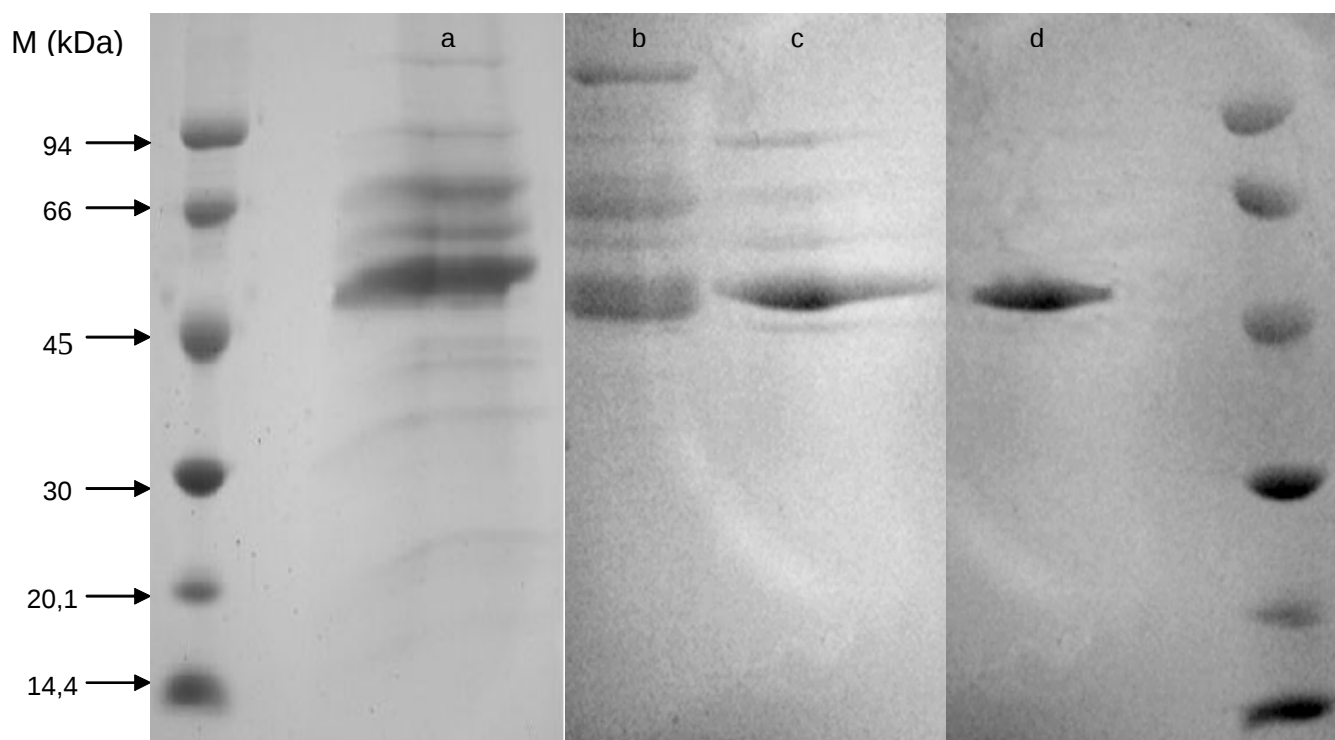


Figura 12. Eletroforese denaturante em gel gradiente de poliacrilamida (8-18 %) das amostras provenientes de: (a) DEAE Sephadex A-50; (b) CM Sephadex C-50 pico 2; (c) CM Sephadex C-50 PL I; (d) Sephadex G-100 pico 3 (PL I). Os padrões utilizados foram foforilase b (94 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa).

Como mostra a Tabela 8, foi obtido um fator de purificação de 47,8 vezes para a principal pectina liase de *A. giganteus* (PL I), após essas três etapas de cromatografia, sendo a recuperação final de atividade enzimática de 12,4 %. A PL II, que corresponde a menor fração de atividade, foi parcialmente purificada com um fator de 9,1 e recuperação de 9,9 %. Já o pico 1, correspondente a PL que não adsorveu a resina CM Sephadex C-50, foi recuperado com baixa atividade específica, pois contém muitas outras proteínas.

A produção de múltiplas formas de uma enzima por um mesmo microrganismo tem sido mais freqüentemente relatada para poligalacturonases. De Vries e colaboradores (2002) estudaram a expressão de 26 genes pectinolíticos em 16 diferentes condições de cultivo de *A. niger*, dentre os quais havia 8 diferentes genes para PGs, 5 para PLs e 1 para PGL. Dinu e colaboradores (2007) também estudaram o complexo pectinolítico de *A. niger* em cultivos em substrato sólido com farelo de trigo e beterraba, e identificaram uma poligalacturonase, uma pectina metilesterase e três pectato liases. Múltiplas formas enzimáticas podem ser produzidas tanto por genes diferentes quanto por processamento pós-traducional do produto de um mesmo gene.

Tabela 8. Purificação da pectina liase de *A. giganteus*.

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto dialisado	181.300,0	230,9	785,2	100,0	1,0
DEAE Sephadex A-50 pH 6,0	157.529,0	54,3	2.901,1	87,0	3,7
CM Sephadex C-50 pH 5,5					
Pico 1	25.034,4	34,6	724,4	13,8	0,9
Pico 2	18.012,0	2,5	7.125,0	9,9	9,1
Pico 3 (PL I)	52.540,0	14,2	37.000,0	29,0	47,1
Sephadex G-100 (PL I)	22.500,0	0,6	37.500,0	12,4	47,8

4.4 Caracterização da principal pectina liase purificada

4.4.1 Determinação da massa molar

Para determinar a massa molar da PL I purificada foram empregadas duas técnicas, a eletroforese em condição desnaturante (PAGE-SDS) e a cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel), que permite a determinação da massa molar da proteína nativa.

A massa molar da PL I foi estimada em 54,7 kDa por PAGE-SDS e 56,7 kDa por filtração em gel. As massas molares das PLs correspondentes aos picos 1 e 2 da cromatografia de troca catiônica não puderam ser estimadas por não terem sido purificadas.

4.4.2 Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima da PL I

A atividade PL I foi avaliada em diferentes valores de pH, variando entre 6,5 e 10,0. A máxima atividade foi obtida em pH 8,5 com solução tampão glicina-NaOH 0,05 M (Figura 13a). Como pode ser observado na Tabela 9, pH ótimo alcalino é mais comumente observado para pectato liases (PGL), enquanto que as pectina liases (PL), em geral, apresentam pH ótimo neutro ou levemente alcalino.

A temperatura ótima da PL I foi avaliada no intervalo entre 30 e 60 °C, tendo sido a enzima incubada em tampão glicina-NaOH pH 8,5 0,05 M. O maior nível de atividade PL foi observado a 50 °C (Figura 13b). Como pode ser observado na Tabela 9, as pectina liases e pectato liases freqüentemente apresentam temperatura ótima entre 40 e 60 °C. Apenas algumas pectato liases de *Bacillus* apresentam temperaturas ótimas acima de 60 °C.

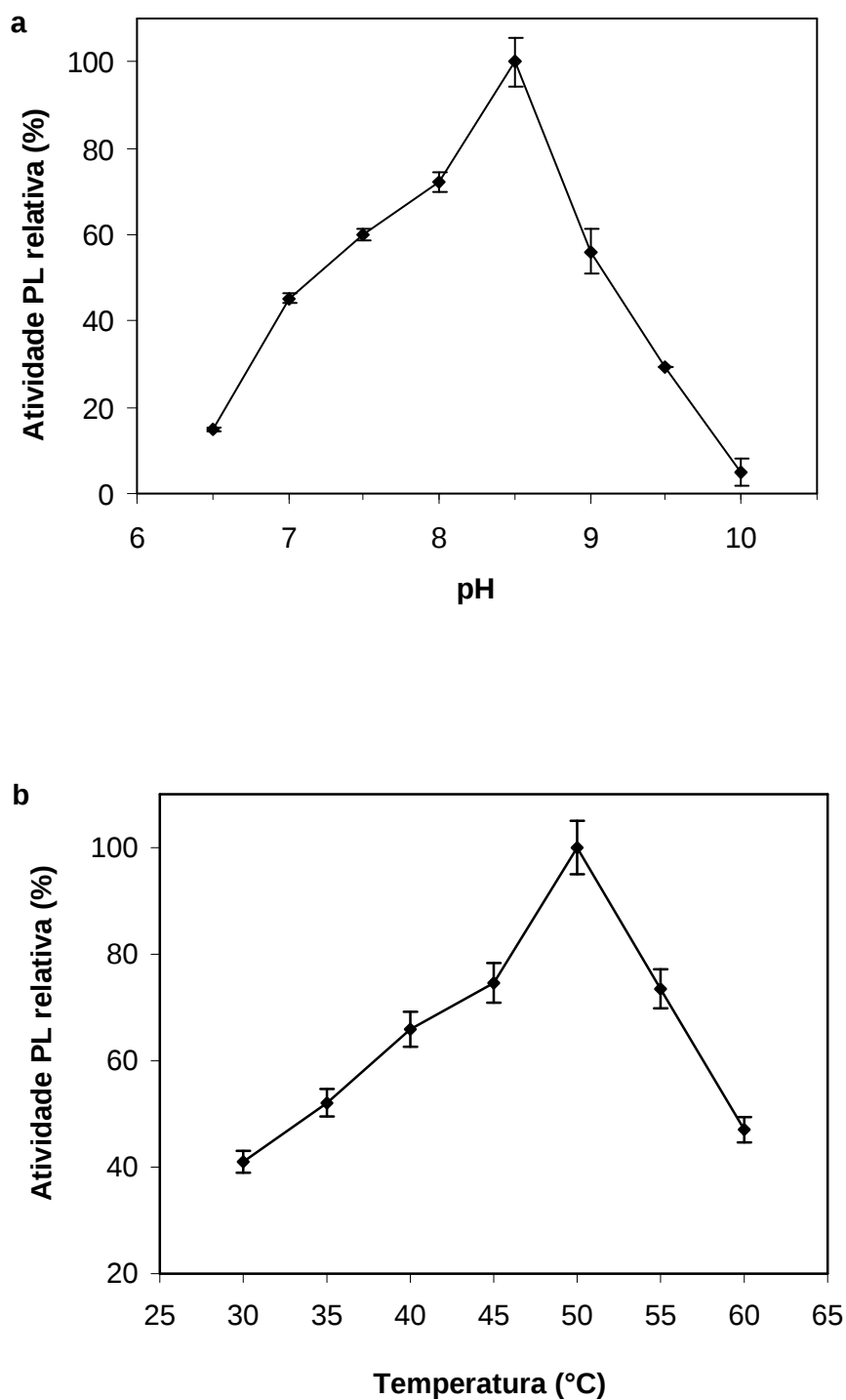


Figura 13. Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade PL I purificada. Em (a): tampão imidazol-NaOH 0,05 M (pH 6,5), Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0 - 8,0), glicina-NaOH 0,05 M (pH 8,5 – 10,0). Em (b): tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5.

Tabela 9. Comparação entre as condições ótimas de atividade de liases purificadas.

Fonte	Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Aspergillus japonicus</i>	PL	4,5-5,5	-	Semenova <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus giganteus</i>	PL	8,5	50	Presente trabalho
<i>Aspergillus niger</i>	PGL (PeL I)	6,0	50	Dinu <i>et al.</i> , 2007
	PGL (PeL II)	4,6	50	Dinu <i>et al.</i> , 2007
	PGL (PeL III)	4,2	35	Dinu <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus macerans</i>	PGL	8,0-8,5	63-67	Morozova <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	PGL	8,5	70	Klug-Santner <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> sp. DT7	PL	8,0	60	Kashyap <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P7	PGL (Pel-7)	10,5	60-65	Kobayashi <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	PGL (Pel C)	10,0	65	Soriano <i>et al.</i> , 2006
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	PL	6,4	35	Gummadi, Kumar, 2006
	PGL	7,5	32	Gummadi, Kumar, 2006
Grindamyl 3PA*	PL	6,0	40	Ortega <i>et al.</i> , 2004b
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	PGL (Pel A)	10,0	55	Soriano <i>et al.</i> , 2006
Pectinase CCM*	PL	6,0	40	Ortega <i>et al.</i> , 2004b
Pectinex 3XL*	PL	5,0-6,5	35	Ortega <i>et al.</i> , 2004b
<i>Penicillium canescens</i>	PL A	5,0-5,5	60	Sinitsyna <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium italicum</i>	PL (PNL)	6,0-7,0	50	Alaña <i>et al.</i> , 1990
Rapidase C80*	PL	6,0	40-45	Ortega <i>et al.</i> , 2004b

* nomes comerciais

4.4.3 Determinação da estabilidade térmica e em diferentes pHs da PL I

A enzima PL I purificada foi avaliada quanto a sua estabilidade nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C (Figura 14a). Após 15 min de incubação a 40 °C, a enzima manteve 71 % de sua atividade, sendo constatada meia-vida de 19 min nessa temperatura. A 45 °C foi observada uma meia-vida de 9 min, e a 50 °C a desnaturação da enzima se deu rapidamente, sendo constatada uma meia-vida de 6 min.

A 50 °C a PL I mostrou-se mais termoestável que as enzimas comerciais Rapidase C80, Pectinase CCM, as quais apresentaram meias-vidas de 4,1 e 2,0 min a essa temperatura (ORTEGA *et al.*, 2004b).

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da PL I produzida por *A. giganteus* em diferentes pHs, a enzima foi incubada por 24h a 4 °C em diferentes pHs, sem substrato. As soluções tampão utilizadas foram: glicina-HCl (pH 2,0 – 3,0), acetato de sódio (pH 3,5 - 5,5), imidazol-NaOH (pH 6,0 – 7,0), Tris-HCl (pH 7,5 - 8,0) e glicina-NaOH (pH 8,5 - 10,0). Após a incubação, a atividade residual foi determinada a 50 °C e em tampão glicina-NaOH pH 8,5.

Mais de 40 % da atividade PL I foi preservada em uma ampla faixa de pH, de 3,0 a 10,0. Os melhores resultados foram obtidos para os valores de pH 3,0; 5,0 e entre 6,0 e 7,0, em região ácida e neutra (Figura 14b). Já a PL de *Bacillus* sp. DT7 apresentou máxima estabilidade na região alcalina, quando incubada no intervalo de pH 7,5 a 8,5 (KASHYAP *et al.*, 2000).

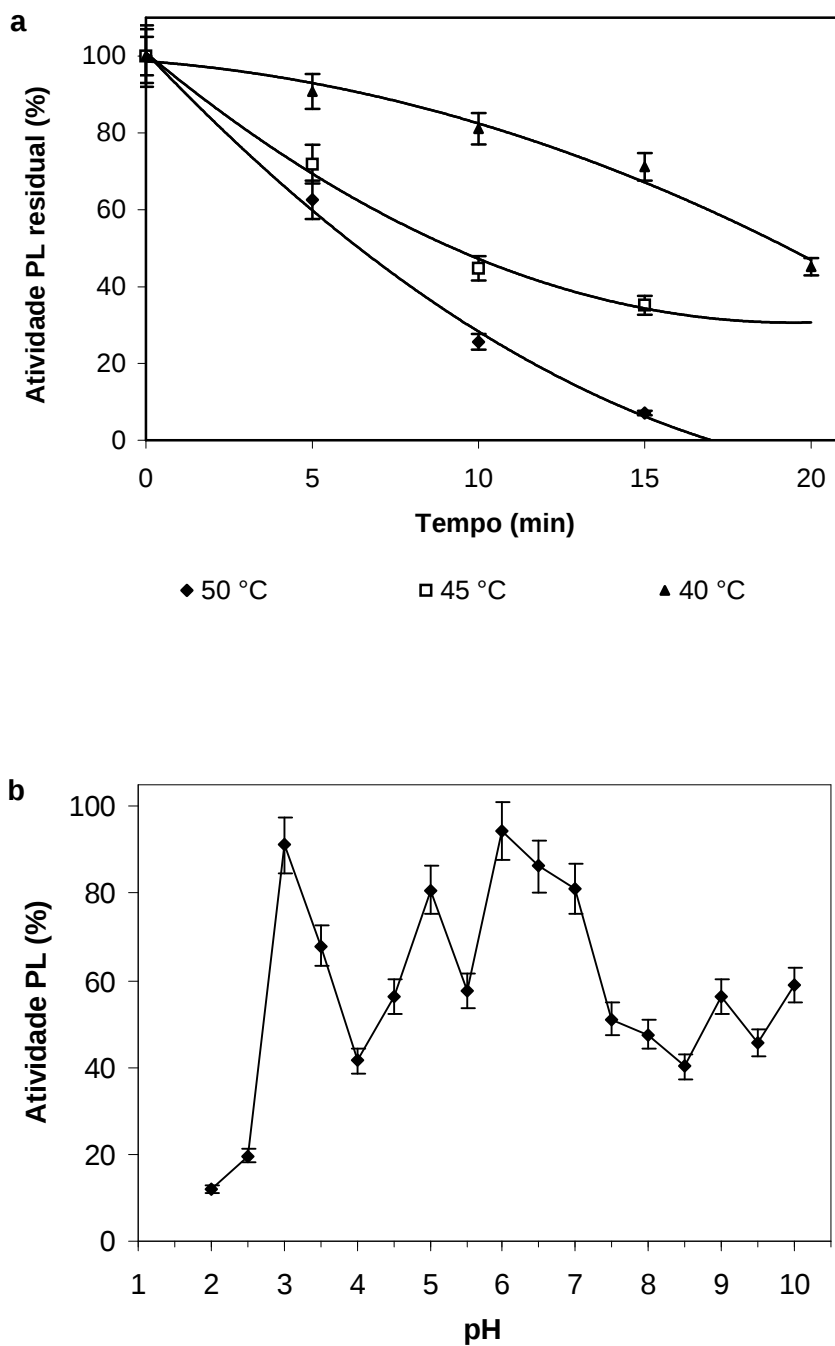


Figura 14. Estabilidade térmica (a) e em diferentes pHs (b) da PL I purificada. Em (a): ▲ 40 °C, □ 45 °C, ◆ 50 °C. Em (b): tampão glicina-HCl 0,05 M (pH 2,5 – 3,0), acetato de sódio 0,05 M (pH 3,5 - 5,5), imidazol-NaOH 0,05 M (pH 6,0 – 7,0), Tris-HCl 0,05 M (pHs 7,5 e 8,0), e glicina-NaOH 0,05 M (pH 8,5 – 10,0).

4.4.4 Especificidade por substrato da atividade PL I

A atividade PL I foi avaliada sobre diferentes substratos em tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5 a 50 °C. A enzima mostrou-se ativa sobre todos os substratos testados, apresentando preferência pelos de baixa ou média esterificação (Tabela 10). Considerando os desvios, não houve diferença entre as atividades sobre as pectinas de citrus de 34 e 72 % de esterificação. Apesar de também apresentar grau de esterificação médio, a pectina de maçã foi degradada com menor eficiência. Baixos níveis de atividade foram observados sobre a pectina de alta esterificação e ácido poligalacturônico. Tal resultado sugere a classificação da PL I como uma pectina liase.

Um resultado semelhante foi observado por Soriano e colaboradores (2006) para a PelC de *Bacillus subtilis*, a qual apresentou maior especificidade por pectina de citrus com 22 % de esterificação, mantendo 87 % de atividade sobre pectina com 64 % de esterificação e, menos de 50 % da atividade foi observada em pectina de alta esterificação (89 %) e em ácido poligalacturônico. Apesar desse resultado, a enzima PelC foi classificada como uma pectato liase por apresentar dependência de Ca^{2+} .

Tabela 10. Atividade PL I de *A. giganteus* sobre diferentes substratos.

Substrato	PL I (U/mL)	PL I (%)
Pectina de citrus (MD 72%)	272,4 ± 8,2	100 ± 3,0
Pectina de citrus (MD 34%)	270,0 ± 8,0	99,1 ± 3,0
Pectina de maçã (MD 75%)	162,0 ± 7,6	59,5 ± 4,7
Pectina de citrus (MD 90%)	60,0 ± 3,3	22,0 ± 5,5
Ácido poligalacturônico	52,8 ± 2,0	19,4 ± 3,8

MD: grau de metilação do grupo carboxila.

4.4.5 Influência do Ca^{2+} na atividade da enzima PL I

A atividade PL I foi avaliada em diferentes concentrações de CaCl_2 (Figura 15). A enzima apresentou elevada atividade mesmo na ausência de

Ca^{2+} , tendo sido estimulada por esse cátion até a concentração de 10 mM. A máxima atividade foi observada a 5 mM, e a 20 mM a atividade volta ao nível basal observado na ausência de Ca^{2+} .

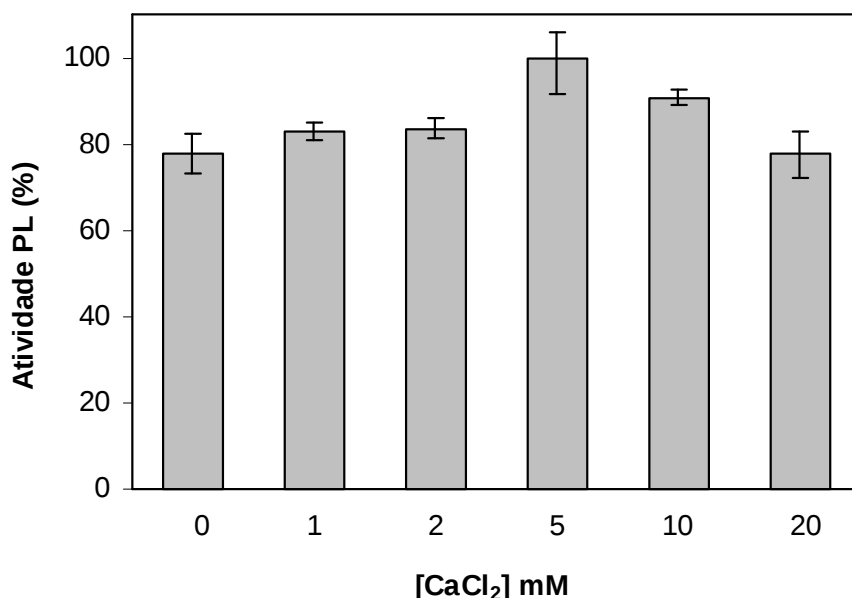


Figura 15. Influência do Ca^{2+} sobre atividade PL I purificada de *A. giganteus*. A atividade enzimática foi avaliada em tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5 a 50 °C.

A preferência por substratos esterificados e a não dependência de Ca^{2+} para a atividade enzimática confirmam a classificação da PL I como uma pectina liase. Poucos relatos de produção de pectina liases são encontrados na literatura (JAYANI *et al.*, 2005).

A PL de *Bacillus* sp. DT7 também foi ativada por Ca^{2+} , sendo que a presença desse cátion na concentração de 1,0 M aumentou em aproximadamente 50 % a atividade enzimática. Já as PLs de *Penicillium italicum* (ALAHNA *et al.*, 1990), *Aspergillus japonicus* (SEMENOVA *et al.*, 2003) e *Penicillium canescens* (SINITSYNA *et al.*, 2007) não sofreram nenhum efeito com a adição de Ca^{2+} ao meio de reação.

4.4.6 Identificação dos produtos de reação da PL I

A identificação dos produtos da atividade PL I sobre as pectinas de citrus com 72 e 34 % de esterificação foi realizada através de cromatografia em camada delgada (Figura 16). Esses substratos foram escolhidos por terem proporcionado os maiores níveis de atividade enzimática. A reação com os dois substratos foi interrompida após 30 min, 2 h e 20 h.

Entre os produtos de degradação da pectina com 34 % de esterificação pela ação da PL I podem ser identificados alguns com padrões de migração idênticos ao do ácido mono-, di- e tri-galacturônico, os quais provavelmente correspondem a ácido monogalacturônico, e a digalacturonato e trigalacturonato insaturados, além de um produto não identificado com migração intermediária aos ácidos mono e digalacturônicos. A ação das pectina liases entre dois resíduos de ácido galacturônico resulta na inserção de uma dupla ligação apenas em um dos resíduos, portanto entre os produtos de reação dessa enzima devem ser encontrados tanto produtos insaturados como saturados.

O produto não identificado pode ser classificado como um ácido urônico por apresentar coloração violeta azulada quando exposto ao procedimento de revelação com solução de orcinol (FONTANA *et al.*, 1988), assim como os outros produtos dessa reação. Devido a sua migração levemente retardada em relação à do ácido monogalacturônico, pode-se sugerir que tal produto seja um ácido monogalacturônico metil-esterificado, pois a adição de um carbono aumenta a massa molar, o que poderia provocar um retardamento na migração da substância como observado.

A partir do padrão de degradação da pectina com 34 % de esterificação, a enzima PL I pode ser classificada como uma endo-pectina liase. Um padrão semelhante de degradação de pectinas de baixa e alta esterificação foi observado após a ação da PelC de *B. subtilis* e PelA de *P. barcinonensis* (SORIANO *et al.*, 2006), porém essas enzimas não foram capazes de produzir o monômero. Van Alebeek e colaboradores (2002) estudaram detalhadamente o modo de ação da pectina liase A de *A. niger*, a qual produz ácidos mono-, di-

, tri- e tetragalacturônicos além de di-, tri- e tetragalacturonatos insaturados a partir de oligogalacturonatos metil-esterificados. Monômeros insaturados não foram identificados entre os produtos de reação em nenhum dos experimentos. Até o momento não há relatos de exo-pectina liases na literatura.

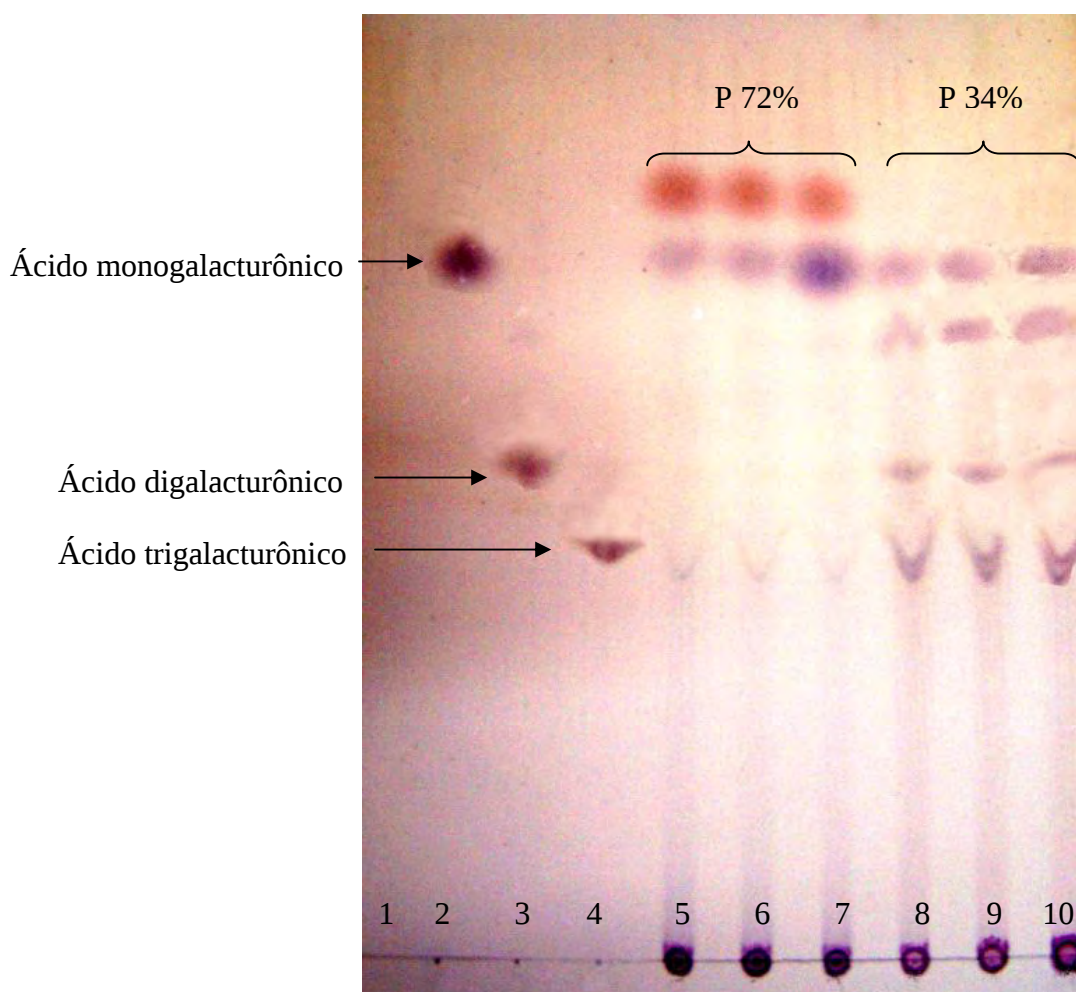


Figura 16. Cromatograma em camada delgada dos produtos de reação da pectina de citrus pela ação da PL I de *A. giganteus*. 1 azul de bromotimol; 2 ácido monogalacturônico; 3 ácido digalacturônico; 4 ácido trigalacturônico; 5, 6 e 7 produtos da pectina com 72 % de esterificação após 30 min, 2 h, e 20 h de reação, respectivamente; 8, 9 e 10 produtos da pectina com 34 % de esterificação após 30 min, 2 h e 20 h de reação, respectivamente.

Já entre os produtos de degradação da pectina com 72 % de esterificação pela ação da PL I, pode-se identificar ácido monogalacturônico em grande proporção, aumentando significativamente com o tempo de reação; traços de trigalacturonato, provavelmente insaturado; e um carboidrato com migração maior do que a do padrão ácido monogalacturônico, como maior fração solúvel da mistura de reação. Este último produto apresenta coloração avermelhada quando exposto ao procedimento de revelação com solução de orcinol, o que o identifica como uma hexose (FONTANA *et al.*, 1988), possivelmente uma ramnose, a qual apresenta massa molar menor do que a do ácido galacturônico e está presente na cadeia de pectina compondo a região ramnogalacturonana I (RGI). Uma análise qualitativa mais específica dos produtos da reação da PL I de *A. giganteus* sobre a pectina de citrus com 72 % de esterificação deve ainda ser realizada.

4.4.7 Parâmetros cinéticos da atividade PL I

Os parâmetros cinéticos da atividade PL I foram determinados com os substratos pectina de citrus com 72 e 34 % de esterificação, conforme procedimento proposto por Lineweaver e Burk (1934). A representação gráfica do duplo-recíproco ($1/V_0 \times 1/[S]$) apresentou-se linear, confirmando o comportamento michaeliano da enzima sobre ambos os substratos (Figura 17).

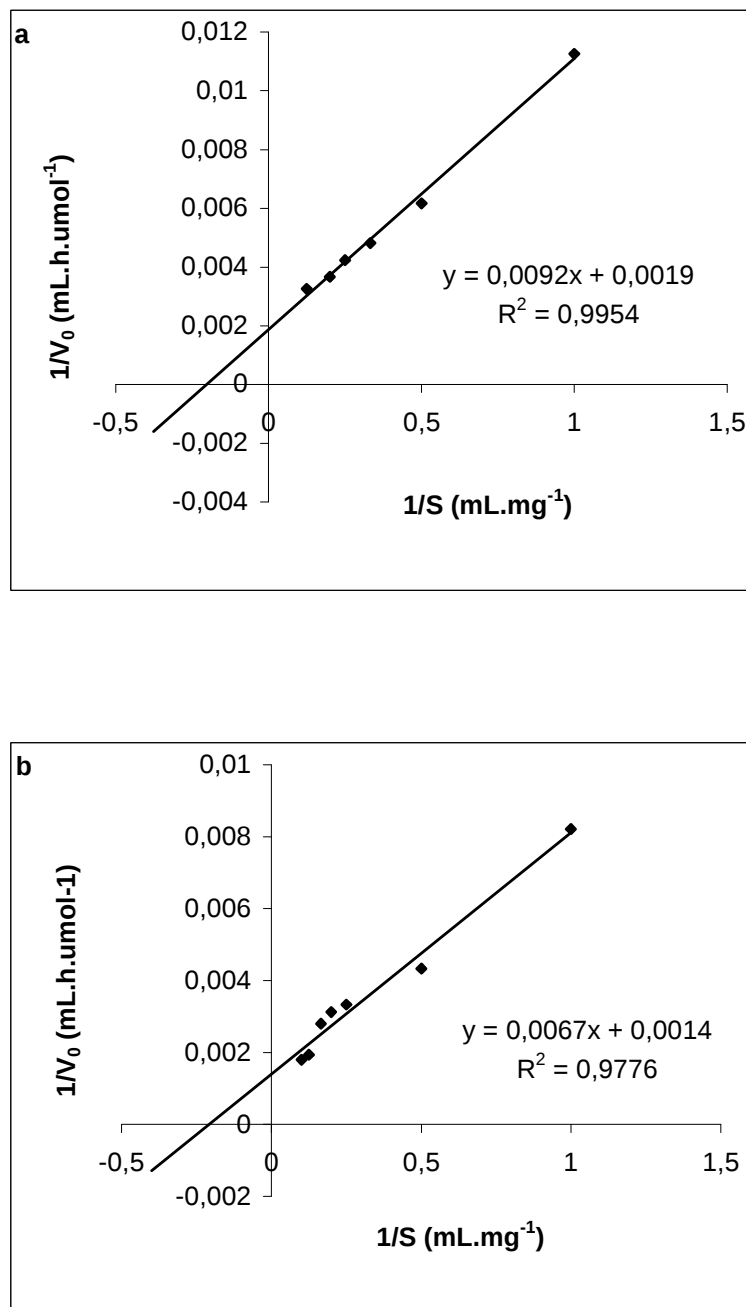


Figura 17. Gráficos duplo-recíprocos para a reação catalisada pela PL I de *A. giganteus* sobre (a) pectina de citrus com 72 % de esterificação e (b) pectina de citrus com 34 % de esterificação. A atividade enzimática foi avaliada em tampão glicina-NaOH 0,05 M pH 8,5 a 50 °C.

Como mostra a Tabela 11, a PL I de *A. giganteus* apresentou maior $V_{\max}$ para o substrato menos esterificado, com valor de 89.287,5 U.mg⁻¹.h⁻¹ ou 1.488,1 U.mg⁻¹.min⁻¹. Os valores de K_m observados foram idênticos, indicando, portanto, a mesma afinidade da enzima pelos dois substratos.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos da atividade PL I de *A. giganteus*.

Parâmetro cinético	Pectina de citrus 72 %	Pectina de citrus 34 %
$V_{\max}$ (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	526,3	714,3
$V_{\max}$ (U.mg ⁻¹ .h ⁻¹)	67.787,5	89.287,5
$V_{\max}$ (U.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	1.129,8	1.488,1
K_m (mg/mL)	4,8	4,8

O método utilizado neste trabalho para a determinação da atividade pectina liase não permite expressar $V_{\max}$ em μmol , fato que impede o cálculo do k_{cat} . Apesar disso, é possível concluir que a PL I apresenta número de renovação (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) maiores para a pectina de baixa esterificação, visto que o K_m observado para ambos os substratos foi o mesmo e os dois parâmetros são diretamente proporcionais a $V_{\max}$.

4.4.8 Sensibilidade da atividade PL I a diferentes substâncias

A atividade PL I foi determinada na presença de várias substâncias, como mostrado na Tabela 12. Os cátions Co²⁺, Pb²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺ e Na⁺ mostraram-se mais eficientes na estimulação da atividade da PL I do que o Ca²⁺ na concentração de 2 mM.

Até o momento não existe nenhuma teoria geral que explique o efeito de cátions sobre atividade pectina liase, mas é possível que o principal efeito dos cátions bivalentes seja no substrato, alterando sua conformação, carga total e grau de agregação (SINITSYNA *et al.*, 2007).

O Hg²⁺ não causou efeito significativo na atividade PL, e o Mn²⁺ foi o único cátion capaz de inibir a PL I.

O efeito do Cu^{2+} sobre a atividade da PL I não pode ser avaliado visto que CuCl_2 reagiu com alguma substância durante o processo de determinação enzimática, formando um precipitado.

O citrato de sódio não causou efeito significativo, e o EDTA apresentou leve inibição da atividade PL I, provavelmente devido à interação com o sódio presente no substrato. Como pode ser observado na Tabela 12, o Na^+ mostrou-se capaz de estimular a atividade PL I.

Tabela 12. Efeito de substâncias sobre a atividade PL I de *A. giganteus*.

Substância	Atividade PL (%) [*]		
	CaCl_2 (5 mM)	2 mM	10 mM
CoCl_2	-	$153,6 \pm 6,6$	$91,9 \pm 2,0$
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	-	$134,7 \pm 3,2$	**
MgSO_4	-	$125,8 \pm 12,6$	**
BaCl_2	-	$132,4 \pm 10,4$	**
ZnSO_4	-	$116,9 \pm 4,8$	$54,7 \pm 6,1$
NaCl	-	$110,6 \pm 5,6$	**
CaCl_2	-	$107,4 \pm 2,8$	$116,9 \pm 2,4$
HgCl_2	-	$94,0 \pm 8,9$	**
MnSO_4	-	$88,5 \pm 3,7$	**
CuCl_2	-	**	**
Citrato de sódio	-	$96,6 \pm 0,6$	**
EDTA	-	$85,8 \pm 7,4$	**
DTT	+	$102,4 \pm 3,0$	$108,4 \pm 2,2$
2-Mercaptoetanol	+	$78,8 \pm 5,0$	$71,0 \pm 6,0$
Ácido iodoacético	+	$75,1 \pm 2,3$	$16,2 \pm 0,9$
PMSF	+	$67,2 \pm 2,5$	**
SDS	+	$6,4 \pm 0,9$	**

*Controle: 100 % $\pm$ 6,1.

**Determinação impossibilitada pela formação de precipitado ou alteração da cor.

A maior inibição da atividade PL I foi observada em presença de 2 mM de SDS. Detergentes, como o SDS, rompem as ligações hidrofóbicas que constituem o núcleo estável das proteínas globulares, desnaturando-as (NELSON, COX, 2004).

O DTT não causou nenhum efeito significativo na atividade da PL I nas concentrações testadas. O 2-mercaptoetanol causou leve inibição da atividade enzimática, sendo que o aumento de sua concentração de 2 para 10 mM não alterou significativamente seu efeito. O efeito inibitório do 2-mercaptoetanol deve-se provavelmente a clivagem de ligações dissulfeto da enzima, desestabilizando-a (NELSON, COX, 2004).

O ácido iodoacético inibiu a atividade da PL I, tendo sido tal efeito fortemente acentuado com o aumento de sua concentração de 2 para 10 mM. Como já mencionado anteriormente, o ácido iodoacético provoca a acetilação de grupos –SH, demonstrando a importância destes na catálise promovida pela PL I ou na estrutura tridimensional da enzima. O mesmo nível de inibição por ácido iodoacético na concentração de 10 mM foi observado para a PL de *Rhizopus oryzae* (HAMDY, 2005).

5. CONCLUSÕES

A poligalacturonase (PG) e a principal pectina liase (PL I) de *A. giganteus* foram purificadas até a homogeneidade eletroforética por estratégias de duas e três etapas, respectivamente.

O estudo da PG purificada de *A. giganteus* mostrou características interessantes tais como atividade máxima a 55 °C em meio levemente ácido, apresentando considerável nível de atividade também em pH neutro, bem como estabilidade acima de 95 % em uma ampla faixa de pH. Tais propriedades conferem a essa enzima grande potencial de aplicação, principalmente na indústria alimentícia, na extração, clarificação e despectinização de sucos de fruta, na fabricação de vinhos, maceração de vegetais para produção de pastas e purês, bem como na produção de ração animal.

A PL I mostrou atividade máxima a 50 °C em meio alcalino, apresentando-se ainda ativa em meio neutro. A maior estabilidade foi observada em pH neutro. Tais características conferem a essa enzima potencial para aplicação no tratamento de águas residuais provenientes de indústrias de processamento de alimentos vegetais, preparo de fibras têxteis, fermentação de café e chá, extração de óleo vegetal e tratamento da polpa de papel.

6. Referências bibliográficas

ALAÑA, A.; ALKORTA, I.; DOMÍNGEZ, J. B.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 3755-3759, 1990.

ALKORTA, I.; GABIRSU, C.; LHAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.

ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; RIERA, F. A.; COCA, J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. **Colloids and Surfaces**, v. 138, p. 377-382, 1998.

ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; MURUGESAN, S.; SWAMINATHAN, K. Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. pectinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 299-303, 2002.

ANTRANIKIAN, G. Microbial degradation of starch. In: WINKELMANN G. (ed). **Microbial degradation of natural products**. WEINHEIM: VCH, 1992, p. 27-51.

ATTILI, D. S. **Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação de Juréia-Itatins, SP.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil, 1995.

BARENSE, R. I., CHELLEGATTI, M. A. S. C., FONSECA, M. J. V., SAID, S. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 327-330, 2001.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BUSSINIK, H. J.; BUXTON, F. P.; FRAAYE, B. A.; DE GRAAFF, L. H.; VISSER, J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 83-90, 1992.

CABANNE, C.; DONÈCHE, B. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. **Microbial Research**, v. 157, p. 183-189, 2002.

CAZy Carbohydrate-Active Enzymes, <<http://www.cazy.org/index.html>>. Acesso em 02 jan. 2008.

CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; DE SOUSA, M. V.; FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 33-42, 2006.

CHELLEGATTI, M. A. S. C.; KAWANO, C. Y.; SAID, S.; FONSECA, M. J. V. Sequential synthesis and secretion of pectinases by *Penicillium frequentans*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 319-326, 2000.

COELHO, G. D.; CARMONA, E. C.; Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 269-277, 2003.

CONTREAS ESQUIVEL, J. C.; VOGET, C. E. Purification and partial characterization of an acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 21-28, 2004.

COOPER, R. M. The mechanisms and significance of enzymic degradation on host cell walls. In: CALLOW J. A. (ed). **Biochemical Plant Pathology**. Chichester, New York: Wiley, 1983, p. 101-137.

COURI, S.; PINTO, A. S.; DE SENNA, L. F.; MARTELLI, H. L. Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 16-21, 2003.

DEVI, N. A.; RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 59-65, 1996.

DE VRIES, R. P.; JANSEN, J.; AGUILAR, G.; PARENICOVÁ, L.; JOOSTEN, V.; WÜLFERT, F.; BENEN, J. A. E.; VISSER, J. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 530, p. 41-47, 2002.

DINU, D.; NECHIFOR, M. T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic

complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 128-137, 2007.

DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 91-98, 1998.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003.

FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JHNSON, K. G. α -4-O-methyl-D-glucoronidase component xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560-571, 1988.

FRAISSINET-TACHET, L.; FEVRE, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**, v. 33, p. 49-53, 1996.

GADRE, R. V.; DRIESSCHE, G. V.; BEEUMEN, J. V.; BHAT, M. K. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 321-330, 2003.

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

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

HAMDY, H. S. Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 205-211, 2005.

HAMES B.D., RICKWOOD D. (ed). **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990, v. 383, 2^a ed.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409-418, 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40; p. 2931-2944, 2005.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; DADHICH, K. S.; HOONDAL, G. S. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 467-473, 2000.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 277-282, 2000.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; TEWARI, R. Application of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239-243, 2004.

KAZUHIRO, I. Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi – Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 530-535, 2002.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to *Aspergillus* species and their telemorphs**. New South Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988, p. 34.

KOBAYASHI, T. HATADA, Y.; HIGAKI, N.; LUSTERIO, D. D.; OZAWA, T.; KOIKE, K.; KAWAI, S.; ITO, S. Enzymatic properteis and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1427, p. 145-154, 1999.

KOBAYASHI, T.; HIGAKI, N.; YAJIMA, N.; SUZUMATSU, A.; HAGIHARA, H.; KAWAI, S.; ITO, S. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 842-847, 2001.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFFER, W.; VRSANSKÁ, M.; WEBER, J.; AGRAWAL, P.; NIERSTRASZ, V. A.; GUEBITZ, G. M. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 390-401, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. London: **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LEONE, G.; VAN DEN HEUVEL, J. Regulation by carbohydrate of the sequential *in vitro* production of pectin enzymes by *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 2133-2141, 1986.

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

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

MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M.; CALLIERI, D. A. S. Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger*. **Current Microbiology**, v. 18, p. 303-306, 1989b.

MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M.; CALLIERI, D. A. S. Regulatory aspects of synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. **Sciences des Aliments**, v. 9, p. 101-110, 1989a.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; LEITE, R. S. R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 291-299, 2007.

MARTINEZ-RUIZ, A.; KAO, R.; DAVIES, J.; POZO, A. M. Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. **Toxicon**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 1549-1563, 1999.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426- 429, 1959.

MINJARES-CARRANCO, A.; TREJO-AGUILAR, B. A.; AGUILAR, G.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 25-31, 1997.

MOROZOVA, V. V.; SEMENOVA, M. V.; SALANOVICH, T. N.; OKUNEV, A. V.; BUBNOVA, T. V.; KRICHEVSKII, G. E.; TIMATKOV, A., G.; BARYSHEVA, N. V.; SINITSYN, A. P. Application of neutral-alkaline pectate lyase to cotton fabric boil off. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 603-608, 2006.

MUTTER, M.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonan α -L-Rhamnopyranohydrolase: a novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. **Plant Physiology**, v. 106, p. 241-250, 1994.

MUTTER, M.; COLQUHOUN, I. J.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galactopyranosyluronide lyase. **Plant Physiology**, v. 110, p. 73-77, 1996.

MUTTER, M.; RENARD, C. M. G. C., BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers: characterization of degradation products using

RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. **Carbohydrate Research**, v. 311, p. 155-164, 1998.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 355-361, 1998.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 57-67, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4^a. ed. W H Freeman & Co: Nova Iorque, 2004, 1124p.

NITURE, S. K., PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid médium by a strain of *Fusarium moliniforme*. **Microbial Research**, v. 159, p. 305-314, 2004.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88 p. 209-217, 2004a.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 631-639, 2004b.

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

PARENICOVA, L.; BENEN, J. A. E.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J. pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family

from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v. 251, p. 72-80, 1998.

PEDROLI, D. B.; GOMES, E.; MONTI, R.; CARMONA, E. C. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, n. 2, p. 191-200, 2008.

PEDROLI, D. B. **Produção e caracterização de poligalacturonase e pectina liase excretadas por *Aspergillus giganteus***. 2005. 54 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. London: Blackwell Scientific Publications, 1975, p.223-233.

PITT, D. Pectin Lyase from *Fhoma medicaginis* var. *pinodella*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 350-354, 1988.

RAPPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1965, p. 137-146.

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 115-123, 2000.

REID, I.; RICARD, M. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 499-504, 2004.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE A. H. (ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, v. 5, 1980, p. 227-272.

RUNCO, R.; NAVARRO, A. R.; MALDONADO, M. C. Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p. 487-491, 2001.

SAITO, K.; TAKAKUWA, N.; ODA, Y. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. **Microbial Research**, v. 159, p. 83-86, 2004.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3^a ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 347-349, 1992.

SEMENOVA, M. V.; GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**, Moscow, v. 68, n. 5, p. 559-569, 2003.

SINITSYNA, O. A.; FEDOROVA, E. A.; SEMENOVA, M. V.; GUSAKOV, A. V.; SOKOLOVA, M. L.; BUDNOVA, T. M.; OKUNEV, O. N.; CHULKIN, A. M.; VAVILOVA, E. A.; VINETSKY, Y. P.; SINITSYN, A. P. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 5, p. 565-571, 2007.

SOARES, M. M. C. N.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 79-82, 2001.

SORIANO, M.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. **Current Microbiology**, v. 50, p. 114-118, 2006.

THEIS, T.; MARX, F.; SALVENMOSER, W.; STHAL, U.; MEYER, V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 47-56, 2005.

VAN ALEBEEK, G. J. W. M.; CHRISTENSEN, T. M. I. E. ; SCHOLS, H. E.; MIKKELSEN, J. D.; VORAGEN, A. G. J. Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C₆-substituted oligogalacturonides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 25929-25936, 2002.

VARGA, J.; JUHÁSZ, A.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 627-640, 2004.

VICKEN, J. P ;SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I: implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781-1789, 2003.

VOGEL, H .J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.

VLUGT-BERGMANS, C. J. B.; MEEUWSEN, P. J. A.; VORAGEN, A. G. J.; VAN OUYEN, A. J. J. Endo-Xylogalacturonan Hydrolase, a Novel

Pectinolytic Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 36-41 2000.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P., MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

ZHANG, J.; HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G. Polygalacturonase is the key component in the enzymatic retting of flax. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 85-89, 2000.