UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Cristiane Abe Gargel

Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase

São José do Rio Preto

2011

Cristiane Abe Gargel

Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-Orientadora: Profª. Drª. Milla Alves Baffi

São José do Rio Preto

2011

Gargel, Cristiane Abe.
Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase / Cristiane Abe Gargel – São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
54 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Roberto da Silva
Coorientador: Milla Alves Baffi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas. 3. Fermentação. 4. Vinho e vinificação. I. da Silva, Roberto. II. Baffi, Milla Alves. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Cristiane Abe Gargel

Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP- São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP- São José do Rio Preto

Profª. Drª. Daniela Alonso Bocchini Martins
UNESP- Araraquara

São José do Rio Preto, 19 de setembro de 2011.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Luiza e Luiz, aos meus irmãos Cláudia e Cleber, pelo incentivo constante e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter guiado meus caminhos e por tudo que tem realizado em minha vida.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado incentivando e apoiando minhas decisões – a meus irmãos e aos meus pais, principalmente, pelo exemplo de batalha e superação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo apoio, paciência, acolhimento e ensinamentos transmitidos.

À minha co-orientadora Profª. Drª. Milla Alves Baffi, pela amizade, pela paciência, pela dedicação de ter transmitido todas as técnicas detalhadamente desde o início para que eu pudesse ter sucesso em meus experimentos.

A todos os colegas do laboratório, Thiago Okubo, Ariane, Larissa, Carol, Márcia, Tássia, Andreia, Nati, Dani, Ellen, Fabi, Ana Lúcia, Bárbara, Gi, Rodolfo, Sarah, Ariane Movio, Josi, Fer, Pri, Celso, Diego, Pedro, Marquinhos, Janaína, Babi, Thiago Ohe, Amanda, Bruna, Bruno, Rafa, Bárbara Garcia, Ricardo, André e Ruan pelo convívio diário, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelos momentos de descontração e alegria.

À Cati e Camila, pela amizade e cumplicidade desde o início do mestrado.

A todos aqueles que torceram pelo meu trabalho.

Ao sr. Sebastião Santin pelo fornecimento das uvas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e o apoio financeiro.

“A educação é o descobrimento progressivo de nossa ignorância”.

Will Durant

RESUMO

Enzimas são de grande importância para a indústria de alimentos, a fim de facilitar e acelerar os processamentos. Pectinases são enzimas amplamente utilizadas no processamento de vinhos, facilitando o processo de maceração, clarificação e a filtração do mosto. Outra enzima de grande importância na fabricação de vinhos, é a tanase. A coloração do vinho se deve à presença de taninos; a oxidação destes compostos em contato com o ar pode causar uma turbidez indesejável e consequentemente perda da qualidade do produto final. Essa turbidez pode ser evitada com o emprego de tanases, que impedem a reação de oxidação. Como a maioria dos formulados comerciais destas enzimas são provenientes de fungos filamentosos nao pertencentes ao ambiente vinicola, estes formulados contêm também outras enzimas não adequadas para aplicação no vinho, produzindo alguns efeitos indesejáveis. Assim, a busca por leveduras autóctonas, isto é, do próprio ecossistema vínico, produtoras de tais enzimas faz-se necessária. Outra enzima de grande importância no processamento de vinhos é a invertase, que hidrolisa a sacarose liberando frutose e glicose. Ao lado da vinificação, a frutose é considerada 40% mais doce que a sacarose, sendo assim, de grande importância ao processamento de vinho. No Brasil, a região de Jales, no Noroeste Paulista, vem despontando como um importante centro de produção de uvas e recentemente alguns produtores começaram a processar vinho de maneira artesanal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a triagem de leveduras autóctonas isoladas de uma vinícola da região de Jales para a produção de poligalaturonases, tanases e invertases visando a aplicação no processamento e no melhoramento de vinhos. Foram rastreadas diferentes linhagens pertencentes a treze diferentes espécies de leveduras. Não foram encontradas atividades significativas para as pectinases e tanases. Entretanto, uma linhagem de *Candida stellata* produziu atividade de invertase, atingindo 10,6 U / mL em 48 horas de fermentação, contra 2,53 U / mL de invertase em *Saccharomyces cerevisiae*. A enzima apresentou máxima atividade no pH 3,0 e temperatura de 55°C. A alta atividade de invertase desta levedura habilita-a como potencial produtora de invertase para a indústria de alimentos.

ABSTRACT

Enzymes are important for the food industry in order to facilitate and accelerate the processing of food. Pectinases are enzymes widely used in wine processing, facilitating the process of maceration, clarification and filtration of the must. Another enzyme of great importance in wine production is the Tanase. The color of the wine is due to the presence of tannins, the oxidation of these compounds in contact with air can cause an undesirable turbidity and consequently loss of product quality. This turbidity can be avoided by employing Tanase, which prevent the oxidation reaction. As most of these commercial enzymes are made from filamentous fungi, which do not belong to the winery environment, this formula also contains other enzymes that are not suitable for application in the wine, producing some side effects. Thus, the quest for autochthonous yeasts, ie, from the own wine ecosystem, producing such enzymes is necessary. Another enzyme of great importance in the processing of wine is invertase, which hydrolyzes sucrose releasing fructose and glucose. Besides the importance for winemaking, fructose is considered 40% sweeter than sucrose, therefore, of great importance to the food industry. In Brazil, the region of Jales, Sao Paulo in the Northwest, has emerged as an important center of production of grapes, and recently some farmer began to produce artisanal wine. Thus, this study aimed at screening of autochthonous yeasts isolated from a winery from Jales region, which are able to produce poligalaturonases, Tanase and invertase in order to apply in the processing of wines. From, thirteen different strains belonging to different species of yeast, there were no significant activities to Tanase and pectinases. However, one strain of *Candida stellata* produced invertase activity, reaching 10.6 U / mL in 48 hours fermentation, compared to 2.53 U mL from a bakery *Saccharomyces cerevisiae*. The enzyme showed maximal activity at pH 3.0 and 55 ° C. The high invertase activity of this yeast enables it as a potential producer of invertase to the food industry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....16
2.1 Aspectos gerais da produção do vinho.....**16**
2.2 Pectinase.....**18**
2.2.1 Enzima desmetoxilante ou desesterificante.....**21**
2.2.2 Enzimas despolimerizantes.....**22**
2.2.3 Aplicação de Pectinases na Indústria de vinhos.....**23**
2.3 Tanase.....**23**
2.3.1 Aplicações industriais das Tanases.....**25**
2.3.2 Produção de tanase Microbiana **25**
2.4 Invertase - Importância, Ação, Produção e Aplicação.....**26**

3. OBJETIVOS.....31
3.1 Geral.....**31**
3.2 Específicos.....**31**

4. MATERIAL E MÉTODOS.....32
4.1 Linhagem de leveduras utilizadas.....**32**
4.2 Rastreamento para produção de poligalacturonases.....**33**
4.2.1 Análise qualitativa.....**33**
4.2.2 Análise quantitativa.....**33**
4.2.3 Avaliação do crescimento celular.....**34**
4.2.4 Determinação da atividade de poligalacturonase.....**34**
4.3 Rastreamento para produção de tanase.....**34**
4.3.1 Medida da atividade enzimática da tanase.....**35**
4.4 Rastreamento para produção de invertase.....**35**
4.4.1 Medida da atividade enzimática da invertase.....**36**
4.5 Caracterização da invertase.....**36**
4.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima.....**36**
4.5.2 Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH.....**37**
4.5.3 Determinação da atividade da enzima em diferentes concentrações de etanol.....**37**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....37
5.1 Rastreamento para atividade de poligalacturonase.....**37**
5.2 Rastreamento para atividade de tanase.....**38**
5.3 Rastreamento para atividade de invertase.....**38**
5.4 Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de invertase.....**41**
5.5 Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH.....**42**

6. CONCLUSÃO.....46

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Uvas rústicas e sucos e vinhos elaborados de forma artesanal**.....18**

Figura 2. Estrutura química da molécula de pectina.**.....19**

Figura 3. Modo de ação das enzimas pectinolíticas**.....21**

Figura 4. Hidrólise do ácido tânico**.....24**

Figura 5. Reação de hidrólise da sacarose pela invertase**.....27**

Figura 6. Perfil da produção de invertase por *Candida stellata***.....38**

Figura 7. Perfil da produção de invertase por *Saccharomyces cerevisae***.....39**

Figura 8. Células viáveis de *S.cerevisae* (a) e pH do meio (b); células viáveis de *C.stellata* (c) e pH do meio (d)**.....40**

Figura 9. Caracterização físico-química da invertase. Efeito do pH (a) e efeito da temperatura (b)**.....41**

Figura 10. (a) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da invertase pré-incubada por 24 horas; (b) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da invertase pré-incubada por 1 hora**.....43**

Figura 11. Efeito da concentração de etanol na atividade da enzima invertase **.....44**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de leveduras e suas respectivas linhagens utilizadas**.....32**

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM: alto teor de metoxilação

BTM: baixo teor de metoxilação

°C: grau Celsius

g / L: grama por litro

g: grama

kDa: Kilodalton

MTM: médio teor de metoxilação

mL: mililitro

M: molar

min: minutos

mg / mL: miligrama por mililitro

nm: nanômetro

rpm: rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

U / mL: unidades por mililitro

µL: micro litros

µmol: micro molar

YNB: Yeast Nitrogen Base

YEPD: Yeast Extract Peptone Dextrose

YEP: Yeast Extract Peptone

1. INTRODUÇÃO

O vinho é a bebida proveniente da fermentação alcoólica do mosto de uva sadia, fresca e madura por leveduras vínicas presentes neste meio de fermentação.

A fermentação depende da ação combinada de várias cepas que se desenvolvem espontaneamente durante o processo, a partir da carga microbiana inicial das próprias uvas (FLEET, 2003).

Dentro das espécies de leveduras que podem ser encontradas em uma fermentação alcoólica, percebeu-se que *Saccharomyces cerevisiae* é a mais apta a consumir e converter em etanol todos os açúcares fermentescíveis e, portanto, assegurar o processo fermentativo (CATALUÑA, 1984; JOSHI; PANDEY, 1999).

Leveduras autóctonas podem produzir algumas enzimas ou metabólitos que são capazes de degradar algumas substâncias. As atividades enzimáticas são procedentes da própria uva e também dos micro-organismos presentes no mosto (VAN RENSBURG; PRETORIUS, 2000).

Enzimas são de grande importância para as indústrias, a fim de facilitar e acelerar os processamentos. Pectinases, são enzimas amplamente utilizadas no processamento de vinhos, facilitando o processo de maceração, clarificação e a filtração do mosto. Outra enzima de grande importância na fabricação de vinhos é a tanase. A coloração do vinho se deve à presença de taninos; a oxidação destes compostos em contato com o ar pode causar uma turbidez indesejável e consequentemente perda da qualidade do produto final. Essa turbidez pode ser evitada com o emprego de tanases, que impedem a reação de oxidação. Como a maioria destas enzimas são de origem fúngica, não estão totalmente adequadas para aplicação no vinho, produzindo alguns efeitos colaterais. Assim, a busca por leveduras autóctonas, isto é, do próprio ecossistema vínico, produtoras de tais enzimas faz-se necessária. Outra enzima de grande importância no processamento de vinhos é a invertase, que hidrolisa a sacarose liberando frutose e glicose, considerada 40% mais doce que a sacarose, sendo assim de grande importância ao processamento de vinho.

No Brasil, a região de Jales, no Noroeste Paulista, vem despontando como um importante centro de produção de uvas e recentemente começou a processar vinho de maneira artesanal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a triagem de leveduras autóctonas isoladas de uma vinícola da região de Jales para a produção de poligalaturonases, tanases e invertases visando a aplicação no processamento e no melhoramento de vinhos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da produção do vinho

O estudo dos recursos microbianos presentes nos ecossistemas de vinícola é de indubitável interesse para a aplicação desses micro-organismos e de seus metabólitos na indústria vinícola. Para a obtenção de vinhos de qualidade, é necessário escolher uma cepa de levedura adequada, de modo que a qualidade do vinho possa ser considerada como uma consequência direta da evolução da flora microbiana do mosto durante a fermentação, pois ocorrem substituições de leveduras ao longo do processo fermentativo.

Muitos estudos foram realizados sobre as leveduras vínicas desde que Pasteur, em 1866, demonstrou que elas eram responsáveis pela transformação dos açúcares do mosto em etanol. A partir de então, ficou claro que as fermentações alcoólicas realizadas espontaneamente não são devidas à ação de uma única levedura e sim que se trata do resultado da ação combinada de diversas espécies de leveduras que crescem em diferentes proporções ao longo de uma fermentação (ZOTT, 2008).

O estudo da diversidade microbiológica da uva e a caracterização das leveduras que competem e às vezes dirigem as fermentações de mostos faz-se necessário, uma vez que a biota leveduriforme e suas enzimas e metabólitos desempenham um papel relevante nas características do produto final (BARRAJÓN et al., 2009).

Preparações comerciais usadas durante a maceração das uvas são tipicamente misturas de pectinases, celulases, hemicelulases e outras enzimas com atividade de carboidrolases, que atuam na parede celular das uvas,

composta por polissacarídeos, tais como pectina, celulose e hemicelulose. A degradação de polissacarídeos estruturais por carboidrolases pode resultar em melhora no rendimento de extração de suco, clarificação e filtrabilidade durante a produção de vinhos. A ação destas enzimas também facilita a liberação e solubilização de compostos fenólicos e precursores glicosilados de células da casca, sementes e da baga fresca. A extração aumentada de compostos fenólicos, como taninos, leva a mais pigmentos poliméricos formados em vinhos tintos envelhecidos, resultando em aumento da intensidade da cor, da estabilidade e do aroma (LOUW et al., 2006).

A viticultura é uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos tradicionais países produtores da Europa. No mercado externo, dentre os principais produtores destacam-se os países tradicionais do Velho Mundo, como França, Itália, Espanha, Portugal e Alemanha e, recentemente, os países do Novo Mundo como EUA, Chile, Austrália, Nova Zelândia e Argentina. No Brasil, a produção de uvas destinadas ao vinho está localizada principalmente no Rio Grande do Sul (IBRAVIN, 2007).

Os importados ainda representam a maior fatia do mercado nacional, em função da taxa de câmbio que favorece as importações e a preferência do consumidor brasileiro pelo produto importado. As exportações brasileiras de vinho ainda são pequenas. No Rio Grande do Sul, algumas vinícolas se associaram para promover o vinho brasileiro, com o objetivo de competir com os vinhos importados, bem como buscar o mercado externo. No cenário nacional a vitivinicultura está em crescimento e constitui alvo de pesquisas e estratégias de políticas públicas. Porém, há ainda muito a fazer para se atingir um mercado externo mais amplo, como a união das empresas num projeto comum e o contínuo investimento em novas tecnologias.

Em São Paulo, a expressiva produção de uvas destina-se basicamente ao consumo in natura. Embora predomine o cultivo de uvas de mesa, o mercado de uvas para vinhos está em plena expansão. Atualmente, estão sendo criados alguns projetos que colocam o Estado na liderança do setor, como os projetos “Revitalização da Cadeia Vitivinícola Paulista” e o “SP Vinho” (UVIBRA, 2007). Na região do Noroeste Paulista, no município de Jales, a vinicultura está em fase de expansão. A produção de vinhos de qualidade vem

sendo incentivada pela Prefeitura, pela Embrapa e outras entidades ligadas à agricultura (MELLO, 2007). Essa iniciativa é muito importante, de modo que o vinho da região seja produzido com qualidade e permite que o Estado passe a produzir mais e a importar menos. Atualmente, os vinhos produzidos nesta região são provenientes de uvas rústicas e são produzidos de forma artesanal (Figura 1).

(a) (b)

Figura 1. (a) Uvas rústicas e (b) sucos e vinhos elaborados de forma artesanal.

2.2. Pectinase

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores. Quimicamente, são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α-1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (VILARIÑO et al., 1993; KASHYAP et al., 2000; LIMBERG et al., 2000; GUMMADI; PANDA, 2003) e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (SAKAI et al., 1993; KASHYAP et al., 2000) (Figura 2).

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas,

clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos.

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo estes três últimos total ou parcialmente solúveis em água (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2000). O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (SAKAI et al., 1993). Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α-1, 4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (Figura 2) (ALKORTA et al., 1998; LANG; DORNENBURG, 2000; GUMMADI; PANDA, 2003; DA SILVA et al., 2005). “Pectinas com alto teor de metoxilas” (acima de 50%) são frequentemente denominadas apenas “pectinas” e têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que a geleificação de pectinas com baixo teor de metoxilação é possível na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos (SAKAI et al., 1993; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004).

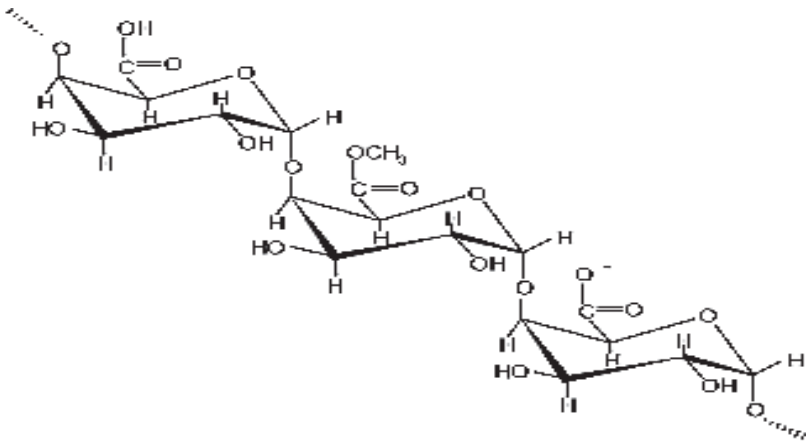


Figura 2. Estrutura química da molécula de pectina (HOURDET; MULLER, 1991).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de micro-organismos, mas os fungos filamentosos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO et al., 2001).

Muitas preparações de pectinases comerciais usadas na indústria de alimentos são derivadas de *Aspergillus niger*. Entretanto, este fungo secreta outras enzimas que produzem efeitos indesejáveis, como o aumento da turbidez do vinho (WHITAKER, 1984). Em função disso, estudos buscando leveduras produtoras de pectinases, em especial leveduras do gênero *Saccharomyces* devido a sua importância na fermentação alcoólica, vem aumentado nos últimos anos (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2005).

Leveduras *Saccharomyces*, em especial *S. cerevisiae*, são as principais envolvidas na produção de vinhos, tanto em fermentações espontâneas, ou como cultivos iniciadores comerciais (*starters*) (FLEET, 2003). Alguns estudos relatam *Saccharomyces sp* capazes de produzir pectinases (GAINVORS et al., 1994; FERNÁNDEZ- GONZÁLEZ et al., 2005). Blanco et al. (1997) relataram que quando linhagens de *S.cerevisiae* produtoras de poligalacturonases foram usadas na vinificação, o tempo de filtração foi reduzido pela metade.

A síntese destas enzimas sofre influência dos componentes do meio de cultura, particularmente da fonte de carbono, presença de indutores (pectina e derivados) e das condições de cultivo, como pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (BLANDINO et al., 2001; GUMMADI; PANDA, 2003; SOUZA et al., 2003). Com relação às técnicas de fermentação, a fermentação em estado sólido, utilizada para fungos filamentosos, geralmente é preferida por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e, consequentemente, com menores custos de extração e purificação (DE GREGORIO et al., 2002; SILVA et al., 2005). Substratos típicos são resíduos agroindustriais, como cascas de frutas cítricas, bagaço de beterraba doce e extratos de farelo de trigo (BLANDINO et al., 2001; UENOJO, 2003), por serem fontes de energia alternativa para crescimento e metabolismo e por estarem abundantemente disponíveis (UENOJO, 2003; KAUR et al., 2004; SILVA et al., 2005).

A classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (ALKORTA et al., 1998), pela preferência de substrato

(pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (SAKAI et al., 1993; KASHYAP et al., 2000; ZHENG; SHETTY, 2000; SILVA et al., 2005).

Existem basicamente três tipos de pectinases (Figura 3): pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (SAKAI et al., 1993).

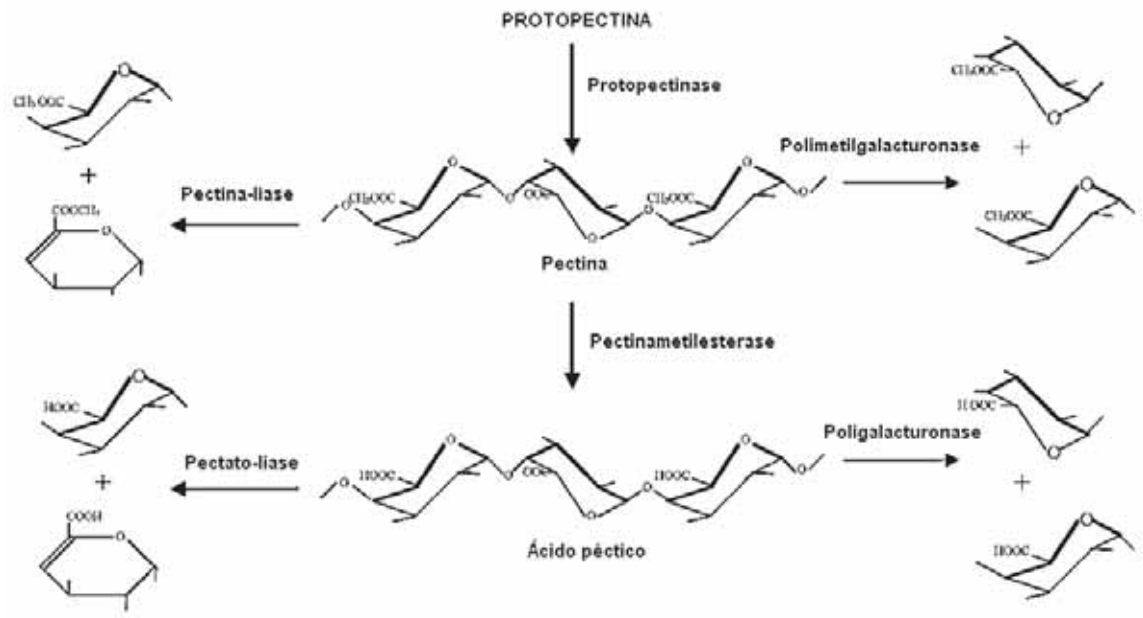


Figura 3. Modo de ação das enzimas pectinolíticas (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN (2007).

2.2.1. Enzima desmetoxilante ou desesterificante

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (SHEN et al.,1999; GUMMADI; PANDA, 2003). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (KASHYAP et al.,

2001), apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50 °C. Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas. Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécticas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA et al., 1998).

2.2.2. Enzimas despolimerizantes

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido péctico ou pectina como substrato. Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α-1,4) e as liases (catalisam a β-eliminação) (GAINVORS et al., 1994; ALKORTA et al., 1998).

Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. A polimetilgalacturonase (PMG) presumivelmente hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos (RIZATTO, 1999) por clivagem de ligações α-1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG (SAKAI et al., 1993; RIZATTO, 1999; KASHYAP, 2001). As poligalacturonases (PG) hidrolisam α-1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico (MUTLU et al., 1999). É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido péctico (KASHYAP, 2001).

Liases

As liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado

(KASHYAP et al., 2001) e incluem as pectina liases e as pectato liases. Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) catalisa a β- eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo ou exo (GAINVORS et al., 1994; WHITAKER, 1994; KARAM; BELARBI, 1995).

Pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α-1,4 de ácido péctico de modo endo- ou exo- por transeliminação (KASHYAP et al., 2001) e tem pH ótimo na região alcalina (SAKAI et al., 1993; MAYANS et al., 1997).

2.2.3. Aplicação de Pectinases na Indústria de vinhos

Pectinases, em conjunto com β-glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinho. As vantagens do uso das três enzimas são: melhoram a maceração da casca e aumentam a extração de pigmentos, facilitam a clarificação e a filtração do mosto e aumentam a qualidade e a estabilidade do vinho (BHAT, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2000; TAKAYANAGI et al., 2001). A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpenos no vinho. Preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina metil esterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (BHAT, 2000).

Enzimas pectinolíticas adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto resultam no melhoramento das características visuais (cor e turbidez), quando comparadas com vinhos não tratados, apresentando características cromáticas consideradas melhores que os vinhos controle.

2.3. Tanase

Tanino acil hidrolase conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis

(BANERJEE et al., 2001). Tanase (Figura 4) é uma enzima extracelular, indutível, produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. (AGUILAR et al., 1999). O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável, que pode ser hidrolisado por tanase em glicose e ácido gálico (HELBIG, 2000).

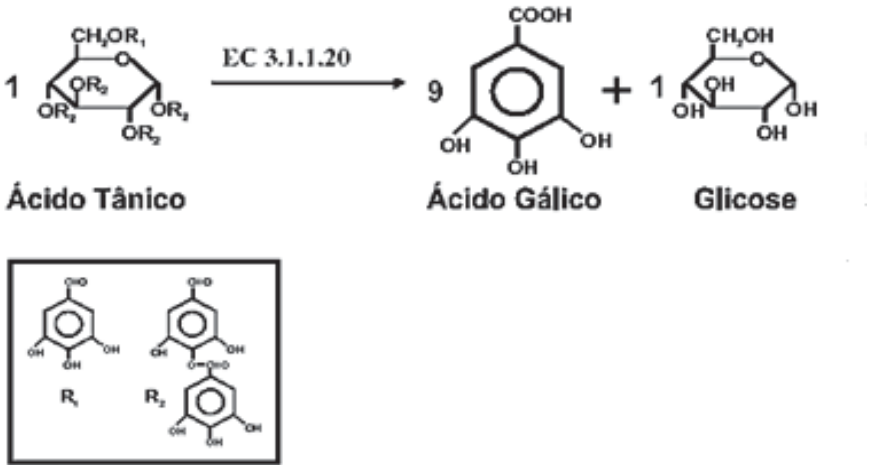


Figura 4. Hidrólise do ácido tânico (AGUILAR et al., 1999)

Existem estudos de produção da tanase por fermentação sólida, líquida e submersa (LEKHA; LONSANE, 1994). A fermentação sólida para a produção de enzimas oferece vantagens sobre o método de fermentação submersa e líquida convencional (LAGEMAAT; PYLE, 2001). O meio de produção é simples, pode-se utilizar subprodutos agroindustriais como casca de uva, caju, café ou farelo de trigo, arroz e aveia, acrescidos de ácido tânico. Lekha e Lonsane (1997) produziam tanase de *Aspergillus niger* e *Penicillium glabrum* utilizando farelo de trigo e Aguilar e Gutiérrez-Sanchez (2001) e Lagemaat e Pyle (2001) produziram tanase embebido no substrato de espuma de poliuretano.

2.3.1. Aplicações industriais das tanases

Embora existam muitas aplicações industriais da tanase em potencial, poucas são efetivamente empregadas devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado. A enzima tem vasta aplicação na indústria de alimentos: sucos, cerveja; em cosméticos, fármacos e indústria química. Ela é principalmente utilizada para a produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos, produção de antioxidantes e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BANERJEE et al., 2001).

2.3.2. Produção de tanase microbiana

Tanino acil hidrolase pode ser obtida a partir de fonte vegetal, animal e microbiana. Os micro-organismos são a fonte mais importante de obtenção da tanase (BANERJEE; KAR, 2000).

A tanase é produzida na presença de indutor, assim a utilização do ácido tânico como indutor ou única fonte de carbono, é fundamental. Apesar de outras fontes de carbono poderem estar presentes no meio, a concentração de ácido tânico é o fator predominante na produção da enzima. Diferentes fontes de nitrogênio, inorgânicas e orgânicas, como sulfatos de amônio, nitrato de sódio e peptona, têm sido utilizadas para a produção de tanase através de fermentação sólida (PINTO, 2003).

A exploração adequada da fermentação sólida, usando resíduos da agroindústria, pode significar a redução do custo de produção de tanase. O uso de resíduos agroindustriais pode ajudar não somente a reduzir a poluição ambiental, mas também agregar valor às indústrias processadoras (PANDEY et al., 2000).

O primeiro relato de produção de tanase por fermentação sólida data de 1917, onde se utilizou a linhagem *Aspergillus oryzae* crescendo em farelo de trigo como substrato. Neste trabalho observou-se que a produção de tanase era maior à medida que se aumentava a concentração de tanino no meio. A partir de 20% de tanino, o crescimento do fungo foi inibido (LEKHA; LONSANE, 1994). No final da década de 50, vários fungos foram testados em meio

contendo farelo de trigo. Observou-se que a tanase podia ser produzida por *Penicillium spp*, tendo como indutor ácido tânico ou ácido gálico. Estudos comparativos da produção de tanase por *Aspergillus niger* empregando três métodos de fermentação revelaram que a fermentação sólida produziu 2,5 a 4,8 vezes mais enzima do que na fermentações submersa (LEKHA; LONSANE, 1994).

Com relação aos micro-organismos produtores de tanase, aceita-se, em geral, que as bactérias são muito sensíveis à presença de ácido tânico, porém bactérias como *Bacillus, Corynebacterium, Klebsiella, Streptococcus bovis* e *Selemonas ruminantium* são capazes de crescer neste composto e também de degradá-lo. Entretanto, os micro-organismos mais estudados são os fungos filamentosos, entre eles *Assochyta, Aspergillus, Chaetomiun, Mucor, Myrothecium, Neurospora, Rhizopus, Trichothecium* e *Penicilium* (LEKHA; LONSANE, 1997). Apesar de vários micro-organismos produzirem tanase, estas não são igualmente ativas com todos os taninos hidrolisáveis. Existem poucos dados sobre tanases produzidas por leveduras, e estas são efetivas somente na decomposição do ácido tânico. Em contrapartida as tanases bacterianas e fúngicas são eficientes na degradação de ácido tânico e outros taninos hidrolisáveis que ocorrem na natureza (PINTO, 2003).

Devido a este fato, observa-se a necessidade de mais estudos e identificações de tanases produzidas por leveduras, logo que estas já estão presentes no próprio mosto e seria de grande utilidade ao processamento de vinhos.

2.4. Invertase

Invertase ou β-D frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica da sacarose em glicose e frutose (MARQUEZ, 2007).

Historicamente, esta enzima tem grande importância, uma vez que foi a primeira proteína a ser identificada como um biocatalisador. Também, foi a partir de estudos com invertase, que foram construídos os princípios fundamentais da enzimologia, como a hipótese de chave-fechadura para atividade enzimática (BROWN, 1902), a equação de Michaelis-Menten

(MICHAELIS; MENTEN, 1913), o conceito de ponto isoelétrico (MICHAELIS; DAVIDSONH, 1911; MICHAELIS; ROTHSTEIN, 1920) e a hipótese de Briggs e Haldane (1925), em que o complexo formado entre enzima e substrato não representa um equilíbrio, mas sim um estado estacionário.

Seu nome comum, invertase, deve-se ao fato de que a hidrólise da sacarose leva à inversão da rotação óptica do meio reacional, basicamente em consequência do surgimento de frutose, quando observado em polarímetro. O produto de hidrólise da sacarose, o xarope de glicose e frutose, como ilustrado na Figura 5, é conhecido como “açúcar invertido”, o qual apresenta diversas características interessantes em relação ao xarope de sacarose: maior poder educorante (devido à presença da frutose), maior possibilidade de concentração (os monossacarídeos formados são mais solúveis que o dissacarídeo original), ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo (em virtude da maior pressão osmótica do produto) (KOBLITZ, 2008). Invertases são amplamente usadas pelas indústrias de alimentos e bebidas.

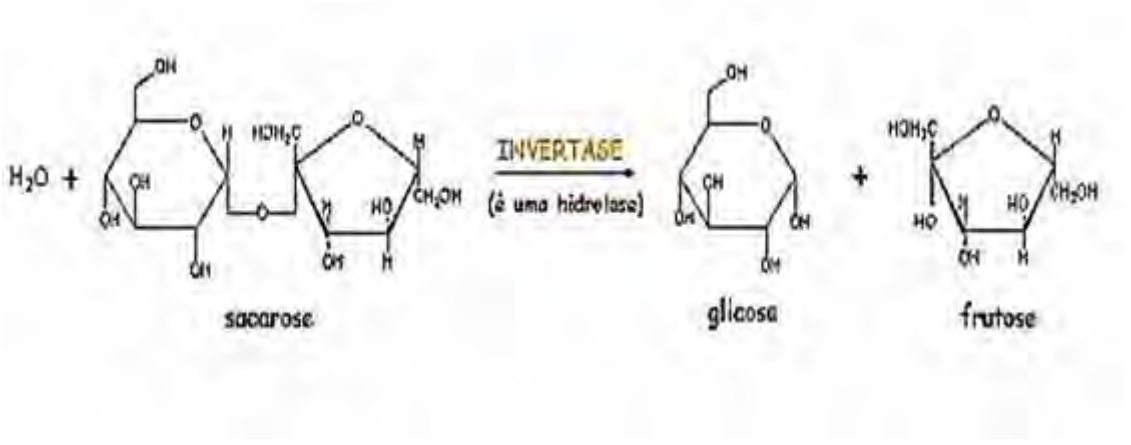


Figura 5. Reação de hidrólise da sacarose pela invertase.

O açúcar invertido é amplamente utilizado na indústria de confeitos, sorvetes, na panificação e produtos afins, na formulação de cremes para recheio e de geleias. O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia pois a frutose é mais doce que a sacarose (cerca de 40%) e não cristaliza tão facilmente melhorando a textura de doces e sorvetes. É

importante tanto na fabricação do xarope de glicose e frutose quanto com a formação dos frutooligossacarídeos (SAID; PIETRO, 2004).

O xarope de açúcar invertido possui aplicação na indústria alimentícia como adoçante em diversos produtos ou é usado como matéria-prima na obtenção de frutose e ácido glicônico (BON; PEREIRA, 1999).

A utilização de açúcar invertido é vantajosa para indústrias de alimentos e bebidas em relação à sacarose diluída pelas suas características próprias: estável em altas concentrações (alta solubilidade); baixa atividade de água, cor e turbidez; maior doçura relativa; maior "shelf life" e maciez devido a uma melhor distribuição da umidade; inibição da cristalização (higroscopicidade); reação de Maillard positiva, interessante em alguns processos industriais; redução do ponto de congelamento e menor custo de frete por ocupar menor volume (BERTO, 2001).

Industrialmente o processo econômico utilizado é por hidrólise ácida. Esse método é bastante utilizado nos Estados Unidos e é também o método empregado no Brasil. Entretanto, o produto obtido por hidrólise ácida é bastante colorido (devido a formação de hidroximetilfurfural), uma vez que as condições de reação são drásticas (pH baixo e temperatura elevada). Praticamente todo açúcar invertido que é produzido, é realizado por hidrólise ácida, que necessita de neutralização, forma resíduos tóxicos, e necessita de altas temperaturas. A hidrólise enzimática, por sua vez, não gera resíduos, não necessita de altas temperaturas e ainda tem a vantagem de uma taxa de conversão maior que a ácida devido à especificidade da enzima pela sacarose.

O processo enzimático resulta em um xarope de melhor qualidade, uma vez que o mesmo apresenta grau de cristalização menor, bem como não apresenta coloração. Esse procedimento ainda é de uso restrito em alguns países da Europa e Japão (RODRIGUES et al., 2000). O fator limitante no uso da hidrólise enzimática da sacarose é o elevado custo da enzima.

Pesquisas recentes apontam potenciais usos da invertase na produção de ácido lático, a partir da fermentação de melaço de cana (ACOSTA et al., 2000); na produção de etanol, onde evitariam a formação de sorbitol durante o processo de bioconversão (LEE; HUANG, 2000). Na sua forma imobilizada, essa enzima também apresenta potencial na fabricação de xaropes, o que permitiria sua utilização em várias bateladas ou de forma contínua.

De acordo com Bagal et al. (2007), a invertase imobilizada pode ser usada em biosensores de sacarose, muito importante para indústrias de alimentos e bebidas. A adição de invertase ao suco de fruta promove aumento de teores de glicose e frutose. A hidrólise da sacarose a 30-40ºC reduz custos de produção quando se utiliza invertase imobilizada, devido à reutilização deste biocatalisador e o uso de um processo contínuo (TOMATONI; VITOLO, 2007).

O xarope de frutose é empregado como adoçante em indústrias alimentícias, indústrias farmacêuticas e também é usado para obter frutose cristalina (ASHOKKUMAR; KAYALVIZHI; GUNASEKARAN, 2001).

As invertases usadas industrialmente são principalmente oriundas de leveduras, sendo que 80% das enzimas são extracelulares e os 20% restante são intracelulares. A forma extracelular é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a interna é destituída dos mesmos. Apresentam atividades catalíticas similares, mas a sua composição de aminoácidos é diferente, a invertase extracelular contém cisteína enquanto a interna não (MARQUEZ, 2007).

A sacarose é um dissacarídeo não redutor o qual por hidrólise com ácidos muito diluídos, resinas de troca catiônica ou a enzima invertase, fornece proporções equimolares de D-glicose e D-frutose (BARBOSA-FILHO et al., 2000). A sacarose é extensivamente utilizada em alimentos e bebidas como adoçante, e como nutriente em processos fermentativos. Ela é produzida a partir da beterraba ou da cana-de-açúcar, sendo esta última sua fonte natural mais importante (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

A invertase é classificada na família GH32 de glicosídeos hidrolases, que inclui mais de 370 elementos, sendo relatados em vegetais (aspargo, beterraba, cebola, chicória, entre outras) (KOBLITZ, 2008), bactérias, leveduras (*Saccharomyces sp*.) e fungos filamentosos *(Aspergillus sp*.) (ALEGRE et al., 2009).

Em *Saccharomyces cerevisae,* está presente em ambas as formas, intracelular e extracelular (CARLSON et al., 1983), sendo a última glicosilada, sendo regulados pela glicose. A forma extracelular tem sido encontrada no espaço periplasmático como os dímeros, tetrâmeros e hexâmeros, com aproximadamente 260, 360 e 560 kDa de massa molecular, respectivamente (CHU et al., 1983).

Em geral, a invertase produzida por leveduras é intracelular e a produzida por fungos filamentosos é extracelular (PEBERDY, 1994; HEMMING, 1995).

A menor forma não glicosilada (60 kDa) está retida intracelularmente. Ambas proteínas são sintetizadas a partir da mesma estrutura genética e possuem proteínas idênticas com subunidades com massa molecuar de 60 kDa (CARLSON; BOSTEIN, 1982).

As enzimas ligadas á parede apresentam uma grande fração glicídica através da qual acredita-se que se liguem a mananas da parede celular. Sua temperatura ótima de atuação é 55°C para soluções diluídas de sacarose e de 65°C a 70°C para soluções com concentração superior a 10%. Soluções acima de 20% de sacarose apresentam taxas decrescentes de hidrólise em virtude da reduzida disponibilidade de água no meio reacional (KOBLITZ, 2008). A termoestabilidade da invertase pode ser devido à estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato – proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (MARQUEZ et al., 2007).

Como esta enzima é encontrada facilmente em leveduras, seria de grande importância para o processamento de vinhos a descoberta de leveduras capazes de produzir invertase, além da *Saccharomyces cerevisae*. Assim, ocorrendo a hidrólise da sacarose, produzindo glicose e frutose, ocorreria um aumento no teor de açúcar, consequentemente no teor alcoólico e na qualidade do vinho.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Rastrear leveduras autóctonas para a produção de pectinases, tanases e invertases para o melhoramento no processamento de vinhos.

3.2. Específicos

- Avaliar a produção da enzima poligalacturonase por análise qualitativa e quantitativa, sendo realizada por medição de halo em placas contendo ácido poligalacturônico e por fermentação submersa, respectivamente.

- Avaliar a capacidade das leveduras testadas para produção da enzima tanase, sendo esta feita por fermentação sólida utilizando farelo de trigo.

- Quantificação de atividade enzimática pela enzima invertase nas leveduras testadas realizada por fermentação submersa e comparação com a enzima invertase produzida pelo micro-organismo comercializado.

- Caracterização da enzima invertase para avaliar o pH ótimo, T°C ótima, pH de estabilidade e T°C de estabilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens de leveduras utilizadas

Diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* e *não-Sacharomyces* (Tabela 1), isoladas a partir de uvas e mostos em fermentação, procedentes da vinícola artesanal "Vinhos Santin" (Sítio Santo Antônio, Jales, SP, de propriedade do Sr. Sebastião Santin), foram rastreadas para a produção de poligalacturonases, tanases e invertases. A identificação das espécies de leveduras foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP de São José do Rio Preto, em um trabalho anterior (BAFFI et al., 2010). Cada isolado puro foi mantido no freezer a -80º C, em meio YPD liquído (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), contendo glicerol 20%.

Tabela 1. Espécies de leveduras e suas respectivas linhagens utilizadas.

Espécies de leveduras utilizadas	Linhagens
Hanseniaspora uvarum	U6, U17, N1, N7, N36, 10A, 3A
Saccharomyces cerevisae	N24, N37, N38, 3
Candida quercitrusa	N17, N19
Issatchenkia orientalis	N40, 52, 18, 28
Pichia kluyveri	N31
Issatchenkia terrícola	22A, 5A
Issatchenkia occidentalis	39, 41, 43
Sporidiobolus pararoseus	8A
Candida stellata	N5, N9
Aureobasidium pullulans	1A, 4A, 12A
Cryptococcus laurenti	U2
Cryptococcus flavescens	U8, U10
Pichia quilliermondii	U5, U9

4.2. Rastreamento para produção de poligalacturonase

4.2.1. Análise qualitativa

Para a realização do pré-inóculo, uma colônia isolada de cada linhagem das leveduras utilizadas neste projeto foi cultivada em meio líquido YPD por 24 horas, a 30ºC sob agitação de 200 rpm (LOPES et al., 2002). Após 24 horas, fez-se a contagem de células em câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 40x e inoculou-se um volume de pré-inóculo equivalente a 10^7 células /mL. Neste caso, o inóculo foi adicionado em meio líquido à base de nitrogênio (YNB) a 30 ºC sob agitação por 6 horas, para esgotamento de açúcares. Alíquotas de 10 µL de cada isolado foram usadas para inocular placas de ágar contendo 1% de ácido poligalacturônico (PGA), 1% de glicose, 0,67% de YNB e 0,54% de fosfato de potássio, para o rastreamento de atividade enzimática por zimogramas. As placas de ágar inoculadas foram mantidas a 30ºC por 72 horas para observação das zonas de clareamento ao redor da colônia em crescimento. A atividade enzimática foi revelada após adição de ácido clorídrico 0,1M nas placas (FERNÁNDEZ GONZÁLEZ et al., 2005). Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.2.2. Análise quantitativa

Para a análise quantitativa, o pré-inóculo e a contagem de células foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1., e estas inoculadas em meio de cultivo para fermentação submersa.

A produção de poligacturonase foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Fernández-González et al. (2004). Cada isolado foi cultivado para crescimento em meio líquido YP, contendo 1% de ácido poligalacturônico (PGA) como substrato, e a quantidade de poligalacturonase produzida extracelularmente quantitativamente avaliada (Unidades de atividade enzimática /mL de fluido extracelular). Inóculos foram incubados a 30ºC, por 120 horas sob agitação de 200 rpm.

4.2.3 Avaliação do crescimento celular

O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas através da análise da viabilidade celular, pelo método de coloração diferencial das células com eritrosina B de acordo com Nobre et al. (2007). Para a avaliação da viabilidade celular, uma alíquota da fermentação era retirada a cada 24 horas, diluída 10x em solução salina e eritrosina B. Para cada amostra, fez-se a contagem das células viáveis (não coradas) e o número de células mortas ou inviáveis (coradas de vermelho).

4.2.4 Determinação da atividade de poligalacturonase

A cada 24 horas de fermentação, as culturas eram coletadas e o fluido extracelular recuperado por centrifugação. A atividade de poligalacturonase foi medida utilizando-se 0,1 mL do filtrado enzimático bruto e 0,9 mL de tampão acetato 0,2M contendo 1% de pectina ATM, BTM e MTM nos pHs 3,5; 4,0 e 4,5. Após 10 min de incubação a 37ºC, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico). A mistura foi deixada em ebulição por 10 min e depois resfriada em banho de gelo. Acrescentou-se 8 mL de água destilada e realizou-se a leitura a 540 nm para quantificar os açúcares redutores pelo método de DNS proposto por Miller (1959). Os testes foram realizados em duplicata e uma unidade de atividade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose a partir de pectina por minuto a 37°C.

4.3. Rastreamento para produção de tanase

Cada linhagem foi cultivada em meio YPD por 24 horas contendo 1% de ácido tânico, a 30ºC sob agitação de 200 rpm. Após 24 horas, fez-se a contagem de células em câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 40x e inoculou-se um volume de pré-inóculo equivalente a 10^7 células /mL no meio de cultivo para fermentação sólida.

O meio de cultivo para fermentação era composto por 10 g de farelo de trigo e 10 mL de solução de sais na composição: (g / L) KH_2PO_4, 1.0; NH_4NO_3, 2.0; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,2; $CaCl_2$. $2H_2O$, 0,02; $MnCl_2$. $4H_2O$, 0,004; Na_2MoO_4. $2H_2O$, 0,002; $FeSO_4$. $7H_2O$, 0,0025; e ácido tânico, 10g / L.

Os frascos foram incubados a 30ºC em estufa por 120 horas. A cada 24 horas de fermentação, foram adicionados 100 mL de solução NaCl 1,5% e agitados a 200 rpm por 2 horas. A solução foi filtrada e centrifugada a 12.500 rpm por 30 min a 4ºC e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi coletado (LEKHA; LONSANE, 1997).

4.3.1. Medida da atividade enzimática da tanase

A solução de substrato foi preparada pela adição de 0,5% de ácido tânico em tampão acetato de sódio pH 5,5 a 0,2M. A reação foi realizada adicionando-se 0,3 mL da solução de substrato com 0,5 mL de extrato enzimático bruto e incubada a 60ºC por 10 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA) preparada na concentração de 1mg/ mL e 0,17M de cloreto de sódio em tampão acetato pH 5,0, 0,2M, e em seguida centrifugada a 12.500 rpm por 15 min a 4ºC. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina acrescido de 1 mL de solução de $FeCl_3$. A absorbância foi medida após 15 min em 530 nm conforme metodologia descrita por Mondal et al. (2001). Os testes foram realizados em duplicata e uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose a partir de ácido tânico por minuto a 60°C.

4.4. Rastreamento para produção de invertase

O pré-inóculo e a contagem de células foram realizados conforme descrito no item 4.2.1.

Cada isolado foi cultivado para crescimento em meio líquido YP, contendo 2% de sacarose como substrato, e a quantidade de invertase

produzida intracelularmente quantitativamente avaliada. Inóculos foram incubados a 30ºC, por 120 horas sob agitação de 200 rpm.

A cada 24 horas de fermentação, era observado a viabilidade celular, o pH do meio e as amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 5°C. Após feito isso, o sobrenadante era descartado e o precipitado lavado com solução de NaCl a 0,8% por 15 min na centrífuga a 12.000 rpm a 5°C. Em seguida, as células era ressuspendidas em 5 mL de solução tampão acetato de sódio 0,2M e triturados com areia lavada. Centrifugava-se novamente por 10 min as amostras e o preparado enzimático estava pronto para uso após a filtração por membrana Millipore.

4.4.1. Medida da atividade enzimática da invertase

A mistura do ensaio consistiu de 0,2 mL de 0,5M de sacarose, 0,6 mL de tampão acetato de sódio (0,2M, pH 5,0) e 0,2 mL do preparado enzimático. A mistura era incubada a 37°C por 30 min. Depois disso, a reação era interrompida com 1 mL do reagente DNS, e então, aquecido em banho de ebulição por 10 min e depois resfriado em banho de gelo. Acrescentou-se 8 mL de água destilada e realizou-se a leitura a 546 nm para quantificar os açúcares redutores pelo método de DNS proposto por Miller (1959). Os testes foram realizados em duplicata e uma unidade de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose a partir de sacarose por minuto a 37°C e pH 5,0.

4.5 Caracterização da invertase

4.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima

O comportamento da enzima em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em tampões 0,2M citrato-fosfato variando o pH de 3,0 a 7,0, sendo dosada a atividade a 37°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 20 a 70°C no pH ótimo.

4.5.2. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH

A enzima foi mantida por 1 hora, em ausência do substrato, em temperaturas de 20 a 70°C. Após esse período, foi realizada a atividade enzimática descrita no item 4.4.1., nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se a enzima em tampões citrato-fosfato 0,2M (1:1) com pH variando de 3,0 a 7,0, em ausência do substrato, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foi realizada a atividade enzimática nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade da enzima.

4.5.3 Determinação da atividade da enzima em diferentes concentrações de etanol

A atividade da enzima invertase foi realizada conforme descrito no item 4.4.1, porém, no tampão foram adicionadas diferentes concentrações de etanol: 0%, 3%, 5%, 7%, 10%, 12% 15% e 20%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rastreamento para atividade de poligalacturonase

Na análise qualitativa, o rastreamento da atividade enzimática foi feito por zimogramas, onde seriam observadas as zonas de clareamento ao redor da colônia em crescimento.

Entretanto, em todas as espécies de leveduras testadas, não foi observada a formação de zonas de clareamento ao redor da colônia, o que mostrou que não houve consumo do ácido poligalacturônico por estas leveduras e, portanto, não houve a produção de poligalacturonase por nenhuma das espécies estudadas.

Na análise quantitativa, o rastreamento da atividade enzimática foi feito pela hidrólise do ácido galacturônico e quantificação da substância redutora pelo método de DNS.

Não foi detectada atividade em nenhum dos isolados.

Existem poucos estudos que relatam leveduras que produzam a poligalacturonase. Alguns estudos relatam apenas *Saccharomyces* capazes de produzir esta enzima (GAINVORS et al., 1994; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2005). Desta forma, muitas preparações de pectinases comerciais usadas na indústria de alimentos são derivadas de *Aspergillus niger*. Entretanto, este fungo secreta outras enzimas que produzem efeitos indesejáveis, como o aumento da turbidez do vinho (WHITAKER, 1984).

5.2. Rastreamento para atividade de tanase

Assim como a atividade enzimática para a poligalacturonase, as leveduras testadas não apresentaram atividade da enzima tanase.

5.3. Rastreamento para atividade de invertase

Dentre as 13 espécies de leveduras testadas, *Candida stellata*, foi a única a apresentar atividade enzimática para invertase em suas respectivas linhagens testadas, N5 e N9.

A produção enzimática da linhagem N5 foi quantificada em seu valor máximo a 7,76U/mL em 48 horas de fermentação (Figura 6).

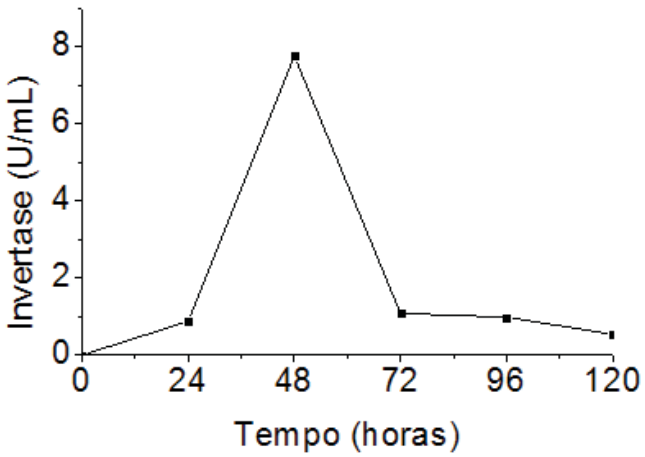


Figura 6. Perfil da produção de invertase por *C. stellata.*

Como a maior produtora de invertase encontrada na literatura é a levedura *S. cerevisae*, testou-se então a produção enzimática desta levedura, através do cultivo de suas células contidas em fermento Fleischmann (levedura de panificação), nas mesmas condições que a levedura *C. stellata*. A quantificação da enzima pode ser observada na Figura 7 e obteve seu valor máximo também em 48 horas, porém, produzindo apenas 2,53 U / mL, praticamente três vezes menos do que a produção enzimática pela levedura *C. stellata*.

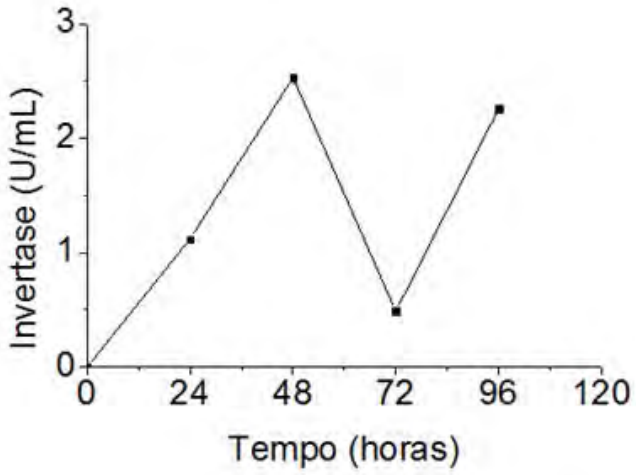
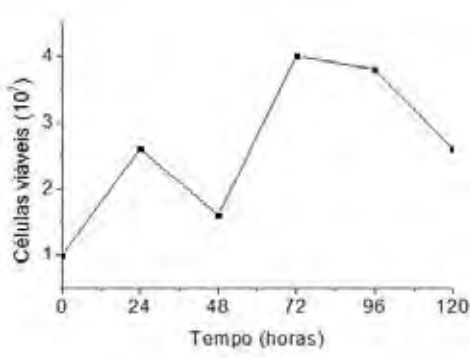
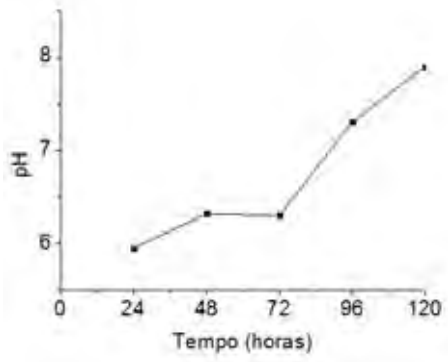


Figura 7. Perfil da produção de invertase por *S. cerevisae*.

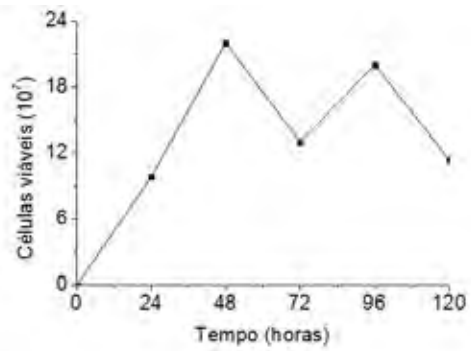
Para se comparar melhor as duas leveduras, foi realizado a contagem de células viáveis e medido o pH do meio durante as 120 horas de fermentação (Figura 8).



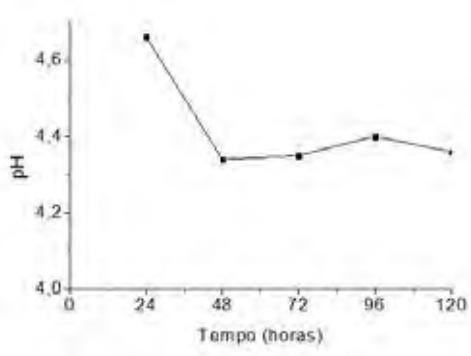
a



b



c



d

Figura 8. Células viáveis de *S.cerevisae* (a) e pH do meio (b); células viáveis de *C.stellata* (c) e pH do meio (d).

Pelos gráficos acima, pode-se observar que o número de células viáveis em *C. stellata* foi praticamente cinco vezes maior do que em *S. cerevisae.* Quanto ao pH, o pH de *C. stellata* prevaleceu ácido, o que é favorável ao processamento de vinificação. Já o pH de *S. cerevisae* se manteve acima de 6,0, o que pode favorecer o aparecimento de bactérias, contaminando, assim, o mosto.

A produção da enzima invertase realizada por Ashokkumar et al. (2001) no cultivo com *Aspergillus niger* utilizando bagaço de cana-de-açúcar em condições de fermentação em estado sólido a 30ºC, foi aumentada em quase 5 vezes quando desenvolvida em condições de fermentação sólida (81,8 U/L/h) quando comparada à submersa (18,3 U/L/h). Já Bhatti et al. (2006) relataram uma maior produção de invertase utilizando o melaço como fonte de carbono pelo *Fusarium solani*, obtendo uma atividade invertásica máxima de 9,90 U/mL.

Barbosa (2009) obteve atividade de invertase de caldo de cana de 11,31 U/ mL. Já Breda et al. (2002) obteve produção máxima de invertase extracelular pelo fungo *Sphaceloma ampelinum* com 127,57 U totais.

Como observado pelas informações acima, a enzima é obtida em maiores unidades em fermentação em estado sólido em comparação à fermentação submersa, porém, a produção enzimática do presente trabalho está próxima dos valores encontrados para fermentação submersa.

5.4. Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de invertase

Com relação à influência do pH na atividade da invertase em diferentes tampões, nota-se que a maior atividade ocorreu na faixa de pH 3,0 (Figura 9 a). No caso da temperatura (Figura 9 b), observa-se que a enzima apresentou perfil típico de enzima mesofílica, com atividade máxima a 55°C, produzindo 10,6 U/ mL. Em valores mais elevados de temperatura, acima de 60°C a atividade enzimática foi reduzida pela metade e decaindo conforme o aumento da temperatura, como descrito em outras literaturas.

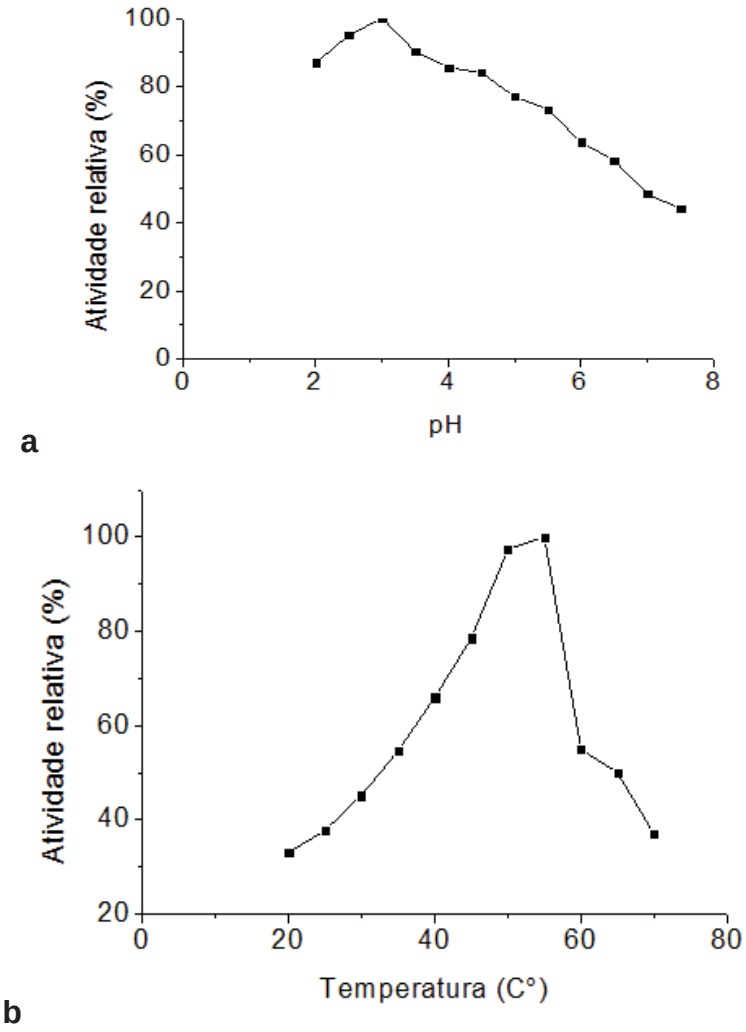


Figura 9. Caracterização físico-química da invertase produzida por *C. stellata*. Efeito do pH (a) e efeito da temperatura (b) na atividade da enzima.

Andjelkovic et al. (2010) em suas investigações com purificação e caracterização da invertase extracelular produzida por *S. cerevisiae* determinaram que essas apresentam um valor de pH ótimo na faixa de 3,5-5,0. Bora et al. (2005) obtiveram o pH ótimo para invertase livre igual a 5,0.

Invertases de outros organismos apresentam valores bastante próximos de condição ótima de pH de reação: Alegre et al. (2009), pesquisando as formas intra e extracelular da invertase do fungo *Aspergillus caespitosus* em diferentes condições de crescimento, obtiveram, para todas as formas de invertase, valores ótimos de pH na faixa de 4,0-6,0; Stano et al. (2008), em seus trabalhos com invertase de *Melissa officinalis* obtiveram o valor de 4,5 como pH ótimo.

5.5. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade de invertase, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência do substrato. A enzima manteve a atividade entre os pHs 3,0 a 7,0, verificando-se pico de 100% de atividade nos pHs 5,5 e 6,0 (Figura 10 a).

Com relação à estabilidade térmica, em ausência de substrato, nota-se que a invertase manteve a atividade após ser mantida por 1 hora entre 20 a 55°C, decrescendo para cerca de 30% na temperatura de 60°C, ocorrendo perda total de atividade a 70°C (Figura 10 b). Foi verificado que a enzima perde aproximadamente 35% da sua atividade quando incubada a 55°C por uma hora.

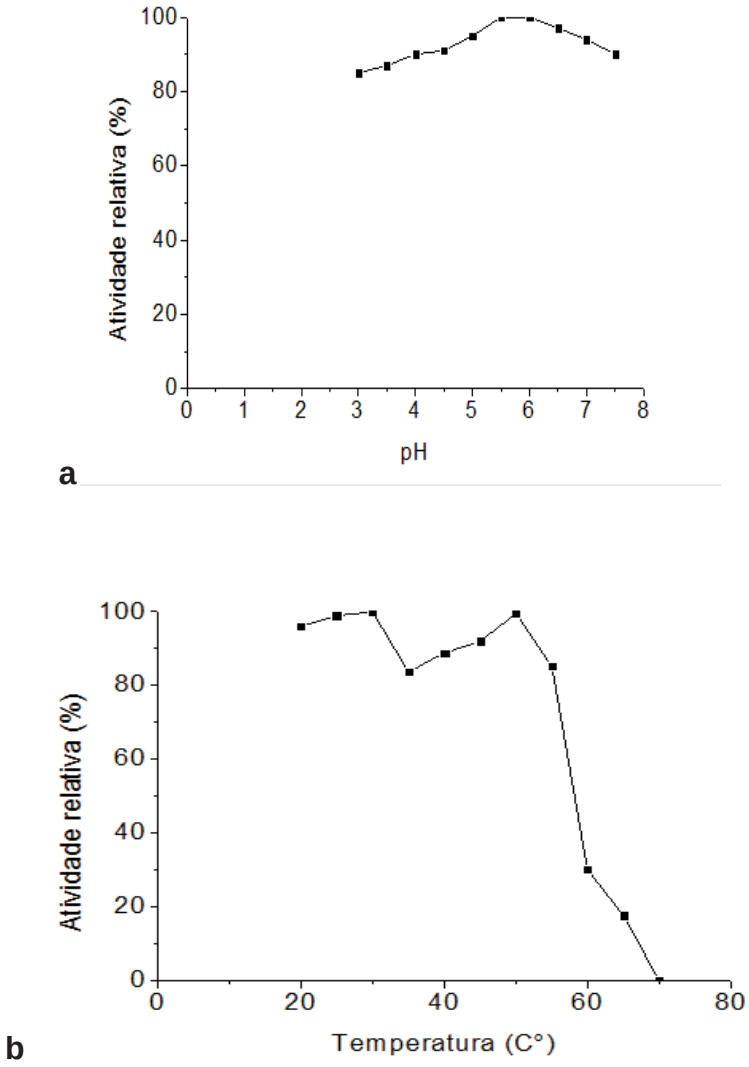


Figura 10. (a) Efeito do pH na ausência de substrato sobre a estabilidade da invertase de *C. stellata* pré-incubada por 24 horas; (b) Efeito da temperatura na ausência de substrato sobre a estabilidade da invertase pré-incubada por 1 hora.

Sabe-se que, durante a fermentação espontânea do vinho, há uma substituição sequencial de leveduras autóctonas. Inicialmente, predominam espécies não-*Saccharomyces* pertencentes aos gêneros: *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Issatchenkia*, encontrados em altos níveis no mosto fresco (SABATE et al., 2002; RASPOR et al., 2006; LI et al., 2010). Estas leveduras estão associadas com a filosfera de uvas e também com todo o ambiente vinícola. Porém, apresentam baixa capacidade fermentativa e baixa tolerância ao etanol e acabam sendo substituídas por

leveduras do gênero *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica, em especial *S. cerevisiae*, que se torna então a espécie dominante do meio até o final da fermentação (NIKOLAOU et al., 2006; LI et al., 2010). Leveduras não-*Saccharomyces* aeróbias, oxidativas, dos gêneros *Candida, Cryptococcus* e *Pichia*, representadas neste trabalho pelas espécies *Candida stellata*, *Candida quercitrusa*, *Issatchenkia occidentalis* (anamórfico *Candida sorbosa*), *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia kluyveri* e *Pichia guilliermondii* são comuns na superfície de uvas, equipamentos e no ambiente vinícola e, quando ocorre o esmagamento das uvas, são carreadas para o mosto, sendo encontradas nas etapas iniciais de fermentação (FRANCESA et al., 2010).

Diante destas informações, foi verificado o efeito da concentração de etanol na atividade da enzima invertase em *C. stellata* (Figura 11). Constatou-se que conforme a porcentagem de etanol foi aumentada, ocorria a diminuição da atividade enzimática, chegando a zero na concentração de 20% de etanol. Além de intolerância ao etanol, encontra-se em literatura descrições onde a *C. stellata* produz glicerol, 2-metil-1-propanol e SO_2, substâncias prejudiciais à qualidade do vinho.

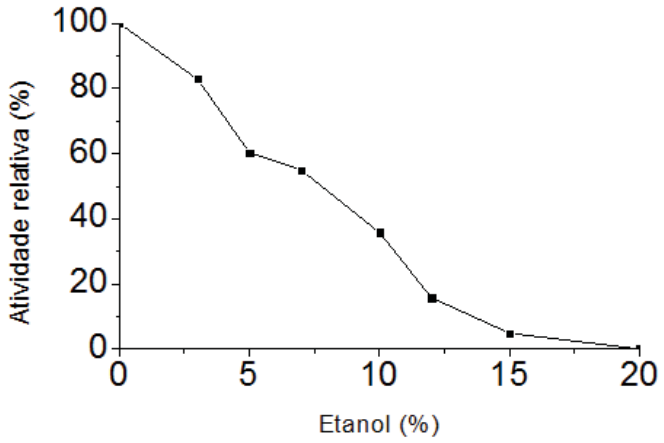


Figura 11. Efeito da concentração de etanol na atividade da enzima invertase produzida por *C. stellata*.

Apesar da baixa capacidade fermentativa e baixa tolerância ao etanol, estudos anteriores relatam a influência benéfica de espécies não-*Saccharomyces* na elaboração de vinhos através da produção de enzimas

hidrolíticas, como por exemplo, o aumento do aroma do vinho através da produção de β-glicosidases (ARÉVALO-VILLENA et al., 2005; ARÉVALO-VILLENA et al., 2007).

6. CONCLUSÃO

- Dentre as 13 leveduras testadas, nenhuma das espécies foram eficientes para produção da enzima poligalacturonase e tanase.

- A espécie *C. stellata* foi eficiente na produção da enzima invertase produzindo até 10,6U/ mL com o pH e temperatura ótimos, respectivamente a 3,0 e 55°C.

- A enzima mostrou-se estável entre os pHs 3,0 a 7,0, verificando-se pico de 100% de atividade nos pHs 5,5 e 6,0. Em relação a temperatura, a enzima mostrou-se estável entre 20 a 55°C, decrescendo para cerca de 30% na temperatura de 60°C, e ocorrendo perda total de atividade a 70°C.

- A levedura *C. stellata* se mostrou melhor produtora da enzima invertase (10,6U/ mL) que a levedura *S. cerevisiae* (2,53U/ mL), apresentando assim potencial para utilização na produção industrial desta enzima.

- A invertase da *C. stellata* é intolerante a altas concentrações de etanol.

Sugestão para continuidade dos estudos:

- Purificar e comparar as enzimas de *S. cerevisae* e *C. stellata* bioquímica e físico-quimicamente.

- Imobilizar a enzima.

- Aplicação na obtenção de açúcar invertido.

- Aplicação no processamento de vinificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, N. et al. Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 32, pt. 3, p. 179-187, 2000.

AGUILAR, C. et al. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, n. 3, p. 355-361, 1999.

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**, London, v. 7, p. 373-382, 2001.

ALEGRE, A. C. P. et al. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 612-622, 2009.

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, p. 21-28, 1998.

ANDJELKOVIC, U., et al. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 3, p. 799-804, 2010.

ARÉVALO-VILLENA, M. et al. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β-glucosidase activity in wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 558-564, 2005.

_____; UBEDA IRANZO, J. F.; BRIONES Perez, A. I. β -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 420-425, 2007.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, n. 37, p. 331-338, 2001.

BAGAL, D. S. et al. Fabrication of sucrose biosensor based on single mode planar optical waveguide using co-immobilized plant invertase and GOD. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 22, n. 12, p. 3072-3079, 2007.

BAFFI, M. A. et al. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 61, n. 1, p. 75-78, 2010.

BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hidrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Journal of**

Industrial Microbiology & Biotechnology, Hampshire, n. 25, p. 29-38, 2000.

_____; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 41, n. 6, p. 313-318, 2001.

BARBOSA, E. F. **Avaliação da atividade da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana**. 2009. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Uma revisão sobre ocorrência de sacarose no reino vegetal. **Farmácia & Química**, São Paulo, v. 33, n. 23, p.6-22, 2000.

BARRAJÓN, N. et al. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. **Food Control**, Guilford, v. 20, n. 8, p. 778-783, 2009.

BERTO, D. Usineiros apostam no crescimento da demanda do açúcar líquido. **Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 91, p. 26-31, 2001.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHATTI, H. N. et al. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 54, p. 4617-4623, 2006.

BLANCO, P. et al. Grape juice biodegradation by polygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 40, n. 2-4, p. 115-118, 1997.

BLANDINO, A. et al. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001.

BON, E. P.; PEREIRA, N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999.

BREDA, A. E. et al. Estudo da produção da invertase extracelular pelo fungo *Sphaceloma ampelinum.* In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochemical Journal**, London, v. 19, p. 338-339,1925.

BROWN, A. J. Enzyme action. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 81, p. 373-386, 1902.

CARLSON, M.; BOSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5% ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 145-154, 1982.

_____. et al. The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 3, n. 3, p. 439-476, 1983.

CATALUÑA, E. **Uvas e vinhos**. Rio de Janeiro: Globo, 1984.

CHU, F. K.; WATOREK, W.; MALEY, F. Factors affecting the oligomeric structure of yeast external invertase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 223, p. 543-555, 1983.

DA SILVA, E. G. et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.

DE GREGORIO, A. et al. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 2, p.89-94, 2002.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non-Saccharomyces yeast with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 29-36, 2000.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiaewine* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 237, n. 2, p. 261-266, 2004.

_____. et al. Engineering of an oenological *Saccharomyces cerevisiae* strain with pectinolytic activity and its effect on wine. **Food Microbiology**, London, v. 102, p. 173-183, 2005.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 11-22, 2003.

FRANCESA, N. et al. Indigenous yeast communities in the environment of ‘‘Rovello bianco’’ grape variety and their use in commercial white wine fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 337-351, 2010.

GAINVORS, A. et al. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, Davis, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, 1994.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. 2. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

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

HELBIG, E. **Ação da maceração prévia ao cozimento do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L) nos teores de fitatos e taninos e consequência sobre o valor protéico**. 2000. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

HEMMING, F. W. Expression and secretion of glycoproteins by hyphal fungi. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 23, p. 180-185, 1995.

HOURDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides. III. Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 16, p. 409-432, 1991.

IBRAVIN - INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Instituto Brasileiro do Vinho**. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/>. Acesso em: 10 maio 2011.

JOSHI, V. K.; PANDEY, A. Biotechnology: food fermentation. New Delhi: Educational Publishers & Ditributors, v. 2. p. 647-744, 1999.

KARAM, N. E.; BELARBI, A. Detections of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, **v.** 11, p. 559-563, 1995.

KASHYAP, D. R. et al. Production and characterization of pectinase from a *Bacillus sp* DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, **v.** 16, p. 277-282, 2000.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

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

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 2, p. 62-68, 2008.

LAGEMAAT, J. V.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chemical Engineering Jounal**, Lausanne, v. 84, n. 2, p. 115-123, 2001.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 366-375, 2000.

LEE, W. C.; HUANG, C. T. Modelling of ethanol production using Zymomonas mobilis ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 4, p. 217-227, 2000.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

_____; _____. Production and application of tannic acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, n. 44, p. 215-260, 1997.

LI, S. S. et al. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 138, p. 85-90, 2010.

LIMBERG, G. et al. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopection lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 327, p. 293-307, 2000.

LOPES, C. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 608-615, 2002.

LOUW, C. et al. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 125, p. 447-461, 2006.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MAYANS, O. et al. Two crystal structures of pectin lyase A from Aspergillus reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyase. **Structure**, London, v. 5, p. 677-689, 1997.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial**. Panorama 2006. Bento Gonçalves: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007.

MICHAELIS, L.; DAVIDSONH, H. The theory of isoelectric effect. **Biochemische Zeitschrift**, Berlin, v. 30, p. 143-150, 1911.

_____; MENTEN, M. L. Kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, Berlin, v. 49, p. 333-369, 1913.

_____; ROTHSTEIN, M. Theory of invertase action. **Biochemische Zeitschrift**, Berlin, v. 110, p. 217-233, 1920.

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

MONDAL, K. C. et al. Colorimetric assay method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 295, p. 168-171, 2001.

MUTLU, M. et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 41, n. 3-4, p. 147-150, 1999.

NIKOLAOU, E. et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 205-211, 2006.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp & coffee husk for bioprocess. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, n**.** 6, p. 153-162, 2000.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi -trying to understand a highly productive black-box. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, p. 50-57, 1994.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit Ripening Phenomena - an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, p. 1-19, 2007.

RASPOR, P. et al. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, p. 97-102, 2006.

RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por Penicillium italicum IZ 1584 e Aspergillus niger NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**. 1999. 89 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

RODRIGUES, M. V. N. et al. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 103-109, 2000.

SABATE, J. et al. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. **Microbiological Research**, Jena, v. 157, p. 267-274, 2002.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase and protopectinase: prodution, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 213-294, 1993.

SHEN, Z. et al. Pectin methylesterase from the rice weevil, Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera: curculionidae): purification and characterization. **Insect Biochemitry Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 209-214, 1999.

SILVA, D. et al. Production of pectinase by solid-state fermentation with Penicillium viridicatum RFC3. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SOUZA, J. V. B. et al. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 4, p. 455-458, 2003.

TAKAYANAGI, T.; UCHIBORI, T.; YOKUTSUKA, K. Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. **American Journal of Enology & Viticulture**, Davis, v. 52, n. 1, p. 41-44, 2001.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, Essex, n. 80, p. 662-667, 2007.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinoliticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 124 f. 2003. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

UVIBRA - UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. **União Brasileira de Vitivinicultura**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/>. Acesso em: 30 jul. 2011.

VAN RENSBURG, P.; PRETORIUS, I. S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Paarl, v. 21, p. 52-73, 2000.

VILARIÑO, C. et al. Spectrophotometric method for fungal pectin-esterase activity determination. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 26, p. 107-110, 1993.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 6, p. 341-349, 1984.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state production of polygalacturonase by Lentinus edodes using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 825-830, 2000.

ZOTT, K. et al. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, v. 125, p. 197-203, 2008.