

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
( MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE TERMOESTÁVEL PELO FUNGO  
*Rhizomucor pusillus* A 13.36 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO,  
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

PAULA MENDES DE FREITAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE TERMOESTÁVEL PELO FUNGO  
*Rhizomucor pusillus* A 13.36 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO,  
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA**

**PAULA MENDES DE FREITAS**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eleni Gomes

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro  
Estado de São Paulo  
Novembro de 2009**

*Dedico:*

*Aos meus pais, Heloisa (in memoriam) e Paulo,  
por toda uma vida de dedicação.*

*À minha irmã, Helaine, pela valiosa amizade de  
uma vida inteira.*

*Ao meu marido, Luiz Henrique, pelo incansável  
companheirismo e incentivo em todos os momentos.*

*À minha filha, Flaviana, por ser minha eterna  
fonte de amor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre!

A minha orientadora, Profa. Dra. Eleni Gomes, por ter aceitado me orientar.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva que nunca recusou esclarecer qualquer dúvida ou problemas que surgissem no laboratório.

A Rodrigo Simões Pereira Leite pela colaboração através de sugestões e dicas sempre me orientando, nos últimos meses deste trabalho.

A Natalia Martin que sempre dividiu sua experiência no laboratório comigo, me amparando com sua amizade em todos os momentos necessários.

A Hamilton Cabral pelos inúmeros esclarecimentos, conselhos e pela amizade recente conseqüente dessa convivência.

Ao grande amigo, Alexandre Monteiro, pelo companheirismo no laboratório e auxílio no computador, durante a primeira parte deste trabalho e principalmente pela nossa amizade sincera que perdura até hoje.

Aos demais amigos de laboratório que, ao longo destes anos, me ajudaram de maneira indireta através da amizade, do bem-querer e da ajuda mútua como a Aline Zorzeto, Marcia Moretti, Ellen Lago, Fabiana Pavezzi, Gisele Cucolo, Carol Merheb, Andréia Jacomassi, Livia Fagali, Lílian, Rodolfo, Heloíza Ferreira e Dênis Silva.

A Alessandro pelo seu eficiente trabalho com o computador todas as vezes que precisei.

Ao Claudinei por seu trabalho técnico no laboratório de Microbiologia Aplicada.

A coordenadora Sandra Mara Martins Franchetti que tantas vezes me atendeu solícitamente resolvendo inúmeros problemas.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Rio Claro, pela eficiência e boa vontade com que trabalham.

Ao CNPq pela concessão de bolsa.

ACAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

*“Sonhe com aquilo que você quiser.  
Seja o que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que  
aparecem em seus caminhos.  
A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem a importância das  
pessoas que passam por suas vidas.”*

*Clarice Lispector*

## RESUMO

O fungo *Rhizomucor pusillus* A 13.36, quando cultivado por fermentação em estado sólido utilizando farelo de algodão como fonte de carbono por 72 horas, produziu altos níveis de poligalacturonase (18,6U/g). Essa enzima apresentou atividade máxima em pH 5,5 e em 55°C. A poligalacturonase bruta apresentou estabilidade na faixa de pH entre 4,5 e 6,5, com uma atividade residual de 91,3% no pH 6,5, e também até 70°C por 1h, com atividade residual de 80% nas temperaturas de 55 a 60°C. Esta enzima foi purificada por concentração e uma combinação de procedimentos de gel filtração e cromatografia de troca-iônica. A massa molecular da enzima foi 53,7kDa. A focalização isoeétrica mostrou uma única banda cujo ponto isoeletrico (pI) foi 3,8. A atividade máxima da enzima purificada também ocorreu em pH 5,5 e a 55°C. A enzima purificada foi estável na faixa de pH 4,5 a 6,5, com atividade residual na faixa de 80 a 100%, e também até 70°C por 1h, com atividade residual de 100% nas temperaturas de 55 a 60°C. A enzima purificada foi totalmente inibida por Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> e 80% inibida por Fe<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup>. Mg<sup>2+</sup> estimulou a atividade da poligalacturonase em 100%. Entre os substratos avaliados, a pectina de citrus (D.E. 92%) foi o que mais estimulou a ação da enzima. A afinidade por pectinas de alta esterificação e a ausência de atividade quando o ácido poligalacturônico foi usado como substrato, indica que a enzima purificada é uma polimetilgalacturonase. Os resultados obtidos pela cromatografia de papel demonstraram que a polimetilgalacturonase purificada possui o modo de clivagem endo/exo misto. O K<sub>m</sub> com pectina de citrus foi 10,78mg mL<sup>-1</sup> e a V<sub>max</sub> foi 2379,04μmolmin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>. As possíveis aplicações desta enzima incluem composição de detergentes, processamento têxtil e de fibras de celulose, degradação ou modificação de material vegetal, aditivo para alimentação animal e no processamento de vinhos e sucos.

**Palavras-chave:** *Rhizomucor pusillus*, fungo termotolerante, pectinase, poligalacturonase, polimetilgalacturonase, purificação, termoestabilidade.

## ABSTRACT

*Rhizomucor pusillus* A 13.36 produced high levels of polygalacturonase (18.6U/g) in solid state fermentation in medium composed by cotton bran for 72 hours. This enzyme showed maximal activity at pH 5.5 and 55°C. Crude polygalacturonase was stable from pH 4.5 to 6.5, with remaining activity of 91,3% at pH 6.5, and stable until 70°C for 1h, with remaining activity of 80% at 55-60°C. This enzyme was purified by concentration and a combination of gel filtration and ion exchange chromatographic procedures. The molecular mass of the enzyme was 53.7kDa. Isoelectric focusing showed a single band with an isoelectric point (*pI*) of 3.8. The purified enzyme also showed maximum activity at pH 5.5 and 55°C. The purified enzyme was stable from pH 4.5 to 6.5, with remaining activity range of 80 to 100%, and stable until 70°C for 1h, with remaining activity of 100% at 55-60°C. The purified enzyme was totally inhibited by Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and 80% inhibited by Fe<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup>. Mg<sup>2+</sup> increased polygalacturonase activity in 100%. Citrus pectin (D.E. 92%) was found to be the preferred substrate among the different substrates tested in the enzyme assay. The affinity for high pectin esterification and the lack of activity when polygalacturonic acid was used as substrate, indicates that the enzyme is a polymethylgalacturonase. The results obtained by paper chromatography showed that the purified polymethylgalacturonase has the mixed endo/exo mode of cleavage. The  $K_m$  with citrus pectin was 10.78mg mL<sup>-1</sup> and the  $V_{max}$  was 2379.04μmolmin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>. The possible applications of this enzyme include the composition of detergents, textile and cellulosic fiber processing, degradation or modification of plant material, animal feed additive and wine and juice processing.

**Keywords:** *Rhizomucor pusillus*, thermotolerant fungus, pectinase, polygalacturonase, polymethylgalacturonase, purification, thermostability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorrem durante a FES.....	19
<b>Figura 02:</b> A) Molécula de homogalacturonana. B) Molécula de ramnogalacturonana. C) Neutralização das cargas negativas de moléculas de homogalacturonana por íons $Ca^{2+}$ .....	25
<b>Figura 03:</b> A estrutura básica da pectina. Representações esquemáticas das estruturas da pectina convencional (A) e da alternativa proposta recentemente (B).....	26
<b>Figura 04:</b> Produção de PGs por <i>R. pusillus</i> A 13.36 utilizando fermentação em estado sólido com farelo de algodão, farelo de trigo e misturas de farelo de trigo e sabugo de milho.....	57
<b>Figura 05:</b> Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Sephadex G-150 previamente equilibrada com 30mM de tampão MES em pH 6,5.....	59
<b>Figura 06:</b> Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Q-Sepharose previamente equilibrada com 30mM de tampão MES em pH 6,5 com gradiente de NaCl (0-1M).....	60
<b>Figura 07:</b> Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Sephacryl S-100 previamente equilibrada com 20mM de tampão MES em pH 6,5 com 150mM de NaCl.....	61

<b>Figura 08:</b> SDS-PAGE da PG produzida pelo fungo <i>R. pusillus</i> A 13.36 sob FES.....	<b>64</b>
<b>Figura 09:</b> Efeito do pH sobre a atividade da PG produzida pelo fungo <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>66</b>
<b>Figura 10:</b> Efeito da temperatura sobre a atividade da PG produzida pelo fungo <i>R. pusillus</i> A. 13.36.....	<b>67</b>
<b>Figura 11:</b> Efeito do pH sobre a estabilidade da PG produzida pelo fungo <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>69</b>
<b>Figura 12:</b> Efeito da temperatura sobre a estabilidade da PG produzida pelo fungo <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>70</b>
<b>Figura 13:</b> Especificidade ao substrato da enzima polimetilgalacturonase produzida por <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>74</b>
<b>Figura 14:</b> Cromatografia de papel dos produtos de hidrólise da polimetilgalacturonase purificada utilizando pectina de citrus (92% D.E.).....	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Quantidade das principais culturas e tipo dos resíduos produzidos no Brasil.....	<b>21</b>
<b>Tabela 02:</b> Componente da parede celular de algumas culturas do Brasil.....	<b>22</b>
<b>Tabela 03:</b> Vantagens e desvantagens da FES.....	<b>23</b>
<b>Tabela 04:</b> Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e vinhos.....	<b>35</b>
<b>Tabela 05:</b> Propriedades bioquímicas e físico-químicas de algumas pectinases.....	<b>46</b>
<b>Tabela 06:</b> Produção de pectinase por <i>R. pusillus</i> A 13.36 em FES.....	<b>56</b>
<b>Tabela 07:</b> Síntese dos dados do processo de purificação da PG produzida por <i>R. pusillus</i> A 13.36 sob FES.....	<b>63</b>
<b>Tabela 08:</b> Efeito de potenciais inibidores e estimuladores sobre a atividade da PG produzida por <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>72</b>
<b>Tabela 09:</b> Propriedades da polimetilgalacturonase purificada produzida por <i>R. pusillus</i> A 13.36.....	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Da: daltons

D.E.: Grau de esterificação (do inglês: degree of esterification)

DTT: 1,4-ditiotreitol

Endo-PG: endopoligalacturonase

Exo-PG: exopoligalacturonase

FES: Fermentação em estado sólido

GRAS: generally regarded as safe

HEPES: ácido etanossulfônico de 4-2 hidroxietil-piperazina-1

HG: homogalacturonana

IEF: Focalização isoelétrica

$K_m$ : constante de Michaelis

MES: ácido 4-morfolinoetanossulfônico

PG: poligalacturonase

pI: ponto isoelétrico

PL: pectina liase

RGI: ramnogalacturonana I

RG II: ramnogalacturonana II

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TAPS: ácido N-[tris-(hidroximetil)-metil]-3-aminopropanossulfônico

$t_{1/2}$ : tempo de meia vida

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

U: unidade de PG

$V_{max}$ : velocidade máxima

## SUMÁRIO

	Página
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1.Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos agro-industriais.....	17
2.2.Pectina e classificação de pectinases.....	24
2.2.1.Protopectinases.....	27
2.2.2.Esterases.....	27
2.2.3.Pectina acetil esterases.....	28
2.2.4.Polimetilgalacturonases.....	28
2.2.5.Poligalacturonases.....	28
2.2.6.Liases.....	29
2.2.7.Pectato-liase.....	29
2.2.8.Pectina-liase.....	29
2.2.9.RG ramnohidrolase.....	30
2.2.10.RG galacturonohidrolase.....	30
2.2.11.RG hidrolase.....	30
2.2.12.RG liase.....	30
2.2.13.RG acetilesterases.....	30
2.2.14 RG xilogalacturonase.....	31
2.3.Pectinases produzidas por microrganismos e sua importância industrial.....	31
2.4.Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis.....	37
2.5.Purificação de pectinases.....	43
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1.Objetivo geral.....	48
3.2.Objetivos específicos.....	48

<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1.Microrganismo.....	49
4.2.Obtenção da enzima por FES.....	49
4.3.Medida da atividade enzimática (PG).....	50
4.4.Determinação de proteínas totais.....	50
4.5.Purificação da enzima.....	50
4.5.1.Concentração da enzima e cromatografia de filtração em gel – Sephadex G-150.....	50
4.5.2.Ultrafiltração e cromatografia de troca aniônica – Q-Sepharose.....	51
4.5.3.Concentração e cromatografia de filtração em gel – Sephacryl S-100.....	51
4.6.SDS-PAGE.....	51
4.7.Focalização isoeletrica.....	52
4.8.Caracterização da PG purificada.....	52
4.8.1. Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima.....	52
4.8.2.Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura.....	53
4.8.3.Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de pH.....	53
4.8.4.Determinação do efeito de íons metal e reagentes sobre a atividade da PG.....	53
4.8.5.Determinação da especificidade ao substrato.....	53
4.8.6. Identificação dos produtos de hidrólise.....	54
4.8.7.Determinação do $K_m$ e $V_{max}$ .....	54
<b>5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros. Entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos. Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos, cuja disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição. Com o advento da inovação biotecnológica na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado, como enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (UENOJO e PASTORE, 2007). A utilização de enzimas aumentou acentuadamente nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de papel e têxtil (GRAMINHA et al, 2008).

Com relação às técnicas de fermentação, a FES (Fermentação em Estado Sólido) geralmente é preferida por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação (UENOJO e PASTORE, 2007). A FES têm sido usada para a produção de enzimas por fungos. Até o presente momento a maior parte deste trabalho têm sido feita em escala laboratorial, onde é mais fácil controlar a temperatura ótima de crescimento. Entretanto, nos bioreatores de FES em larga escala, o substrato frequentemente atinge temperaturas acima da ótima para o processo, devido a dificuldades de remover calor dos substratos sólidos de baixo conteúdo de água (SANTOS et al, 2004)

Uma das vantagens da FES é a possibilidade de utilização dos resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais como meio para o crescimento microbiano. Tais resíduos têm dado bons resultados na produção de enzimas incluindo pectinases, celulases, xilanases, amilases, ligninases, inulinases, quitinases e fitases (GRAMINHA et al, 2008).

As pectinases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que catalizam a degradação das pectinas, as quais são polissacarídeos estruturais presentes nas células vegetais e responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos

vegetais (COUTO e SANROMÁN, 2006). A classificação destas enzimas é baseada no modo de ataque à cadeia de ácido poligalacturônico dos polímeros pécticos, sendo descritos três tipos de enzimas: as esterases, as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. A classificação ainda pode ser baseada na afinidade pelo substrato (pectina ou pectato) e na região em que atuam na molécula, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo), a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) ou pelo modo de clivagem endo/exo misto (FOGARTY e WARD, 1972; PILNIK e ROMBOUTS, 1981; SAKAI et al, 1993; ALKORTA et al, 1998; KYRIAKIDIS, 1999; COOK et al, 1999; KASHYAP et al., 2001).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm um risco significativamente reduzido de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Além disso, as enzimas termoestáveis apresentam maior resistência à ação de proteases e à desnaturação por alguns solventes orgânicos. Ainda, as enzimas extracelulares constituem importante modelo para entendimento dos mecanismos de termoestabilidade e de atividade em altas temperaturas, os quais são usados nos processos de engenharia de proteínas (GOMES et al, 2007).

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que microrganismos termofílicos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento, ou seja, acima de 45°C. Estudos com enzimas de termofílicos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termofílicas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termoestabilidade (GOMES et al, 2007).

Durante o estudo de uma enzima, a fim de aumentar sua estabilidade, atividade e especificidade, torna-se necessário sua purificação. A otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, mesmo quando se conhecem as características físico-químicas da proteína a ser

purificada e muitas vezes é imprevisível seu comportamento no decorrer do processo de purificação. O grande desafio deste processo é o trabalho para se encontrar as melhores estratégias e, se for o caso, adequar a metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para a sua aplicação (MALLER, 2008).

A purificação e o avanço do conhecimento sobre as propriedades bioquímicas das pectinases são essenciais para pesquisas relacionadas ao seu modo de ação e para uma aplicação industrial mais eficiente (MALLER, 2008).

Os estudos com produção, purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas microbianas são extensivamente relatados. A produção de pectinases ocupa cerca de 10% da produção total de preparações de enzimas. Estas enzimas têm grande importância nas indústrias onde possuem várias aplicações incluindo o amadurecimento de frutas, a clarificação e redução da viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e café, degomagem de fibras na indústria têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos. Entretanto, há poucos estudos sobre produção de poligalacturonases por fungos do gênero *Rhizomucor*. Apesar de *R. pusillus* ter sido isolado pela primeira vez há mais de um século, sendo o primeiro fungo termofílico a ser descrito, não há nenhum relato na literatura de purificação de poligalacturonase desta espécie. Resultados anteriores demonstraram que *R. pusillus* A 13.36 é um excelente produtor de poligalacturonases por fermentação em estado sólido. Com base nestes fatos e levando-se em conta a importância dos trabalhos de purificação e caracterização de enzimas de microrganismos termofílicos ou termotolerantes, como fungos e bactérias, esse trabalho foi desenvolvido com a intenção de produzir e purificar uma possível poligalacturonase do fungo *Rhizomucor pusillus* A 13.36 visando-se avaliar as propriedades bioquímicas da enzima.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos agro-industriais

O aumento da demanda por energia tem focalizado a atenção do mundo na utilização de recursos renováveis, particularmente resíduos agrícolas e agroindustriais. A matéria orgânica contida em materiais, como farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, cascas e sementes de frutas, bagaços de laranja e de cana-de-açúcar e resíduos da indústria de papel, tem como componentes a celulose, amido, lignina, xilana e pectina. Diversos microrganismos são capazes de usar estas substâncias como fonte de energia e de carbono e produzir enzimas e outros produtos de alto valor (ANTRANIKIAN, 1992; DA SILVA, 1997).

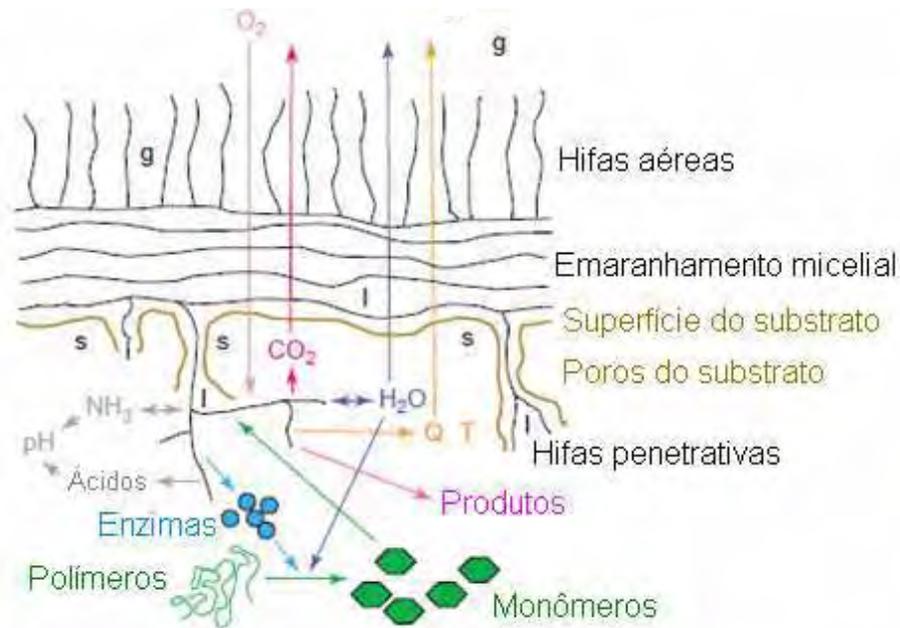
Entre os processos usados para a produção de enzimas microbianas, a fermentação em estado sólido (FES), a qual pode ser definida como o crescimento de microrganismos (principalmente fungos) em materiais sólidos úmidos em ausência de água livre abundante entre as partículas, tem sido efetiva para produção de pectinase por fungos, uma vez que o baixo teor de água disponível é similar ao habitat natural desses microrganismos, o que os torna o grupo mais adaptado a esse processo (BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997; MAMMA et al, 2008). O processo de fermentação em estado sólido é um atrativo porque apresenta alta produtividade por volume de reator, baixo capital e custos operacionais, menor requerimento de espaço, equipamento simplificado e processamento “downstream”\* mais fácil em comparação com aquele da fermentação submersa. Há também evidência que algumas enzimas são menos afetadas pela repressão catabólica, do que as obtidas por fermentação submersa. O uso de FES para produção de pectinase foi proposto usando diferentes resíduos agrícolas e agroindustriais como substratos sólidos como farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de maçã, bagaço de morango, polpa de beterraba, polpa e casca de café, cacau, casca de limão e laranja e bagaço de cana de açúcar (MAMMA et al, 2008).

\* O grupo de técnicas, tais como a centrifugação, filtração e cromatografia, usadas para recuperar e purificar os produtos de uma conversão enzimática ou de um processo de produção microbiana  
[http://files.efbpublic.org/downloads/whatswhat\\_in\\_biotech\\_Portuguese.pdf](http://files.efbpublic.org/downloads/whatswhat_in_biotech_Portuguese.pdf).

Os fungos são considerados os microrganismos mais adaptados para FES pois suas hifas podem crescer nas superfícies das partículas e penetrar nos espaços interpartículas colonizando os substratos sólidos (SANTOS et al, 2004; GRAMINHA et al, 2008). A Figura 1 mostra um esquema de alguns dos processos que ocorrem durante a FES. Após a esporulação, a hifa do fungo se desenvolve em um emaranhado micelial, este por sua vez, pode projetar-se formando hifas aéreas ou penetrar o substrato. Os espaços vazios entre as hifas aéreas são frequentemente preenchidos por gás (g), enquanto que os espaços vazios entre o emaranhado micelial e entre os substratos são preenchidos por líquido (l). A atividade metabólica ocorre principalmente próxima à superfície do substrato e entre os poros, contudo regiões expostas do micélio (hifas aéreas), também mostram metabolismo e servem como transportadoras de substâncias para as hifas penetrativas. Enzimas hidrolíticas (azul) são produzidas pelo micélio difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores (verde). O  $O_2$  é consumido e o  $CO_2$ ,  $H_2O$ , calor e produtos bioquímicos interessantes são produzidos durante a fermentação. Portanto, gradientes se desenvolvem dentro de biofilmes que, por exemplo, forçam o  $O_2$  a se difundir para a fase gasosa em regiões mais profundas do biofilme (lilás) e o  $CO_2$  difunde para fases mais gasosas (vermelha). O desenvolvimento de calor (Q) faz com que ocorra rapidamente um aumento na temperatura (T), que é um sério problema durante a FES. O calor é removido do substrato via condução e evaporação (azul escuro). O sistema de equilíbrio da  $H_2O$  também inclui a  $H_2O$  que passa lentamente pelo micélio, o consumo de  $H_2O$  durante as reações de hidrólise e a produção da mesma durante a respiração. Outro importante fator é o pH local, que pode ser mudado devido a liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia (cinza) (HÖLKER e LENZ, 2005).

Os processos de FES simulam o habitat de muitos fungos filamentosos como ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos que se desenvolveram em ambientes terrestres em substratos úmidos. Estes fungos e as suas enzimas, bem como seus esporos ou metabólitos, são bem ajustados ao crescimento em substratos sólidos úmidos. Os esporos de fungos produzidos por FES mostram estabilidade mais alta, são mais resistentes à secagem e exibem taxas de germinação mais altas por períodos de tempo extensos depois da liofilização do que esporos produzidos por fermentação submersa. Isto pode ser atribuído ao fato de que conidiósporos produzidos em FES tem uma alta hidrofobicidade causada por uma proteína tipo

hidrofobina ou também por possuírem uma parede celular mais forte e um volume celular menor. A fermentação em estado sólido só encontrou aplicações restritas em processos que usam organismos unicelulares (PEDROLLI et al, 2009). Como os processos de FES são executados em baixa atividade de água, o crescimento de bactérias e leveduras contaminantes é minimizado (HÖLKER e LENZ, 2005).



**Figura 1:** Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorrem durante a FES (legenda no texto) (HÖLKER e LENZ, 2005).

Desde 1986, no Brasil, uma série de projetos de pesquisa visando a adição de valor a produtos agrícolas tropicais, por FES, foi desenvolvida devido aos altos montantes de resíduos agrícolas gerados no país (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Assim, produtos químicos, etanol, proteína celular (SPC), cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, foram obtidos a partir dessas matérias-primas por meio da técnica de FES (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Nos últimos anos, FES recebeu mais interesse de pesquisadores, desde que vários estudos de enzimas e outras substâncias mostraram que FES pode dar rendimentos mais altos ou produtos com melhores características do que a fermentação submersa. Além do mais, os custos são muito mais baixos devido à utilização eficiente e a adição de valor de resíduos. A grande vantagem dos processos de FES é a matéria-prima extremamente barata usada como substrato principal. Por isso, a FES é certamente um bom modo de utilizar os resíduos sólidos

ricos e nutritivos como substrato. Resíduos agrícolas são produzidos em enormes montantes e desde que eles são ricos em carboidratos e outros nutrientes, eles podem servir de substrato para a produção de químicos e enzimas usando a técnica de FES (COUTO e SANROMÁN, 2006).

A natureza do substrato sólido empregado é o fator mais importante que afeta processos de FES e a sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados com preço e disponibilidade podendo, assim, implicar o refugo de vários resíduos agro-industriais. No processo de FES o substrato sólido não só fornece os nutrientes à cultura, mas também funciona como suporte para as células microbianas. Entre vários fatores, que são importantes para o crescimento microbiano e a atividade em um determinado substrato, o tamanho da partícula e a atividade de água/nível de umidade são os mais críticos (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Geralmente, as menores partículas do substrato fornecem uma área superficial maior para o ataque microbiano, mas se elas forem pequenas demais pode resultar em aglomeração do substrato bem como um crescimento limitado. Ao contrário, partículas maiores fornecem melhor aeração, mas uma superfície limitada para o ataque microbiano. Por isso, um tamanho de partícula ideal deve ser selecionado para cada processo determinado (PANDEY et al, 1999).

A utilização desses resíduos agroindustriais, de um lado, fornece substrato a um custo acessível e, no outro, ajuda na solução de problemas de poluição, que acabariam causando se não fossem usados (PANDEY et al, 1999). Devido ao fato desses resíduos serem nutritivos, uma pequena porção é usada diretamente como alimento ou como componente para dietas de ruminantes formuladas industrialmente. A tabela 1 apresenta as principais culturas cultivadas no Brasil e o tipo de resíduos produzidos (GRAMINHA et al, 2008).

**Tabela 1:** Quantidade das principais culturas e tipo dos resíduos produzidos no Brasil (GRAMINHA et al, 2008).

Espécies	Culturas	Quantidade (kg seca/toneladas)	Resíduos matéria Produzidos
<i>Gossypium</i> spp.	Algodão	530	Semente, farelo e cera
<i>Arachis hypogaea</i>	Amendoim	740	Casca e cera
<i>Glycine max</i>	Soja	750	Casca e cera
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	557	Palha e farelo
<i>Triticum</i> spp.	Trigo	475	Palha e farelo
<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	492	Palha e farelo
<i>Zea mays</i>	Milho	550	Colmo, folha e sabugo
<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar	150	Bagaço de cana

Segundo Graminha e colaboradores (2008) atividades agroindustriais produzem dois grupos de resíduos, os resíduos fibrosos e os farelos. Os resíduos fibrosos incluem: polpa de citrus, farelo de glúten de milho, casca de soja, resíduos da fabricação da cerveja (cevada), bagaço da cana-de-açúcar, palha de milho, palha de soja, palha de algodão, casca de algodão, casca de soja, casca de amendoim e restos de colheita de sementes de gramíneas forrageiras. Os farelos incluem arroz, amendoim, soja e algodão.

Fibras são a fração predominante da parede celular de plantas e consistem principalmente de carboidratos. Os principais componentes das fibras são celulose, hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose representam a maior fração da parede celular de plantas e dos resíduos agrícolas como palha do trigo, do milho, do arroz, da soja, do algodão, bagaço da cana-de-açúcar e bagaço de laranja (GRAMINHA et al, 2008). A tabela 2 mostra os principais componentes da parede celular de algumas culturas do Brasil (modificado de GRAMINHA et al, 2008).

**Tabela 2:** Componentes da parede celular (g/kg matéria seca) de algumas culturas do Brasil ( modificado de GRAMINHA et al, 2008)

Culturas	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Milho			
Palha	335	249	78
Pedúnculo	336	237	87
Folha	245	273	54
Sabugo	377	396	73
Farelo	338	393	49
Fibra de coco	360-430	15-25	410-450
Palha de trigo	330-380	260-320	170-190
Farelo de trigo	300	500	150
Farelo de arroz	350	250	170
Palha de arroz	280-360	230-280	120-140
Farelo de cevada	230	320	214
Palha de cevada	310-450	270-380	140-190
Farelo de aveia	493	250	180
Palha de aveia	300	220	85
Semente de uva	71	311	435

O farelo de trigo é um dos substratos ideais para a produção de enzimas, pois seus constituintes são soltos e fácil de ventilar, tem uma área de superfície grande e é abundante em nitrogênio, carbono e sais inorgânicos (DEBING et al, 2006).

O meio sólido deve ser considerado um meio heterogêneo em termos de população microbiana e concentração de solutos. Quanto maior for a heterogeneidade da mistura na fermentação sólida, menos precisos são os resultados. Para reduzir essa heterogeneidade pode-se usar sistema com misturador, microrganismos com maior capacidade de expansão do crescimento no substrato, como fungos filamentosos e a aeração forçada para remover o CO<sub>2</sub>, dissipar calor e distribuir umidade (GRIFFIN, 1981; GERVAIS e MOLIN, 2003).

Uma grande limitação da FES é a dificuldade de remoção do excesso de calor gerado pelo metabolismo do microrganismo, devido à baixa condutividade térmica do meio sólido. Na prática, a FES requer aeração como veículo de dissipação de calor, muito mais do que para suprimento de O<sub>2</sub>. O aumento da temperatura num biorreator

provoca a desnaturação do produto, principalmente de substâncias termolábeis (VIESTURS et al, 1981; SANTOS et al, 2004)

Apesar das inúmeras vantagens a FES no âmbito industrial é, no momento, de difícil aplicação. Os principais obstáculos são a baixa receptividade do processo à regulação, as condições de fermentação fortemente heterogêneas e daí muitas vezes insatisfatória reprodutibilidade dos resultados, difícil extrapolação, determinação da biomassa frequentemente inviável e a complicada purificação dos produtos por processos “downstream” decorrente do uso de substratos orgânicos (HÖLKER E LENZ, 2005; PEDROLLI et al, 2009). A tabela 3 resume as vantagens e desvantagens da FES (COUTO e SANROMÁN, 2006).

**Tabela 3:** Vantagens e desvantagens da FES (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Vantagens	Desvantagens
Alta produtividade	Dificuldades no aumento da escala de produção
Boa circulação de oxigênio	“Mix “ de baixa eficácia
Baixo custo	Difícil controle dos parâmetros do processo (pH, calor, umidade, condições nutricionais,...)
Requerimentos de energia e custos reduzidos	Problemas com acúmulo de calor
Tecnologia simples	Produto de maior impureza, aumentando os custos de recuperação do produto
Problemas operacionais escassos	
Assemelha o habitat natural para muitos microrganismos.	

Uma análise crítica da literatura mostra que a produção de compostos relevantes para a indústria de processamento de alimentos, por FES oferece muitas vantagens. A produção de enzima por FES é muito mais alta do que a obtida por fermentação submersa. Entre os inúmeros metabólitos produzidos por FES estão as enzimas ( $\alpha$ -amilase, frutossil transferase, lipase, pectinase), ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido cítrico) e goma xantana (COUTO e SANROMÁN, 2006).

A FES representa uma solução em potencial para alimentação de animais em países em desenvolvimento devido a alta quantidade de resíduos produzidos em diversos países (~3,5 bilhões de toneladas por ano). A vantagem do uso da FES é o

sistema que requer pouca tecnologia e a possibilidade de ser realizada nas próprias fazendas (GRAMINHA et al, 2008).

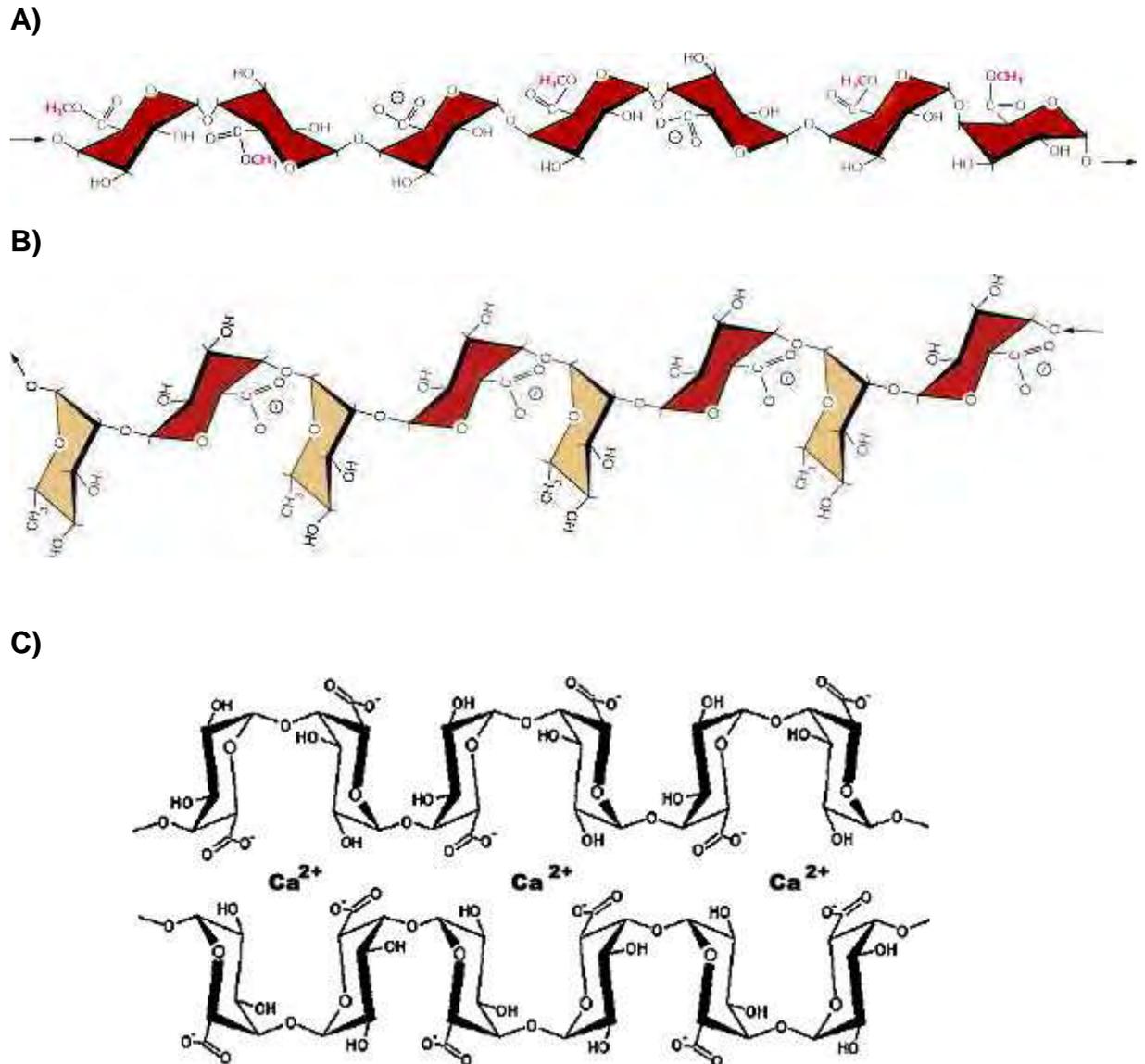
## 2.2. Pectina e classificação de pectinases

A parede celular das plantas é uma estrutura biológica complexa contendo polímeros e outras moléculas cujas proporções e organização estrutural varia com o tipo e a idade da planta. O crescimento da parede primária começa com a elongação da célula da planta. Durante o progressivo espessamento da parede secundária, a deposição de celulose excede a de xilana, pectina e ácido ferrúlico, os quais deixaram de ser adicionados à parede e começa a deposição de lignina (GRAMINHA et al, 2008).

As pectinas são uma família de polissacarídeos complexos que promovem a aderência das paredes celulares entre células vegetais adjacentes formando uma estrutura rígida pela interação com a celulose, a hemicelulose e a lignina (FRY, 1986; MC NEILL et al, 1984; FOGARTY e WARD, 1972). Polissacarídeos pécticos são formados por duas regiões interligadas: a homogalacturonana e a ramnogalacturonana (Figura 2). A primeira é um homopolímero formado por uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galactopiranosilurônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4-D-glicosídicas. Esses resíduos de ácido D-galacturônico podem ter alguns de seus grupos carboxila metil-esterificados ou O-acetilados nos carbonos 3 ou 2 (Figura 2). A ramnogalacturonana é um heteropolímero que tem a estrutura principal formada por repetidas unidades de ácido galactopiranosilurônico ligado à ramnose por ligações  $\beta$ -(1→2) e  $\beta$ -(1→4) e cadeias laterais consistindo de arabinose e galactose (RIDLEY et al, 2001; PÉREZ et al, 2000). Estes polissacarídeos acídicos, negativamente carregados podem ser neutralizados por íons, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2C) (JAYANI et al, 2005)

Resíduos de ácido D-galacturônico podem ter substituintes como metanol, ácido acético e xilose, nas regiões “lisas” (homogalacturonana) e heterogêneas (ramnogalacturonana). Os grupos carboxila da pectina podem estar parcialmente esterificados com metanol (PILNIK e VORAGEN, 1970) e os grupos hidroxila, na posição 2 e/ou 3 de resíduos de ácido galacturônico são, algumas vezes, acetilados (ROMBOULTS e THIBAUT, 1986). Os níveis de metilação ou acetilação são

definidos como o número de grupos carboxila ou hidroxila esterificado por 100 unidades de ácido galacturônico (BELDMAN, 1996).



**Figura 2: A)** Molécula de Homogalacturonana. **B)** Molécula de Ramnogalacturonana. **C)** Neutralização das cargas negativas de moléculas de homogalacturonana por íons  $\text{Ca}^{2+}$ . (figuras originais: <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/11B/lect11B.html>)

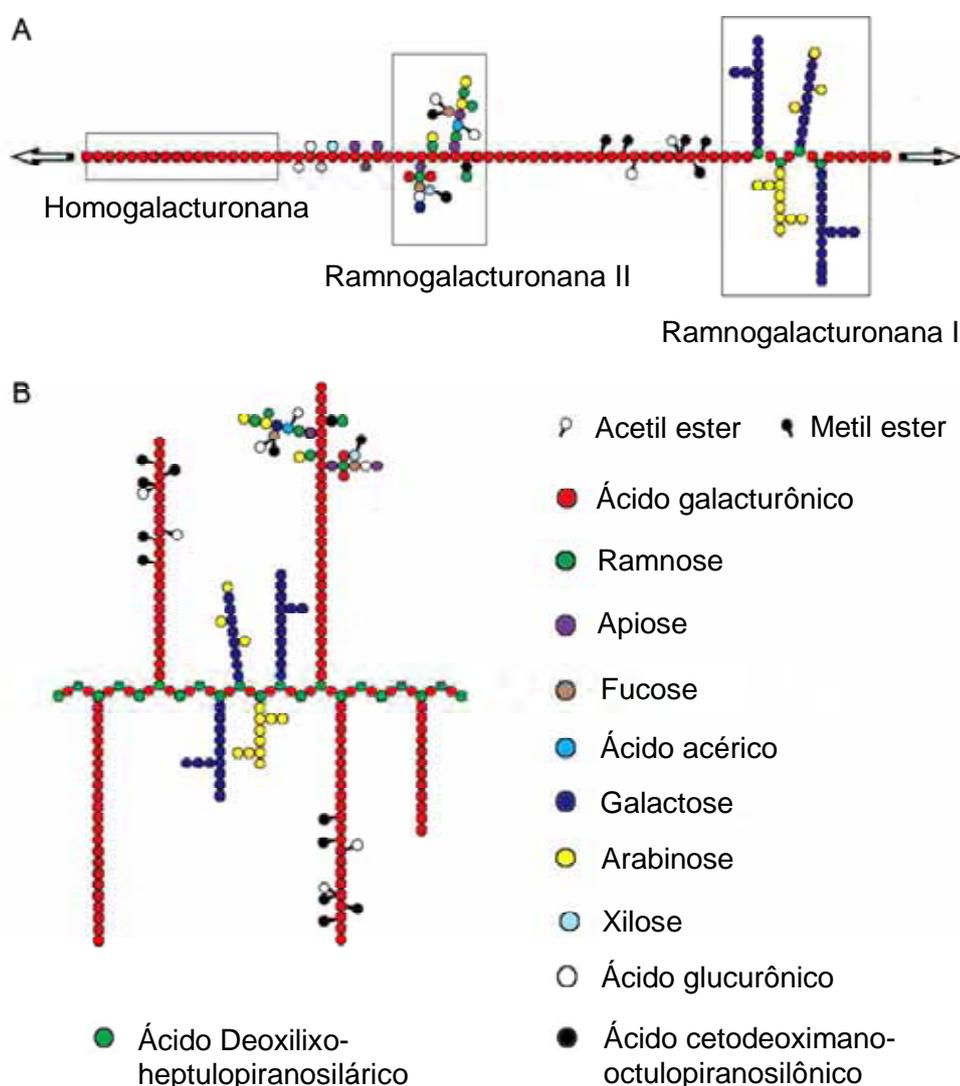
Pedrolli e colaboradores (2009) relatam três grupos maiores de polissacarídeos pécticos:

A homogalacturonana (HG) é um polímero linear formado por ácido D-galacturônico o qual pode ser acetilado e/ou metil esterificado.

A ramnogalacturonana I (RGI) é composta de repetidos dissacarídeos ácido galacturônico-ramnose. Os resíduos galacturônicos podem ser acetilados e ambos os resíduos podem carregar cadeias laterais de açúcares neutros como galactose, arabinose e xilose.

A ramnogalacturonana II (RGI) é uma cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos galacturônicos.

A Figura 3 é uma representação esquemática da estrutura básica da pectina mostrando estes grupos de polissacarídeos pécticos.



**Figura 3:** A estrutura básica da pectina. Representações esquemáticas das estruturas da pectina: convencional (A) e da alternativa proposta recentemente (B) (WILLATS et al, 2006).

Enzimas pectinolíticas ou pectinases atuam sobre substâncias pectinolíticas através de diferentes mecanismos de reação, preferências por substratos e padrões de ação.

Existem três tipos de pectinases: Protopectinases, Esterases e Despolimerizantes.

### 2.2.1. Protopectinases

São enzimas que solubilizam protopectinas (substância péctica insolúvel em água presente no tecido intacto). Liberam pectinas solúveis e altamente polimerizadas a partir da protopectina (ALKORTA *et al*, 1998; KASHYAP *et al*, 2001). São classificadas em dois tipos: um reage com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (tipo A) e outro com cadeias de polissacarídeo que podem conectar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (SAKAI *et al*, 1993).

### 2.2.2. Esterases

As pectina-esterases (EC 3.1.1.11) são conhecidas também como pectina-metil-esterases, pectase, pectina metoxilase ou pectina-metilhidrolases (KYRIAKIDIS, 1999).

As pectina-esterases catalisam a desesterificação do grupo metoxila da pectina formando ácido péctico e metanol (KASHYAP *et al*, 2001). As pectina-esterases são as primeiras enzimas a atuar na degradação da pectina (SAKAI *et al*, 1993), permitindo que poligalacturonases (HUBER, 1983) e liases atuem no produto (SAKAI *et al*, 1993). Biologicamente, são de grande importância, pois permitem a ação posterior de pectinases que só atuam sobre compostos pécticos com menor grau de esterificação. São produzidas por fungos filamentosos, leveduras, bactérias e vegetais superiores (SAKAI *et al*, 1993), nos quais ocorrem em diversos tecidos, especialmente nos frutos (BARON E THIBAUT, 1985). Estão classificadas na família 8 das carbohidrato-esterases (PEDROLLI *et al*, 2009).

### 2.2.3. Pectina acetil esterases

As pectina acetil esterases (EC 3.1.1.-) hidrolizam o éster acetil da pectina formando ácido péctico e acetato. Estão classificadas nas famílias 12 e 13 das carboidrato-esterases (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.4. Polimetilgalacturonases

As polimetilgalacturonases catalizam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  na estrutura da pectina, preferencialmente de alta esterificação, formando 6-metil-D-galacturonato. As endopolimetilgalacturonases catalizam a clivagem do substrato de forma randômica. As exopolimetilgalacturonases catalizam a clivagem hidrolítica do substrato a partir da extremidade não redutora produzindo monogalacturonato ou digalacturonato em alguns casos (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.5. Poligalacturonases

As poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  no ácido péctico ou poligalacturônico, preferencialmente, o qual é produzido por demetilação da pectina pela pectinesterase. As endopoligalacturonases (EC 3.2.1.15) atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  internas entre os ácidos galacturônicos de forma randômica e seus produtos primários são oligogalacturonatos, enquanto as exopoligalacturonases são subdivididas em Exo-PG-1 (E.C. 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e Exo-PG-2 (E.C. 3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (REXOVA-BENKOVA e MARKOVIC, 1976; PILNIK e ROMBOUTS, 1981; DA SILVA et al, 1997; JAYANI et al, 2005). As poligalacturonases produzidas por microrganismos foram caracterizadas e classificadas como família 28 das hidrolase glicosídicas (DEVI e RAO, 1996; NAGAI et al, 2000).

### 2.2.6. Liases

São enzimas despolimerizantes que clivam as ligações  $\alpha$ -1-4 de pectatos ou pectinatos por transeliminção de hidrogênio, o que resulta em galacturonídeos com ligação insaturada entre C4 e C5, na terminação não redutora do ácido galacturônico formado (SAKAI *et al*, 1993; KASHYAP *et al*, 2001).

### 2.2.7. Pectato-liase

A pectato-liase (EC 4.2.2.2) é a enzima mais bem estudada entre as pectinases. As pectato-liases clivam ligações glicosídicas preferencialmente no ácido poligalacturônico formando produtos insaturados ( $\Delta$ -4,5-D-galacturonato) através de reação de transeliminção. São dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade e, portanto são fortemente inibidas por agentes quelantes como EDTA (PEDROLLI *et al*, 2009). Podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o modo de ataque ao substrato:

Endo-poligalacturonato liase: ataca o ácido péctico aleatoriamente, liberando oligogalacturonatos insaturados (JAYANI *et al*, 2005).

Exo-poligalacturonato liase: ataca o ácido péctico a partir da terminação redutora, liberando 4-5 digalacturonatos (JAYANI *et al*, 2005) e 4-5 trigalacturonatos insaturados (SATO e KAJI, 1977).

### 2.2.8. Pectina-liase

A pectina-liase catalisa a clivagem de forma randômica da pectina, preferencialmente de alta metilação, produzindo metiloligogalacturonatos através da transeliminção das ligações glicosídicas. A pectina-liase não necessita de cálcio para sua atividade, mas é estimulada por este e outros cátions. Até o presente momento todas as pectina-liases descritas são endopectina-liases (EC 4.2.2.10) (PEDROLLI *et al*, 2009)

A completa degradação do substrato péctico ainda necessita de enzimas que clivem a cadeia de ramnogalacturonana:

### 2.2.9. Ramnogalacturonana ramnohidrolase ou Ramnopirano-hidrolase

A ramnopirano-hidrolase (EC 3.2.1.40) catalisa a clivagem hidrolítica da cadeia de ramnogalacturonana pela extremidade não redutora produzindo ramnose. Essas enzimas estão classificadas nas famílias 28, 78 e 106 das glicosil hidrolases (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.10. Ramnogalacturonana galacturonohidrolase

A RG galacturonohidrolase (EC 3.2.1.-) catalisa a clivagem hidrolítica da cadeia de ramnogalacturonana pela extremidade não redutora produzindo monogalacturonato. Está classificada na família 28 das glicosil hidrolases (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.11. Ramnogalacturonana hidrolase

A RG hidrolase hidrolisa ao acaso a cadeia de ramnogalacturonana produzindo oligogalacturonatos (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.12. Ramnogalacturonana liase

A RG liase (EC 4.2.2.-) catalisa a transeliminação, ao acaso, da ligação ramnose-galacturonato da cadeia ramnogalacturonana, produzindo um galacturonato insaturado na extremidade não redutora de um oligômero e um segundo oligômero contendo ramnose como o resíduo da extremidade redutora. Essas enzimas estão classificadas nas famílias 4 e 11 das polissacarídeo-liases (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.2.13. Ramnogalacturonana acetilesterases

A RG acetilesterase (EC 3.1.1.-) catalisa a clivagem de grupos acetil da cadeia de ramnogalacturonana. Está classificada na família 12 das carbohidrato-esterases (PEDROLLI et al, 2009).

#### 2.2.14. Xilogalacturonase

A xilogalacturonase (EC 3.2.1.-) catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas entre dois resíduos galacturonato na cadeia de ramnogalacturonana substituída por xilose, produzindo dímeros xilose-galacturonato. Essas enzimas estão classificadas na família 28 das glicosil hidrolases (PEDROLLI et al, 2009).

### 2.3. Pectinases produzidas por microrganismos e sua importância industrial

Enzimas microbianas que catalisam a degradação de polissacarídeos pécticos são importantes para a indústria alimentícia, desde que são usadas para extração, clarificação e depectinização de sucos de frutas, maceração de vegetais e frutas e extração de óleo vegetal (JAIN et al, 1990). Além disso, pectinases também são aplicáveis na degomagem de produtos de fibras naturais, como o rami, pela indústria têxtil; na preservação da madeira; na fermentação do café e do chá; na manufatura de papel e polpa e na produção de ração para aves domésticas (HOONDAL et al, 2002; GUMMADI e PANDA, 2003).

A habilidade para sintetizar pectinases é comum entre todos os grupos de microrganismos, porém para propósitos industriais, os fungos são preferidos porque cerca de 90% de suas enzimas podem ser secretadas no meio de cultura (SOLIS et al, 1990). Além disso, as poligalacturonases produzidas por fungos possuem alta atividade enzimática e atividade ótima a um baixo pH, apropriado para a maioria dos processos industriais aplicados em frutas e vegetais (DZIEZAK, 1991). Os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Trichoderma* são as principais fontes de enzimas pectinolíticas. *A. niger* é um dos mais importantes microrganismos utilizados em biotecnologia e tem sido usado por muitas décadas para produzir muitas enzimas extracelulares e ácido cítrico. Esse microrganismo é considerado GRAS (generally regarded as safe) pelo United States Food and Drug Administration (SCHUSTER et al, 2002).

Encontra-se na literatura vários trabalhos sobre pectinases produzidas por *Aspergillus*. Pashova e colaboradores (1999) estudaram o envolvimento do mecanismo de regulação da indução da biossíntese da polimetilgalacturonase por células imobilizadas de *Aspergillus niger* 26. A imobilização alterou o perfil de enzimas pectinolíticas. As culturas de células produzem quatro pectinases,

polimetilgalacturonase (174,3U/mg), poligalacturonase (34,5U/mg), pectina esterase (8,1U/mg) e pectina liase (6,1U/mg) enquanto que as células imobilizadas sintetizam somente a polimetilgalacturonase (458,3U/mg) e a poligalacturonase (82,9U/mg), porém com um rendimento bem maior destas enzimas. O melhor indutor para a síntese de polimetilgalacturonase foi a pectina de maçã de alta esterificação (92% D.E.) e a presença deste foi obrigatória para a síntese da enzima.

Bai e colaboradores (2004) relataram a produção de pectinase através de FES por *Aspergillus niger*. A polpa de beterraba foi utilizada como fonte de carbono e as águas residuais da produção de glutamato monossódico foram utilizadas como fonte de nitrogênio e água. A produção máxima de endopectinase foi de 15000 AJDA $\mu$ /g de polpa de beterraba seca [Uma unidade (AJDA $\mu$ ) de atividade endopectinase é definida como a quantia de enzima que deve degradar 1mg de pectina no pH 4,2 em 40°C em meia hora] e ocorreu depois de 96h de cultivo. A pectinase bruta, extraída do material em fermentação, pode induzir resistência a doenças em mudas de pepino e tomate.

Panda e colaboradores (2004) usaram como fonte de carbono o milho e a glicose para a produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus niger* NCIM 548. Embora a glicose em adição ao milho seja um componente necessário para a produção das enzimas pectinolíticas, elas só serão substancialmente sintetizadas quando a glicose for reduzida a concentrações inferiores a 5g/L. A síntese máxima das enzimas foi 1,59U de polimetilgalacturonase em 144h, 1,84U de poligalacturonase em 132h e 0,016U em 96h. A glicose é um inibidor competitivo da síntese de polimetilgalacturonase e poligalacturonase por *Aspergillus niger* NCIM 548, enquanto a síntese de pectina liase pelo mesmo microrganismo não foi afetada, quando foram feitas comparações com os controles de cada enzima.

Debing e colaboradores (2006) produziram pectinase por *Aspergillus niger* A2.26 em FES utilizando dextrose de arroz, farelo de trigo, sulfato de amônia e Tween 80. A atividade máxima de pectinase foi 391,7U/g de matéria seca e ocorreu em 84h de fermentação. Os substratos foram escolhidos devido ao fato de serem abundantes, de possuírem baixo custo e de não serem tóxicos para animais. Altas concentrações de sulfato de amônia levam a atividade de exopectinase e o Tween 80, um surfactante típico, estimula a produção de enzima.

No gênero *Penicillium*, várias espécies são potentes pectinolíticas. A espécie *Penicillium daleae* foi capaz de degradar à estrutura monomérica

ramnogalacturonana-II (mRG-II), que é resistente a todas as enzimas pectinolíticas usadas na indústria de processamento de frutas e vegetais, indicando que esta linhagem é uma fonte potencial de novas pectinases, cujo modo de ação requer elucidação (VIDAL et al, 1999).

Embora a maioria dos trabalhos tenha se centrado no estudo de pectinases de deuteromicetos, essas enzimas também são produzidas por basidiomicetos (XAVIER-SANTOS et al, 2004; SCHNITZHOFER et al, 2007; SOUZA et al, 2008) e ascomicetos (FREITAS et al, 2006). Segundo Freitas e colaboradores (2006), a linhagem *Aspergillus* sp N12 produziu poligalacturonases em FES empregando como fontes de carbono misturas de farelo de trigo e bagaço de laranja. O fungo chegou a produzir 10U/mL após 72h de incubação a 45°C. A exopoligalacturonase produzida pela linhagem mostrou atividade ótima em pH 5,5 e temperatura a 50°C. Esta enzima foi estável em pH 4,0 e termoestável até 50°C por 1h. Também houve produção de endopoligalacturonase pelo fungo utilizando a mesma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja. A produção de endo-PG por *Aspergillus* sp N12 foi 1,9U/mL após 72h de incubação a 45°C.

As aplicações comerciais das pectinases foram realizadas nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930 e somente a partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química dos tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, é que os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente (KASHYAP et al, 2001). Diversas companhias na Europa, Estados Unidos e no Japão produzem pectinases e preparações comerciais de pectinases. Atualmente, essas enzimas correspondem a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas (UENOJO e PASTORE, 2007).

As pectinas contribuem para a viscosidade e turbidez dos sucos das frutas. As pectinases misturadas com outras enzimas são utilizadas na extração e clarificação dos sucos de frutas diminuindo o tempo de filtração em até 50%. O tratamento das polpas das frutas com pectinases mostrou um aumento no volume dos sucos de frutas de bananas, uvas e maçãs (JAYANI et al, 2005).

A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais (UENOJO e PASTORE, 2007). As pectinases são usadas para reduzir a viscosidade, consistência e turbidez, aumentando o rendimento do

suco e facilitando a clarificação e a concentração, aumentando a velocidade de prensagem e liberação de açúcares. As hemicelulases em combinação com as pectinases aumentam muito pouco a liberação de açúcares mas são importantes no processo de liquefação pois facilitam a separação do suco dos sólidos. Após a trituração, os sucos ficam frequentemente muito viscosos e os sólidos remanescentes são difíceis de separar do suco. A presença de celulase na mistura de enzimas exerce um efeito favorável na melhoria da viscosidade e filtrabilidade do suco de banana (KAUR et al, 2004). A adição de  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, ativas a pH ácido, é usada no processamento de frutas contendo amido, especialmente maçã, para prevenir turvação (UENOJO e PASTORE, 2007).

O tratamento enzimático conduz a uma extensa degradação da lamela média e da pectina das paredes celulares por ação da poligalacturonase, pectina metil esterase e pectina liase (UENOJO e PASTORE, 2007).

As pectinases, em conjunto com  $\beta$ -glucanases e hemicelulases, tem sido utilizadas na produção de vinho. As vantagens do uso das três enzimas são: melhor maceração da casca e aumento da extração de pigmentos, facilita a clarificação e a filtração do mosto e aumenta a qualidade e a estabilidade do vinho. A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto do 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. Algumas aplicações das pectinases na indústria de alimentos e vinhos estão resumidas na tabela 4 (UENOJO e PASTORE, 2007).

As pectinases desempenham um importante papel na fermentação do café e do chá. Na produção do chá o tratamento enzimático acelera a fermentação e melhora as propriedades dos chás em pó instantâneos, devido a degradação da pectina. A fermentação do café utilizando microrganismos pectinolíticos é feita para remover a camada de mucilagem dos grãos de café. Enzimas pécticas também são adicionadas para remover a camada de mucilagem dos grãos, constituída de três quartos de substâncias pécticas. As celulases e hemicelulases presentes na preparação enzimática ajudam na digestão da mucilagem (KASHYAP et al, 2001; JAYANI et al, 2005).

**Tabela 4:** Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e vinhos (UENOJO e PASTORE, 2007).

Enzima	Função	Aplicação
Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).	Hidrólise de pectina solúvel e de componentes de paredes celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas.	Melhoramento na extração de sucos de frutas e de óleo de oliva, liberação de aromas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amido e agar.
Pectinase ácida e termo-estável com poligalacturonase, pectina esterase e pectina transeliminase.	Rápida diminuição de viscosidade e quebra dos tecidos vegetais.	Melhora o rompimento da fruta e aumenta a extração de pigmentos de cor.
Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase.	Hidrólise parcial de pró-pectina.	Produção de purês com alta viscosidade.
Poligalacturonase e pectina transeliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulase.	Hidrólise parcial de pró-pectina e de pectina solúvel em fragmentos de tamanho médio, formação de precipitado e remoção de hidrocolóides de celulose.	Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade.
Poligalacturonase, pectina transeliminase e hemicelulase.	Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados.	Clarificação de sucos de frutas.
Pectinase e $\beta$ -glicosidase.	Infusão de pectinase e glicosidase para facilitar o descascamento e melhorar a firmeza de frutas e vegetais.	Alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais.
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase.	Processamento de frutas.	Produção de "ketchup" de alta qualidade e de polpas de frutas.
Pectina esterase.	Desesterificação e geleificação de pectina.	Melhoramento na clarificação de cidra.
Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais.	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor de uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação de vinhos.

Óleos de canola, girassol, palma e de oliva entre outros são tradicionalmente produzidos pela extração com solventes orgânicos. O solvente mais utilizado é o hexano, o qual é potencialmente carcinógeno. Enzimas que degradam a parede celular, incluindo a pectinase, podem ser utilizadas para extrair óleo vegetal em um processo aquoso pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm óleo (KASHYAP et al, 2001).

Pectinases são utilizadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal aumentando assim a absorção e a liberação de nutrientes quer pela hidrólise das fibras não biodegradáveis ou por liberação dos nutrientes bloqueados pelas fibras (JAYANI et al, 2005).

A aplicação de pectinases na indústria têxtil facilita a separação das fibras de celulose pela degradação das moléculas de pectina interligadas à hemicelulose. Essas enzimas vêm sendo aplicadas na degomagem de fibras derivadas da juta, rami e outros vegetais, utilizados na fabricação de diversos materiais, como roupas, fio e lonas. Essas fibras contem aproximadamente 20% a 35% de material gomoso incrustado constituído principalmente de pectina, o qual precisa ser removido para a utilização industrial das mesmas. Tradicionalmente, a remoção é feita por processos de degomagem química com soluções alcalinas aquecidas, que geram resíduos prejudiciais ao ambiente e apresentam um alto consumo de energia. Uma das soluções para estes problemas é a utilização de processos biotecnológicos que envolvem a utilização de pectinases ou combinações de pectinases e xilanases, que, além de representar uma alternativa econômica, não provoca danos ao ambiente (KAPOOR et al, 2001).

As fibras liberianas são fibras moles formadas em grupos fora do xilema, floema ou periciclo como o rami e o cânhamo. As fibras contêm goma que deve ser removida antes da sua utilização para manufatura de têxteis. O tratamento químico de degomagem é poluente, tóxico e não biodegradável. A degomagem biotecnológica usando pectinases em combinação com xilanases apresenta uma alternativa favorável do ponto de vista ecológico e econômico para este problema (JAYANI et al, 2005).

Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar pectinas e subsequentemente diminuir a demanda catiônica das soluções pécticas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido (JAYANI et al, 2005).

Convencionalmente, nas indústrias de processamento de citrus o tratamento de águas residuais, contendo substâncias pécticas, é realizado em várias etapas que levam à formação de metano. Esse tipo de tratamento tem algumas desvantagens como o alto custo e o longo período de tratamento, além da poluição ambiental resultante da utilização de produtos químicos. Assim, uma alternativa eficaz econômica e ambientalmente é a utilização de pectinases de bactérias que seletivamente removem as substâncias pécticas das águas residuais (HOONDAL et al, 2002).

Aranda e colaboradores (2004) investigaram a importância das enzimas hidrolíticas produzidas por fungos saprófitas na degradação de substâncias solúveis em água de resíduos secos da extração de óleo da oliva (ADOR). Estas substâncias são utilizadas como fertilizantes devido ao alto conteúdo orgânico, entretanto são fitotóxicas e a contaminação dos solos com este resíduo se tornou um grave problema. Contudo a biorremediação é possível com a utilização de fungos saprófitas que na presença de ADOR produziram endopolimetilgalacturonase (pectinase) e endoglucanase que degradaram as substâncias fitotóxicas presentes nos resíduos da extração de óleo. Os fungos utilizados neste processo foram *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium lateritum* e *Fusarium oxysporum*. Existe uma correlação entre a diminuição da fitotoxicidade de ADOR e a produção de enzimas solúveis pelos fungos saprófitas. O fungo *F. oxysporum*, que produziu menor quantidade de enzimas hidrolíticas (especialmente endopolimetilgalacturonase que não chegou a 1 unidade/mg de proteína), não foi capaz de diminuir a fitotoxicidade de ADOR 5%. A incubação com o fungo *F. lateritum*, o qual produziu mais enzimas hidrolíticas do que *F. oxysporum*, diminuiu a fitotoxicidade de ADOR 5%. O fungo *P. chrysogenum*, o qual produziu a maior quantidade de enzimas hidrolíticas, foi capaz de diminuir a fitotoxicidade de ADOR 15%.

#### **2.4. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis**

A temperatura tem grande influência no funcionamento de moléculas e estruturas biológicas. De fato, a maioria dos organismos atualmente conhecidos pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção, ou a persistência, de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem

altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos (BROCK e MADIGAN, 2001).

Os organismos que crescem em temperaturas elevadas são classificados em (MADIGAN e ORENT, 1999):

1. Termofílicos moderados: incluem organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20°C e um máximo de 55°C, sendo, as temperaturas ótimas entre 40 e 50°C. Nesse grupo estão incluídos os procariotos dos Domínios Bactéria e Archaea e os eucariotos (Domínio Eukarya - fungos filamentosos).
2. Termofílicos extremos: incluem microrganismos capazes de crescer otimamente em temperaturas entre 65 a 85°C. Esse grupo é representado pelos procariotos dos Domínios Bactéria e Archaea.
3. Hipertermofílicos: Aqui estão as Archaea com temperaturas ótimas de crescimento entre 85 e 110°C.

Enzimas termoestáveis ou termozimas são geralmente definidas como aquelas com uma temperatura ótima acima da máxima para o crescimento de um organismo ou com excepcional estabilidade acima de 50°C em um período prolongado de tempo (SINGH et al, 2000).

A termoestabilidade das enzimas engloba a termoestabilidade dinâmica e a estabilidade cinética. A termoestabilidade dinâmica é definida pela energia livre de estabilização da enzima  $\Delta G_{\text{stab}}$  (ou a mudança de energia livre para a reação “estado dobrado  $\leftrightarrow$  desdobrado” sob condições fisiológicas) e pela temperatura de fusão ( $T_m$ ). A estabilidade cinética depende da barreira de energia para desdobramento (a energia de ativação do desdobramento  $E_a$ ). A estabilidade cinética da enzima é frequentemente expressa como sua meia-vida ( $t_{1/2}$ ) em temperaturas definidas. Na maioria dos casos a  $\Delta G_{\text{stab}}$  de uma enzima termoestável é 5-20kcal/mol mais alta do que a de proteínas mesofílicas a 25°C. Valores de  $\Delta G_{\text{stab}}$  tão pequenos quanto 3,0-6,5kcal/mol podem ser responsáveis por aumentos de termoestabilidade de até 12°C. A presença de algumas ligações hidrofóbicas adicionais na molécula aumenta a energia livre em 5-7kcal/mole. Portanto, mudanças menores na estrutura da enzima podem levar a grandes mudanças na termoestabilidade (VIEILLE e ZEIKUS, 2001; LI et al, 2005).

A atividade e a estabilidade das enzimas termofílicas em altas temperaturas são o resultado de várias propriedades como estabilidade do dobramento e rigidez da molécula que são determinadas pela composição e distribuição de aminoácidos,

pontes dissulfeto, interações hidrofóbicas e aromáticas, pontes de hidrogênio, pares de íons, estabilização do dipolo da  $\alpha$ -hélice, estabilização de “loops”, modificações pós-tradução (glicosilação) e parâmetros extrínsecos (sais inorgânicos, substrato, pressão e chaperoninas) (VIEILLE e ZEIKUS, 1996; DAS e GERSTEIN, 2000; VIEILLE e ZEIKUS, 2001; BRUINS et al, 2001; HAKI e RAKSHIT, 2003).

Kumar e Nussinov (2001) mostraram que as ligações iônicas e as ligações de hidrogênio entre cadeias laterais aumentam a estabilidade na maioria das proteínas termofílicas.

Em 2003, Yano e Poulos compilaram os fatores que são reportados como importantes para o aumento da estabilidade da proteína. Foi mencionado que as interações eletrostáticas, as interações cátion- $\pi$ , as interações aromáticas e hidrofóbicas realçariam a estabilidade (GROMIHA et al, 2002; PAIARDINI et al, 2003).

Saraboji e colaboradores (2005) analisaram 23 famílias termofílicas diferentes e seus homólogos mesofílicos para estudar a termoestabilização das suas proteínas. Nesta análise, a grande maioria das proteínas termofílicas adota a contribuição de energia livre ligeiramente menor do que as suas contrapartes mesofílicas. A observação principal deste estudo é a menor contribuição de energia livre hidrofóbica devido à cadeia principal de átomos de carbono e nitrogênio em todas as proteínas termofílicas aumentando a estabilidade destas proteínas. A combinação possível dos diferentes termos de energia livre mostra que a maioria das proteínas termofílicas tem estratégia de energia livre menor que seus homólogos mesofílicos. Os resultados obtidos mostram que a energia hidrofóbica livre devido a átomos de carbono e nitrogênio e tais combinações de componentes de energia livre desempenham um papel vital na termoestabilização dessas proteínas.

Boutz e colaboradores (2007) apresentaram a primeira análise proteômica das ligações dissulfeto intracelulares no hipertermofílico *Pyrobaculum aerophilum*. Este estudo revelou que a utilização de ligações dissulfeto se estende além das proteínas individuais para incluir muitos complexos de proteína-proteína. O homodímero da citrato sintase, complexo mostrado neste estudo, contém duas ligações dissulfeto intramoleculares, uma por subunidade, que resultam na ciclização de cada cadeia de proteína de tal modo que as duas cadeias são topologicamente ligadas, ficando inseparáveis. Cadeias de proteínas topologicamente ligadas são extremamente raras entre proteínas naturais. Embora a estrutura da citrato sintase *P. aerophilum* (PaCS)

seja somente o segundo caso observado de uma proteína natural que forma um catenano pela ligação dissulfeto, parece improvável que esses sejam os únicos casos presentes na natureza. Como mais estruturas de proteínas termofílicas estão sendo determinadas, é provável que outros exemplos ou que outros mecanismos semelhantes do embaraço topológico sejam descobertos.

A identificação das estratégias moleculares adotadas pela evolução para realçar a termoestabilidade na interface das enzimas oligoméricas foi analisada por Maugini e colaboradores (2009). A variação de algumas propriedades estruturais relacionadas à estabilidade da proteína foi testada nas interfaces das subunidades de oligômeros termofílicos e hipertermofílicos. As diferenças das características estruturais das interfaces observadas entre as enzimas termofílicas e hipertermofílicas foram comparadas com as diferenças das mesmas propriedades calculadas por comparações pareadas com proteínas oligoméricas mesofílicas contidas em um banco de dados referência. A significância das diferenças de propriedades estruturais observadas foi medida por um teste t. A diferença mais significativa encontrada foi a área de contato hidrofóbico que é o fator de estabilização mais freqüente na interface das subunidades de oligômeros termofílicos e hipertermofílicos. A compacidade da interface também parece aumentar nas proteínas hipertermofílicas. As variações da composição de aminoácidos nas interfaces refletem a variação das propriedades da interface. Os resultados sugerem que o número de ligações de hidrogênio diminui na interface de hipertermofílicos e termofílicos e, por isso, elas não parecem ser essenciais para manter a estabilidade da interface. Do mesmo modo, o número de pares de íons não varia significativamente nas interfaces das subunidades de enzimas hipertermofílicas e termofílicas.

Proteínas de microrganismos termofílicos geralmente apresentam maior termoestabilidade intrínseca que sua equivalente mesofílica, embora mantenham a estrutura básica particular da família a que pertencem. Embora o mecanismo molecular da termoestabilização tenha sido foco de inúmeras teorias e pesquisas, ainda não é completamente entendido. Entretanto, algumas diferenças na seqüência, estrutura, função, propriedades dinâmicas e termodinâmicas foram constatadas entre enzimas de psicofílicos, mesofílicos e termofílicos. Um dos mais significativos meios de adaptação à termofilia são os mecanismos intrínsecos, relacionados às estruturas primárias e secundárias das proteínas. Embora ainda não

tenha sido estabelecido um padrão para a termoestabilidade das proteínas, existem claras diferenças estruturais entre as proteínas de organismos mesófilos e aquelas de termófilos moderados e hipertermófilos. Por outro lado, considerando-se a complexidade da estrutura de uma molécula de proteína é provável que não exista um mecanismo universal de termoestabilização. Deve ser destacado, porém, que as diferenças observadas nas seqüências das proteínas nem sempre podem ser relacionadas com termoestabilidade, considerando-se que uma combinação de fatores de pressão seletiva atuaram sobre as proteínas por milhões de anos (pressão, pH, temperatura), além das mutações que se acumularam. Dessa forma, para elucidar o mecanismo adaptativo é importante distinguir o comportamento da enzima que é ditado pela biologia daquele que é ditado pela físico-química (termoestabilidade e propriedades catalíticas) (GOMES et al, 2007).

As enzimas termoestáveis despertaram um amplo interesse industrial e biotecnológico devido ao fato de que estas enzimas são bem mais adequadas aos processos industriais nos quais condições desnaturantes de proteínas são utilizadas (HAKI e RAKSHIT, 2003). Sob o ponto de vista industrial, várias são as razões para a seleção e estudo de enzimas termoestáveis produzidas por microrganismos termofílicos ou termotolerantes, tais como (BRUINS *et al*, 2001; HAKI e RAKSHIT, 2003):

1)-Apresentam uma alta estabilidade à temperatura e geralmente são mais resistentes a agentes detergentes e a enzimas proteolíticas.

2)-Em processos que ocorrem em altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos é reduzido.

3)-Em processos com substratos fluidos, em altas temperaturas a viscosidade do substrato é reduzida, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação e permitindo o uso de menor quantidade de água, o que conseqüentemente reduz os custos de produção.

4)-Mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando um maior rendimento e menor tempo necessário para os processos.

5)-Devido à boa estabilidade em amplas faixas de pH, típica das termozimas, estas podem ser usadas no processamento de vários tipos de sucos e vegetais.

O uso de temperaturas elevadas durante o processamento de suco e outros produtos vegetais são etapas importantes dos processos industriais e têm diversas finalidades. Na maceração da uva para extração de suco, a incubação a 60-65°C

promove a plasmólise da membrana e rupturas na parede celular do fruto, facilitando a liberação do líquido e de antocianinas responsáveis pela cor do suco. Na extração de sucos de uva para produção de vinhos, a fruta macerada é tratada a 80°C para, além de facilitar a maceração, desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do “pulp wash”, a polpa da laranja (mistura de polpa e semente), resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90°C para desnaturar a pectina esterase da fruta, que causa problemas de coagulação da pectina. Além das funções citadas, o tratamento térmico ainda tem por finalidade a pasteurização dos sucos e mostos visando a redução da microbiota contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50°C para tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis. O uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos (GOMES et al, 2007).

A produção de enzimas pectinolíticas tem sido amplamente reportada em bactérias e fungos filamentosos. Entretanto são poucos os trabalhos na produção e principalmente na purificação de pectinases por fungos termofílicos.

A habilidade de 17 linhagens *T. lanuginosus* de produzir enzimas pectinolíticas foi examinada depois do crescimento em meio a 45-50°C com extrato de levedura contendo pectina de citrus ou polpa da beterraba de açúcar, sendo que a maioria delas produziu maiores quantidades da enzima no último substrato (PUCHART et al, 1999).

Martins e colaboradores (2002) produziram poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) por *Thermoascus aurantiacus* 179-5 utilizando fermentação em estado sólido com bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono. PG e PL apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e 10,5-11,0, respectivamente. A atividade máxima das enzimas foi determinada a 65°C. PG foi estável na faixa de pH ácida a neutra e a 60°C por 1h, enquanto PL foi estável em pH ácido e a 60°C por 5h.

Kaur e colaboradores (2004) mostraram que a poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo *Sporotrichum thermophile* Apinis, utilizando fermentação submersa com agitação, foi otimamente ativa em pH 7,0 a 55°C e exibiu  $t_{1/2}$  de 4h a 65°C. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima (com pectina) foram  $0,416 \text{ mg ml}^{-1}$  e  $0,52 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. A atividade da poligalacturonase foi

estimulada por  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , mas fortemente inibida por  $Mg^{2+}$  e fracamente inibida por Tween 80 e Triton X-100.  $\beta$ -mercaptoethanol exerceu um forte efeito inibitório sugerindo o papel crítico das ligações dissulfeto em manter a conformação adequada da enzima. A utilização da mistura das enzimas (pectinase, xilanases e celulase) produzidas por *S. thermophile* nas polpas de frutas causou um aumento no rendimento dos sucos de banana, uva e maçã.

Monteiro (2008) relatou para o fungo termodúrico *Aspergillus fumigatus*, a presença de atividade enzimática a partir do primeiro dia, sendo obtidos dois picos de produção, um no 6º dia (53,3U/g) e outro do 12º ao 13º dia (59,4U/g). A atividade foi ótima em pH 5,0-5,5. A enzima teve mais de 80% de sua atividade original preservada na faixa de pH 4,0-11,0. Os dados de Monteiro (2008) também mostram que o fungo *Rhizomucor pusillus* apresentou produção expressiva de poligalacturonase a partir do 3º dia, atingindo um pico de produção de 16,3 U/g no 6º dia de fermentação utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. A PG do fungo *R. pusillus* apresentou atividade máxima em pH 5,0. A estabilidade da PG foi superior a 80% em pH 3,0 a 8,5. A enzima perdeu drasticamente sua atividade em pHs superiores a 8,5. A temperatura ótima para atividade de PGs de *R. pusillus* foi de 50°C a 60°C, com atividade ligeiramente maior a 60°C, similar ao observado para as PGs de *A. fumigatus*. Com relação a termoestabilidade em ausência de substrato, as PGs de *R. pusillus* foram estáveis até 40°C, preservando 80% da atividade original. Entretanto, as PGs perderam completamente a atividade quando incubadas a 50°C. Para as PGs de *A. fumigatus* houve manutenção de praticamente 100% da atividade original até 50°C, com drástica perda de atividade em temperaturas superiores a esta.

## 2.5. Purificação de pectinases

Um melhor entendimento das propriedades de pectinases é importante na comercialização dessas enzimas em vários campos. A purificação da enzima é necessária antes da caracterização porque a enzima bruta pode conter componentes de estabilização diferentes e, portanto as propriedades podem variar muito (JACOB et al, 2008). A purificação de pectinases tem sido realizada por combinações de procedimentos cromatográficos diferentes (CELESTINO et al, 2006; SCHNITZHOFER et al, 2007) ou procedimentos únicos como sistemas de fase

aquosa (LIMA et al, 2002) ou precipitação por afinidade (MONDAL et al, 2004; JACOB et al, 2008).

Uma exopolimetilgalacturonase foi purificada a partir de *Sclerotinia sclerotiorum* por precipitação por sulfato de amônia e cromatografias em colunas de Ultrogel Aca 34, DEAE Bio-Gel A e Ultrogel AcC 44. A purificação desta enzima foi obtida com um fator de purificação de 50,8 vezes e um rendimento de 47% (RIOU e colaboradores, 1992).

Uma poligalacturonase do fungo termofílico, *Thermomyces lanuginosus*, foi purificada por ultrafiltração, precipitação por acetona e cromatografia de troca-iônica com um fator de purificação de 45,4 vezes e um rendimento de 20% (KUMAR e PALANIVELU, 1999).

Isshiki e colaboradores (2000) purificaram uma exopoligalacturonase e três endopoligalacturonases a partir dos ascomicetos patógenos da casca de pêra, *Venturia pirina* e *V. nashicola*, respectivamente, por cromatografia em CM-sepharose, concentração em Centrirep e cromatografia em HPLC TSK SP-5PW. A purificação da exopoligalacturonase foi obtida com um fator de purificação de 10 vezes e um rendimento de 11,9%. Para as três endopoligalacturonases os valores para o fator de purificação foram 5; 6; 3 vezes e para o rendimento foram 9,1%; 7,2%; e 5,4% (ISSHIKI et al, 2000).

Esquivel e Voget (2004) purificaram 470 vezes uma endopoligalacturonase (PGI) de uma cultura de *Aspergillus kawakii* com uma recuperação de 8,6% da atividade inicial em três passos: precipitação por acetona, colunas cromatográficas Q-sepharose e Sephacryl S-100.

Celestino e colaboradores (2006) purificaram 9,37 vezes uma pectinase produzida por *Acrophialophora nainiana* a qual tem atividade de exopoligalacturonase e pectina liase. 60,6% da enzima foram recuperados depois de três passos: gel filtração Sephacryl S-100, troca iônica DEAE-Sepharose e outra gel filtração em Sephadex G-50.

Uma poligalacturonase de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 foi purificada por filtração em gel Sephadex G-75 e cromatografia de troca-iônica SP-sepharose com um fator de purificação de 21,0 vezes e um rendimento de 24,6% (MARTINS et al, 2007).

Silva e colaboradores (2007) purificaram uma poligalacturonase produzida por *Penicillium viridicatum* RFC sob fermentação em estado sólido através de tratamento

com caolin, ultrafiltração e cromatografia em coluna Sephadex G50 obtendo um rendimento de 6,5% e um fator de purificação de 31,1 vezes.

A purificação de uma poligalacturonase produzida por *Streptomyces lydicus* foi obtida através de ultrafiltração e da combinação dos procedimentos de cromatografia de troca-iônica em CM-celulose e gel filtração em Sephadex G-100. O rendimento da poligalacturonase purificada foi 57,1% com um fator de purificação de 54,9 vezes (JACOB et al, 2008).

Existem poucos estudos com purificação de pectinases de zigomicetos. Chitradon e colaboradores (1996) purificaram uma pectinase de *Rhizopus* sp 26R através de concentração por sulfato de amônia, cromatografias de troca iônica em DEAE e CM-celulose e cromatografia em coluna de hidroxiapatita com um fator de purificação de 277,3 vezes e um rendimento de 11,8%. Essa enzima tem a capacidade de intensificar a hidrólise do amido cru do tubérculo de mandioca quando utilizada misturada com a glicoamilase de *Aspergillus niger* J8. A mistura das enzimas obteve uma digestibilidade mais eficiente com uma taxa de hidrólise duas vezes mais rápida do que quando a glicoamilase foi utilizada sozinha e três vezes mais rápida do que quando apenas pectinases foram utilizadas. Uma poligalacturonase do fungo *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 foi purificada por Saito e colaboradores (2004) utilizando processos cromatográficos em colunas CM-Toyopearl 650M e hidroxiapatita com um rendimento de 41,1% e um fator de purificação de 188 vezes.

Como demonstrado, procedimentos convencionais simples foram eficientemente usados para purificar pectinases. A tabela 5 apresenta algumas propriedades de poligalacturonases purificadas.

**Tabela 5:** Propriedades bioquímicas e físico-químicas de algumas pectinases

Microorganismo Produtor	Massa molecular (kDa)	pI	Atividade específica (U mg <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (μmol/min/mg prot.)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Temperatura de estabilidade	pH de estabilidade	Referências
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	74	—	259,1	—	—	45°C	5,0	45°C após 4h. A 60°C reteve 50% de sua atividade após 4h.	50% da atividade máxima foi encontrada no pH 7,5.	Riou et al, 1992.
<i>Rhizopus sp. 26R</i>	43	—	1386,5	—	—	50°C	5,25	25-40°C. A 45°C atividade permaneceu 80%.	8,0	Chitradon et al, 1996.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	59	—	209,0	0,67	7,2x10 <sup>5</sup>	60°C	5,5	65°C após 2h. A 50°C reteve 50% de sua atividade por 6h.	7-11,0	Kumar e Palanivelu, 1999.
<i>Venturia pirina</i> <i>V. nashicola</i>	43 42	—	4,0 5,0; 9,0 e 11,0	0,08	4,44x10 <sup>-3</sup>	—	5,0	—	—	Isshiki et al, 2000.

<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4033	60	3,55	430,0	—	—	4,5	Termoestável em pH > 4,0, enquanto em valores mais baixos de pH é inativada.	4,5-5,0	Esquivel e Voget, 2004.
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 4707	31	—	75,3	—	—	4,5	Até 55°C.	4-6,0	Saito et al, 2004.
<i>Acrophialophora nainiana</i>	35,5	—	286,63	4,22	1,83knkat al	8,0	37°C conservando 100% da sua atividade inicial após 9 dias.	Em pHs alcalinos. Em pH 9,0 a enzima retém mais de 50% da atividade.	Celestino et al, 2006.
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI-756	30	—	7843,0	1,46	2433,3	5,5	50°C.	5-5,5	Martins et al, 2007.
<i>Penicillium viridicatum</i> RFC	24,1	6,5	1400,0	1,82	81	6,0	45°C conservando 60-75% da sua atividade original por 1h.	7-10,0	Silva et al, 2007.
<i>Streptomyces lydicus</i> MTCC 7505	43	3,9	504,8	1,63	677,8	6,0	45°C abaixo por 90 min.	4-7,0	Jacob et al, 2008.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Produção de poligalacturonase pelo fungo *Rhizomucor pusillus* A 13.36, purificação e caracterização da mesma.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1)-Produzir poligalacturonase por *R. pusillus* A 13.36 por meio de fermentação em estado sólido usando farelo de algodão, farelo de trigo e misturas de farelo de trigo e sabugo de milho como meio de cultivo;

2)-purificar a enzima produzida;

3)-caracterizar físico-quimicamente a enzima purificada.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismo

O fungo termofílico *Rhizomucor pusillus* A 13.36 foi isolado em trabalho anterior (RABALHO, 2002) a partir de solo de plantação de mandioca - São José do Rio Preto - SP. A linhagem foi identificada na Divisão de Recursos Microbianos – CPQBA/UNICAMP e mantida em tubo de ensaio com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar- Oxoid) inclinado, coberto com água e filme de óleo mineral, a temperatura ambiente.

### 4.2. Obtenção da enzima por fermentação em estado sólido

Para a fermentação em estado sólido por *R. pusillus* A 13.36 foram utilizados como substratos o farelo de trigo, o sabugo de milho e o farelo de algodão. As seguintes proporções foram testadas: 90% sabugo de milho + 10% farelo de trigo; 100% farelo de trigo; 50% sabugo de milho + 50% farelo de trigo; 100% farelo de algodão. Os erlenmeyers contendo as misturas apropriadas foram esterilizados em autoclave a 120°C, por 30min.

A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 5g de substrato.

O fungo *R. pusillus* foi repicado em meio PDA (“potato dextrose agar”) e incubado a 45°C para crescimento. Após 3 dias 100mL de solução nutriente estéril pH 5,5 ( 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1% Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,5% elemento traço) foram adicionados e a suspensão de esporos e micélio foi feita com a alça de repique. Em seguida 10mL dessa suspensão (inóculo) foram adicionados aos erlens contendo 5g de substrato. O volume de suspensão usado proporcionou uma umidade de 70% do substrato. As incubações foram feitas a 45°C com intervalos de tempo de 24 a 168hs.

Após este período, foram adicionados 40ml de água destilada ao material fermentado, sendo posteriormente homogeneizado por 30min em shaker, a 100 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 25.000g\* durante 20min a 5°C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

\*A centrífuga utilizada foi Beckman Coulter Avanti J-25 High-Performance Centrifuge com o rotor JA-14 cuja capacidade máxima (Max RCF) é 30100(xg).

### **4.3. Medida da atividade enzimática (PG)**

A atividade da possível poligalacturonase, cuja identidade foi esclarecida apenas após o experimento de especificidade ao substrato com a enzima purificada, foi avaliada numa mistura contendo 0,9mL de tampão acetato de sódio 0,2M, pH 5,5, contendo 1% de pectina de Citrus (Sigma) com 92% ou 26% de esterificação e 0,1mL de solução enzimática bruta ou purificada. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura de reação a 55° C por 10 min., foi quantificado pelo método proposto por Nelson (1944). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de reação.

### **4.4. Determinação de proteínas totais**

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Hartree (1972), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A unidade protéica foi definida como mg de proteína/mL.

### **4.5. Purificação da enzima**

Os processos de cromatografia foram realizados utilizando dois métodos básicos para a purificação da proteína, a filtração em gel e a troca iônica, combinados com procedimentos de concentração e ultrafiltração de enzimas, descritos a seguir.

#### **4.5.1. Concentração da enzima e Cromatografia de filtração em gel – Sephadex G-150**

A solução enzimática bruta, obtida após 72h de fermentação com farelo de algodão, foi dialisada em tampão acetato de sódio 20mM pH 5,5 com quatro trocas por 24h a 4 °C. O material dialisado foi congelado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado. O material foi suspenso em 6mL de tampão MES 30mM pH 6,5 de modo a apresentar concentração de 20x do material dialisado. A amostra foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna (2,6 x 90cm) contendo

resina Sephadex G-150 (GE Healthcare) equilibrada com tampão MES 30mM pH 6,5. Para a eluição foi usado o mesmo tampão. O fluxo foi de  $0,3\text{mL min}^{-1}$  e foram coletados 3,8mL por tubo. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280nm e a atividade enzimática PG foi determinada nas frações eluídas.

#### **4.5.2. Ultrafiltração e Cromatografia de troca aniônica – Q-Sepharose**

Para dar continuidade à purificação, as frações com atividade enzimática PG, obtidas na cromatografia de filtração em gel, foram reunidas e concentradas por ultrafiltração utilizando a membrana de 10kDa Millipore. Após este procedimento o concentrado foi aplicado em uma coluna (0,5 x 9cm) contendo a resina de troca aniônica Q-Sepharose (GE Healthcare) equilibrada com tampão MES 30mM pH 6,5. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl escalonado de 0 a 1M (6mL para cada molaridade). O fluxo foi mantido em  $0,25\text{mL min}^{-1}$  e foi coletado 1mL por tubo.

#### **4.5.3. Concentração e Cromatografia de filtração em gel – Sephacryl S-100**

As frações com atividade enzimática PG, obtidas na cromatografia de troca aniônica, foram reunidas e a amostra resultante foi concentrada através de centrifugação a 2.500g em Centriprep (YM-10 - 10,000 MWCO).

O concentrado com NaCl 150mM foi aplicado em coluna (1,6 x 58cm) contendo a resina Sephacryl S-100 (GE Healthcare) equilibrada com tampão MES 20mM pH 6,5 com NaCl 150mM. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e foi coletado 1mL/tubo a um fluxo de  $0,3\text{mL min}^{-1}$ . O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280nm e a atividade enzimática PG foi determinada nas frações eluídas.

#### **4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

As amostras coletadas das etapas de cromatografia foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em tampão Tris/glicina pH 8,3, segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5min em tampão de amostra composto por Tris-HCl 0,1M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de

bromofenol a 0,001M. O gel de corrida foi preparado na concentração de 10% e o gel de empilhamento na concentração de 4% como indicado em Sambrook e Russel (2001). O marcador de massa molecular Sigma M6539 (6,5 a 180kDa) foi usado. Para a revelação do gel foi utilizado o método com nitrato de prata de acordo com Blum e colaboradores (1987).

#### **4.7. Focalização isoeétrica**

A enzima purificada foi submetida à eletroforese bidimensional para determinação do ponto isoeétrico de acordo com Gygi e colaboradores (2000). A focalização isoeétrica (IEF), usando Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing system (Amersham), foi conduzida em tiras contendo gradiente imobilizado de pH linear 3,0 a 10,0 em gel de poliacrilamida a 10% (14cm x 15cm) contendo 0,5% de Pharmalyte (GE Healthcare). Após a IEF, as tiras foram submetidas à segunda dimensão em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). O gel foi corado com nitrato de prata para revelar proteína.

#### **4.8. Caracterização da PG purificada**

##### **4.8.1. Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima**

O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando-se a amostra enzimática e substrato (1% de pectina de citrus da Sigma D.E 10%) em tampões: ácido acético-NaOH pH 4,0 -5,5; MES pH 5,5 – 7,0; HEPES pH 7,0 – 8,0; TAPS pH 8,0 – 9,0 e glicina-NaOH pH 9,0 – 10,0, sendo dosada a atividade a 55°C .

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado em tampão acetato usando o mesmo substrato com 26% de esterificação (D.E), incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 10°C e de 30 a 70°C no pH determinado como ótimo.

#### **4.8.2. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura**

A enzima foi mantida por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 40 a 80°C. Após esse período, foram tomadas amostras para a atividade enzimática nas condições de pH e temperatura ótimos, usando pectina de citrus 26% D.E como substrato.

#### **4.8.3. Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de pH**

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pela mistura (1:1 v/v) da solução enzimática em 0,1M dos mesmos tampões usados para atividade ótima (pH 4,0-10,0) e mantendo essas soluções, sem substrato, por 24h a 27°C (temperatura ambiente, para avaliar apenas a influência do pH e não da temperatura). Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos, usando pectina de citrus 26% D.E como substrato.

#### **4.8.4. Determinação do efeito de íons metal e reagentes sobre a atividade da enzima**

O efeito de vários reagentes na atividade da PG foi determinado pela incubação da enzima com as diferentes soluções:  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , Trealose, Triton X-100, Tween 20, Tween 80,  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA, Glicerol e SDS de modo que as concentrações finais, na mistura de reação, foram as indicadas na tabela de resultados. Após 5min de incubação a temperatura ambiente, a atividade residual das enzimas foi medida no pH e temperatura ótimos, usando pectina de citrus 26% D.E como substrato.

#### **4.8.5. Determinação da especificidade ao substrato**

As amostras enzimáticas purificada e bruta foram incubadas frente à pectina de citrus de alta e baixa esterificação, 92% e 26% de esterificação (Sigma), respectivamente, pectina de maçã (87% D.E., Sigma) e ácido poligalacturônico (Sigma) como substratos no pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática.

#### 4.8.6. Identificação dos produtos de hidrólise

Para a análise dos produtos de hidrólise 0,1mL de enzima foram adicionados a 0,4mL de tampão acetato 0,2M pH 5,5 contendo pectina de citrus da Sigma 1% (92% D.E.). A hidrólise ocorreu a 55°C por 10, 30 e 60min. Após esses intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas e fervidas a fim de parar a reação. Foram aplicados, em cromatografia de papel (Whatman N°1), 25µL de cada alíquota e 5 µL dos ácidos mono, di e trigalacturônico da Sigma como padrões. A cromatografia de papel foi realizada pelo método descendente usando como solvente para a fase móvel n-butanol (Merck)/ácido acético (Dinâmica)/água (5:3:2 por volume). Para a revelação foi utilizado nitrato de prata (Across organics) em 0,5mL de água até saturação, sendo esta solução transferida para 300mL de acetona (J.T.Baker) com posterior acréscimo de água até dissolução do precipitado formado. Em seguida realiza-se as lavagens, primeiramente com NaOH (Synth) alcoólico 0,5N - 4g em 200mL de etanol (J.T.Baker), depois com tiosulfato de sódio 0,4N.

#### 4.8.7. Determinação do $K_m$ e $V_{máx}$ .

As constantes cinéticas foram determinadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934). Foi construído um gráfico baseado na atividade da enzima medida com pectina de citrus da Sigma 92% D.E., como substrato, nas concentrações entre 2,0 e 19,0 mg mL<sup>-1</sup>, em pH e temperatura ótimos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos substratos para a produção de pectinase por *Rhizomucor pusillus* A 13.36 utilizando fermentação em estado sólido foi feita com base em pesquisas buscando não só uma boa produção da enzima como também um extrato enzimático claro para minimizar possíveis problemas com pigmentos nas resinas cromatográficas.

Analisando a tabela 6 (GRAMINHA – dados não publicados) observou-se uma excelente produção de pectinase de 22,64U/g utilizando farelo de amendoim. Entretanto, para obter essa produção foi necessário um tempo demasiado longo de fermentação, o que não é interessante para posterior purificação, pois o fungo pode produzir uma maior diversidade de enzimas, inclusive proteases. Além disso, segundo Graminha, a cor do extrato enzimático bruto obtido através de fermentação em farelo de amendoim foi demasiado escura, o que também não é interessante para a purificação, pois os métodos conhecidos de clareamento como caulin, carvão vegetal, celite, acetona e álcool, entre outros, nem sempre funcionam (presença de ligação covalente) e os pigmentos podem se ligar de maneira irreversível às resinas cromatográficas impossibilitando a purificação. A produção de pectinase utilizando os substratos casca de soja e casca de arroz foi muito baixa, com exceção da produção com casca de soja obtida em 216hs que foi igual a 21,92U/g, entretanto, como já discutido, é um tempo longo demais. Já a excelente produção de pectinase com farelo de algodão e o sabugo de milho foi de 19,60U/g e 18,72U/g, respectivamente, em um tempo curto de fermentação (72hs), o que economiza tempo de cultivo e agiliza os experimentos, e as cores dos extratos enzimáticos obtidos foram claras. A melhor produção de pectinase utilizando farelo de trigo ocorreu em 168hs (19,52U/g) e foi igual à produção obtida com farelo de algodão em 72hs (19,60U/g). Entretanto, em tempos menores de fermentação a produção de pectinase com este substrato não diminuiu muito.

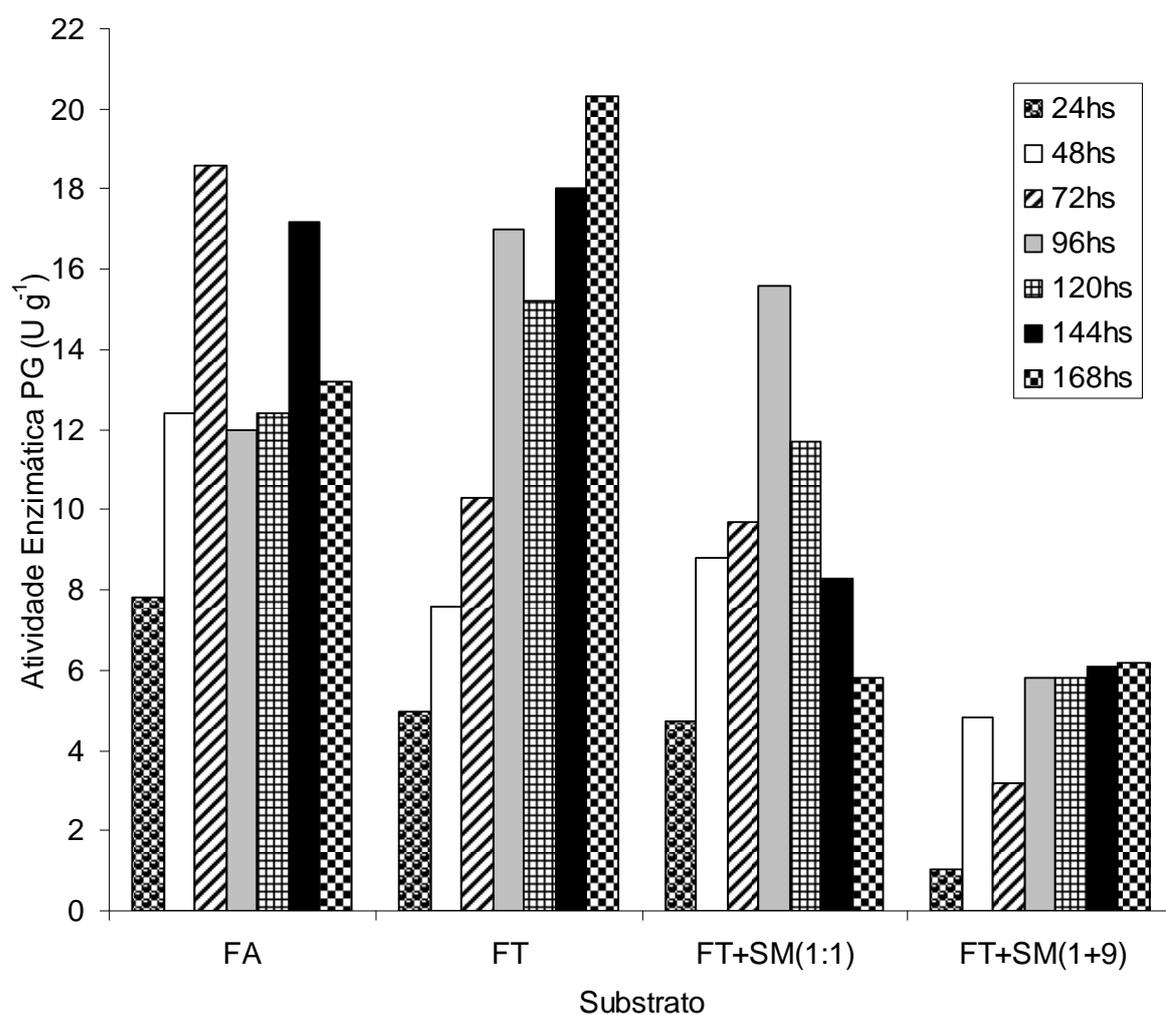
Com base nesta análise foram escolhidos farelo de algodão, farelo de trigo e sabugo de milho para serem testados (Figura 4).

**Tabela 6:** Produção de pectinase (U/g) por *Rhizomucor pusillus* A 13.36 em FES

Horas	Farelo de amendoim	Farelo de trigo	Farelo de algodão	Sabugo de milho	Casca de soja	Casca de arroz
24	0	6,80	7,76	2,08	4,56	0
72	14,24	13,28	19,60	18,72	4,72	3,60
120	7,92	17,76	12,40	8,24	7,84	9,44
168	22,64	19,52	7,36	16,80	7,04	0
216	7,20	8,08	0	2,80	21,92	6,56

O extrato enzimático bruto obtido através de fermentação em farelo de trigo durante 168hs apresentou excelente atividade enzimática PG, entretanto com um período de fermentação prolongado e uma cor mais escura que a obtida com o farelo de algodão (Figura 4). Já o extrato enzimático bruto obtido através de fermentação em farelo de algodão durante 72hs apresentou também uma alta atividade enzimática PG, uma cor clara e a vantagem de ser obtido com apenas três dias de cultivo, sendo escolhido para dar continuidade ao processo de purificação. As características deste extrato, denominado PG bruta, foram analisadas e serão demonstradas paralelamente às da amostra enzimática depois de purificada (PG purificada) para melhor comparação (Figuras 9 a 12 e Tabela 7).

Monteiro (2008) relatou que o fungo *R. pusillus* produziu poligalacturonase a partir das 72h, atingindo um pico de produção de 16, 3U g<sup>-1</sup> com 144h de fermentação utilizando farelo de trigo. Os resultados apresentados aqui mostram uma produção similar de 18U g<sup>-1</sup> com o mesmo tempo (144hs) de fermentação utilizando farelo de trigo (Figura 4).



**Figura 4:** Produção de PG por *Rhizomucor pusillus* A 13.36 utilizando fermentação em estado sólido com Farelo de Algodão, Farelo de Trigo e misturas de Farelo de Trigo e Sabugo de Milho.

FA: 100% Farelo de Algodão

FT: 100% Farelo de Trigo

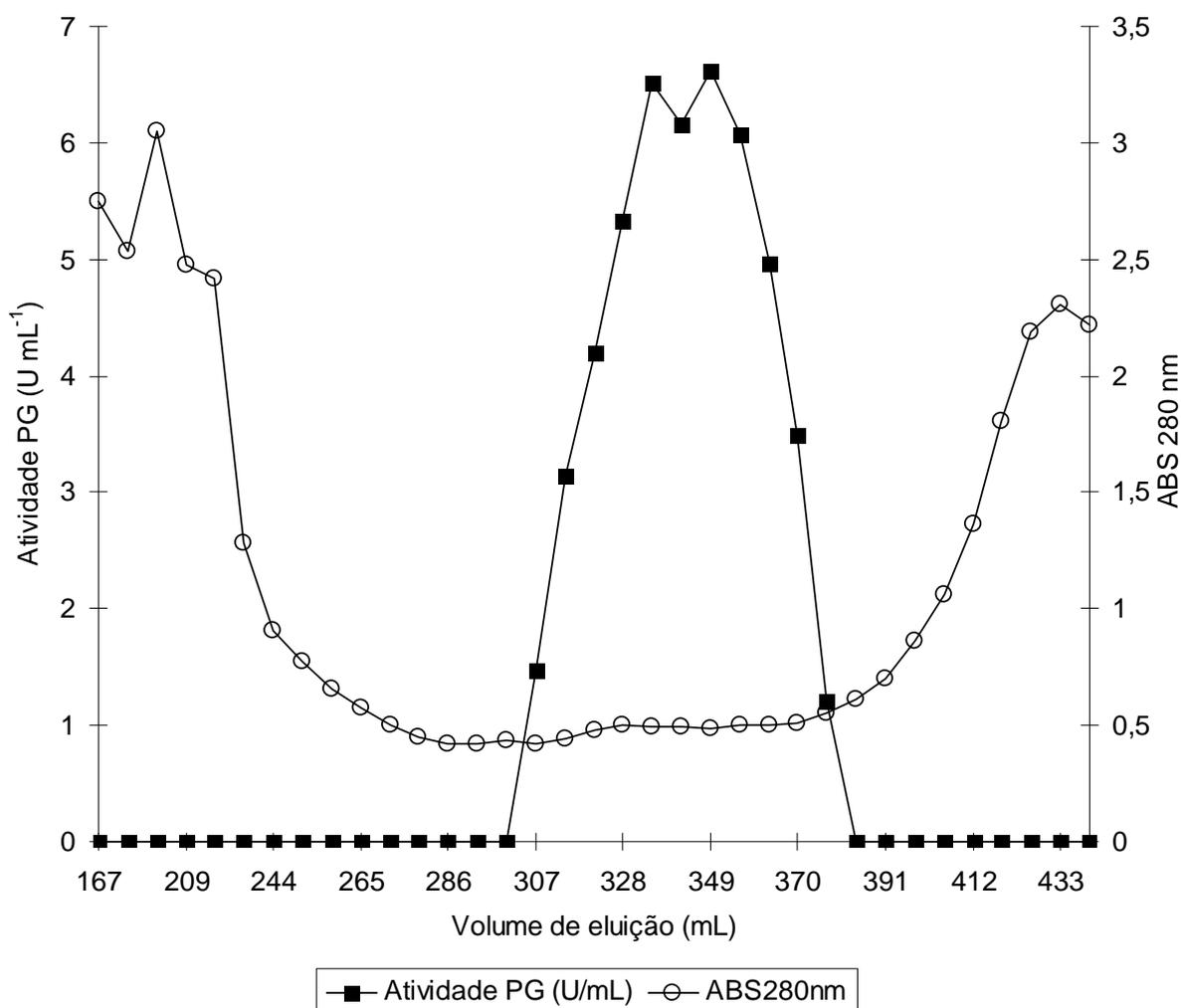
FT+SM (1:1): 50% Farelo de Trigo + 50% Sabugo de Milho

FT+ SM (1:9): 10% Farelo de Trigo + 90% Sabugo de Milho.

Maller (2008) encontrou os seguintes valores para a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niveus* em meio substrato sólido (composto por 2g de fonte de carbono acrescido de 4mL de água destilada, por 168hs a 40°C) utilizando como fonte de carbono: pectina SIGMA (1020U totais), pectina 8003 CP Kelco Brasil S/A (840U totais), casca de limão-tahiti (1324U totais), casca de laranja-pera (495U totais), casca de maracujá (960U totais), farelo de trigo (407U totais), sabugo de milho (416U totais), bagaço de cana (272U totais) e palha de arroz (318U totais). As fontes que mais se destacaram como indutores da produção de poligalacturonases em meio substrato sólido foram a casca de limão-tahiti, a pectina SIGMA e depois a casca de maracujá. A pectina é um bom indutor para a produção de pectinases. Entretanto, o setor industrial necessita de substratos mais baratos e que tenham uma boa indução para a produção de enzimas. Neste caso, a utilização de resíduos como fonte de carbono pelas indústrias seria muito útil, uma vez que seu aproveitamento atuaria reduzindo custos e também agregaria valor a estes restos orgânicos, trazendo benefícios ao meio ambiente e ao empresário (MALLER, 2008).

Um volume de 6,4 mL da solução enzimática bruta obtida após 72hs de FES utilizando farelo de algodão, em seguida dialisada e concentrada por liofilização, foi aplicado em uma coluna de filtração em gel Sephadex G-150. A eluição resultou em dois picos de atividade enzimática (Figura 5).

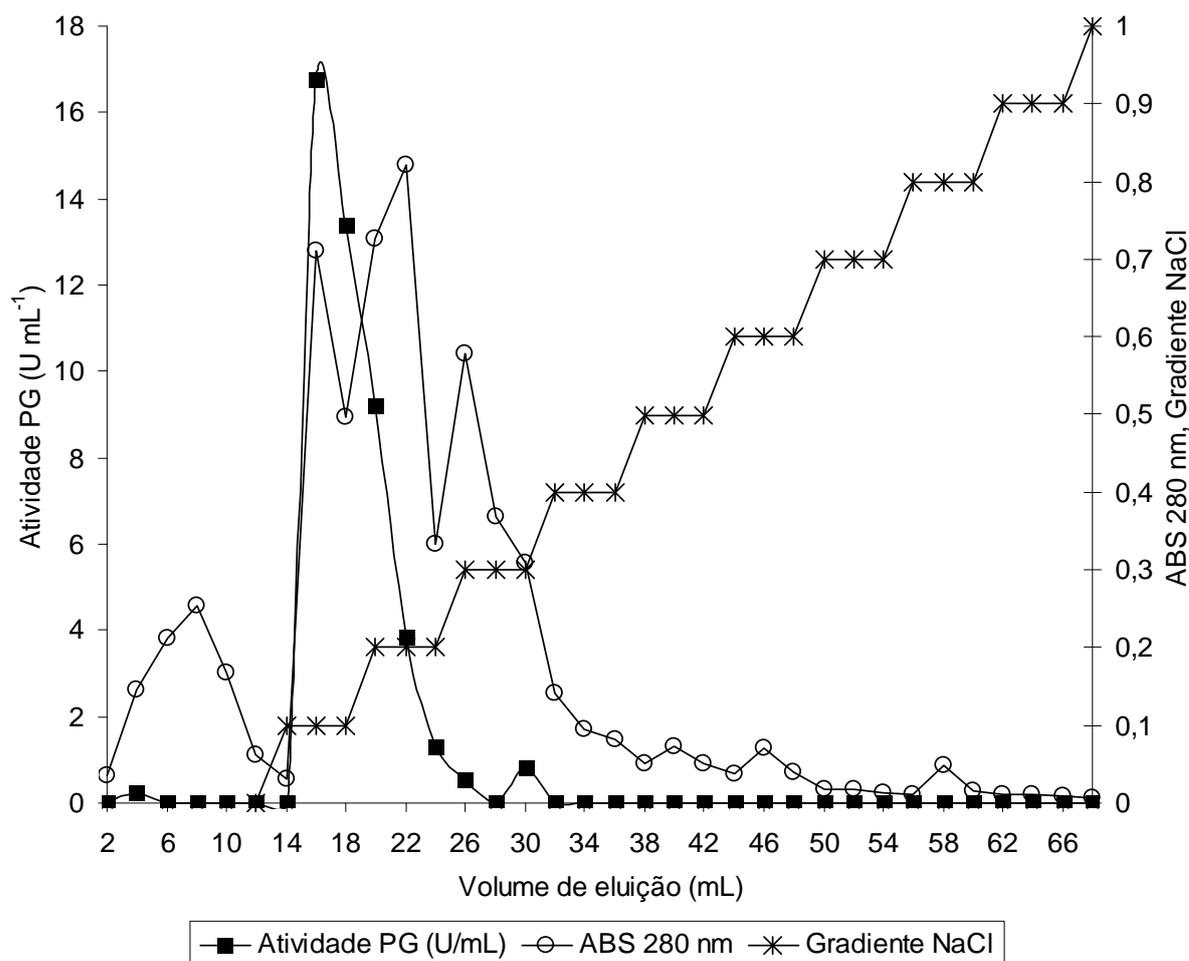
Neste processo cromatográfico (Figura 5) pode-se notar pelo acompanhamento da absorbância a 280nm a presença de dois picos bem separados. O primeiro pico possui um aspecto leitoso e o segundo é extremamente pigmentado. Justamente no intervalo destes picos surgiram os picos de atividade enzimática. Esta cromatografia inicial já separou totalmente os pigmentos contidos no extrato enzimático bruto da atividade enzimática PG e obteve uma excelente recuperação de 91% (Tabela 7).



**Figura 5:** Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Sephadex G-150 previamente equilibrada com 30mM de tampão MES em pH 6,5.

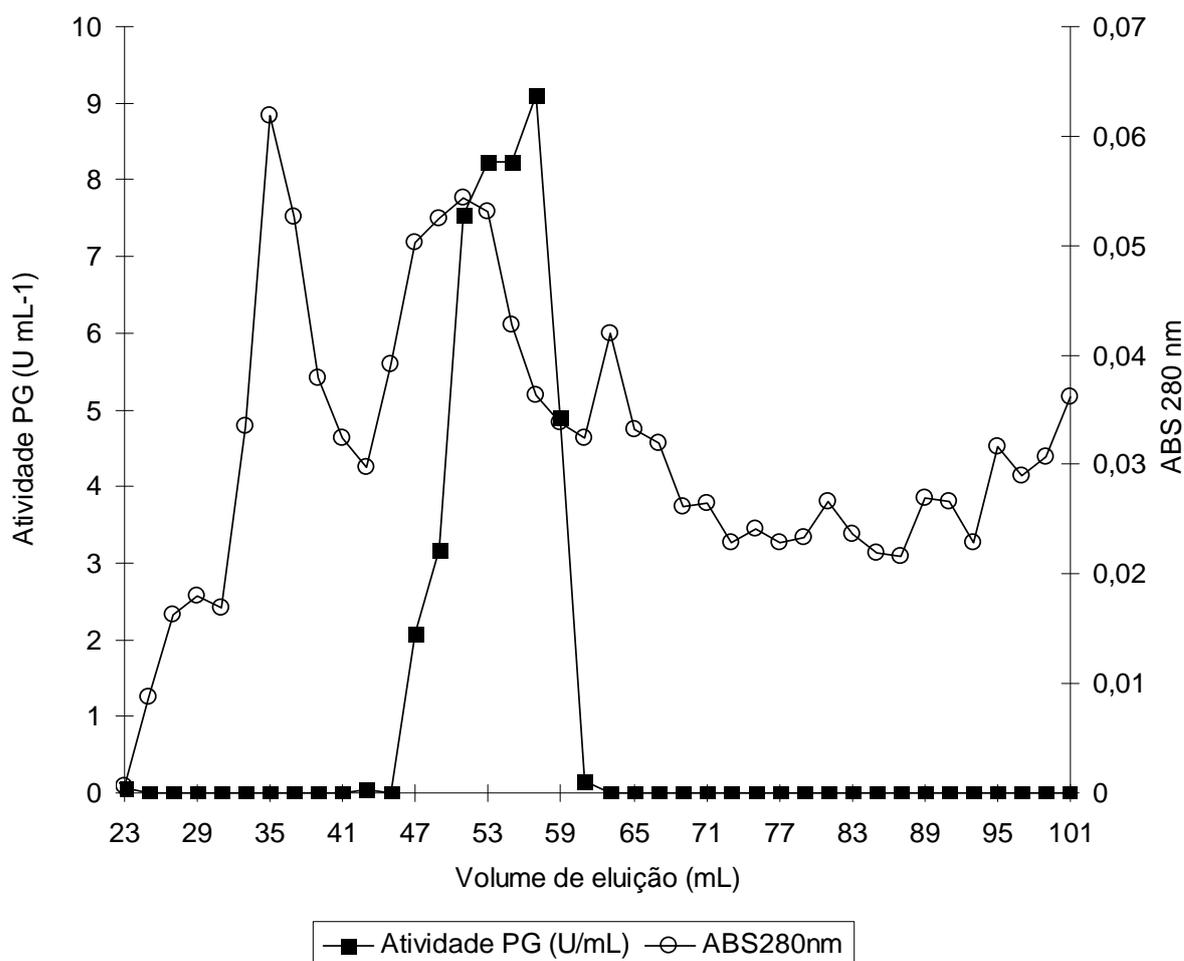
As frações obtidas da Sephadex G-150, apresentando atividade enzimática PG, correspondentes ao volume de eluição 321 a 367, foram reunidas resultando em 45,5mL que foram concentrados por ultrafiltração. Desse concentrado 7,5mL foram aplicados na coluna de troca aniônica Q-sepharose.

A PG foi retida na coluna de troca aniônica e coletada pela eluição com gradiente de NaCl (Figura 6). Pode-se observar que foi eluído apenas um pico de atividade enzimática em 0,1M do gradiente salino. A enzima foi purificada 45,6 vezes com um rendimento de 8,8% e uma atividade específica de 123,2U/mg (Tabela 7).



**Figura 6:** Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Q-Sepharose previamente equilibrada com 30mM de tampão MES em pH 6,5 com gradiente de NaCl (0-1M).

Para dar continuidade ao processo de purificação, as frações obtidas da cromatografia em Q-Sepharose, com atividade enzimática PG, correspondente ao volume de eluição 16 a 19, foram reunidas (2,75mL) e concentradas por centrifugação em centripep resultando em um volume de 750 $\mu$ L que foi aplicado em coluna cromatográfica Sephacryl S-100 (Figura 7). Novamente, pode-se observar a eluição de apenas um pico de atividade enzimática, cujas frações foram submetidas à SDS-PAGE para verificar o grau de pureza (Figura 8). Como pode ser confirmado pela figura 7 a PG foi eluída completamente purificada da coluna Sephacryl S-100.



**Figura 7:** Perfil de eluição de PGs da coluna cromatográfica Sephacryl S-100 previamente equilibrada com 20mM de tampão MES em pH 6,5 com 150mM de NaCl.

A purificação da PG produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36 foi obtida em 6 etapas de purificação sendo liofilização, filtração em gel, ultrafiltração, troca iônica e uma concentração por centripep antes da última filtração em gel.

Analisando a tabela 7 pode-se observar que a ultrafiltração pode ser considerada como uma etapa de purificação com um fator de purificação de 45,5 vezes enquanto o da etapa anterior foi de 31,7 vezes.

A etapa de purificação utilizando a cromatografia em coluna de Q-sepharose, apesar de ter apresentado uma baixa recuperação e um fator de purificação igual ao da etapa anterior foi considerada importante, pois promoveu uma grande separação

de outras proteínas, tornando possível a purificação da PG na próxima cromatografia (Tabela 7).

O processo de purificação pode ter retirado do meio algum componente como, proteína, carboidrato, íon, entre outros, que exercia efeito inibitório sobre a PG. Isto explicaria o aumento de unidade total na amostra purificada da Sephacryl S-100. O aumento na unidade total para 89,64U ocorreu após cromatografia em coluna Sephacryl S-100 na presença de NaCl 150mM, o que poderia ter liberado componentes inibitórios (Tabela 7).

A atividade específica alta, 1080U/mg, encontrada para a amostra obtida da Sephacryl S-100 é reflexo de uma amostra totalmente pura cuja proteína, em mg/mL, foi naturalmente baixa (Tabela 7).

O fator de purificação elevado encontrado para a amostra obtida da Sephacryl S-100 justifica-se pela atividade específica alta que foi base para cálculo desse fator. (Tabela 7)

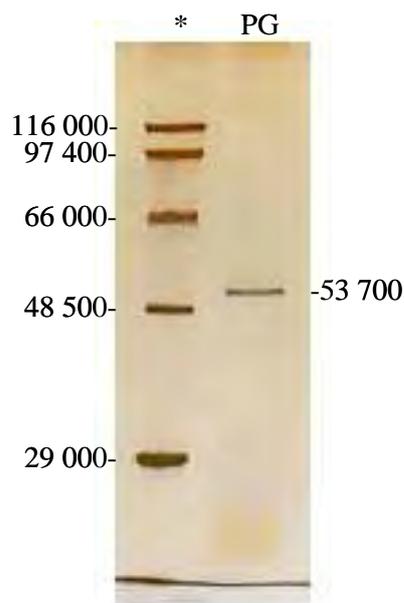
Outros trabalhos da literatura apresentam também valores altos. Jacob e colaboradores (2008) purificaram uma poligalacturonase, produzida por *Streptomyces lydicus*, através de ultrafiltração e uma combinação de procedimentos cromatográficos de troca iônica e filtração em gel, obtendo uma atividade específica de 504,8U/mg, fator de purificação de 54,9 e um rendimento de 57,1%. Martins e colaboradores (2007) obtiveram a purificação de uma poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, através de gel filtração e cromatografia de troca iônica, com atividade específica de 7843U/mg, fator de purificação de 21,0 e rendimento de 24,6%. Uma poligalacturonase do fungo *Aspergillus kawachii* foi purificada, por Esquivel e Voget (2004), mais do que 400 vezes com um rendimento final de 40% e uma atividade específica de 430U/mg, utilizando 5 etapas de purificação.

**Tabela 7:** Síntese dos dados do processo de purificação da PG produzida por *R. pusillus* A 13.36 sob FES.

	V(mL)	Proteína (mg/mL)	Prot. total (mg)	U/mL	U total	Atividade específ. (U/mg proteína)	Fat. purif.	Recup (%)
Liofilizado	6,4	15,4	98,56	41,4	264,96	2,7	1	100
Sephadex G-150	45,5	0,062	2,82	5,3	241,1	85,5	31,7	91,0
Ultrafiltração	7,5	0,20	1,5	24,6	184,5	123	45,5	69,6
Q-sepharose	2,75	0,069	0,19	8,5	23,4	123,2	45,6	8,8
Sephacryl S-100	8,3	0,010	0,083	10,8	89,64	1080	400	33,8

Análises realizadas por eletroforese (SDS-PAGE) após a conclusão dos processos cromatográficos, possibilitaram a observação de uma única banda protéica demonstrando que uma PG foi purificada. A enzima apresentou massa molecular de 53700Da (Figura 8). Este valor está de acordo com os relatados por Jayani e colaboradores (2005) para a massa molecular de diferentes poligalacturanases na faixa de 35000 a 79000Da. A homogeneidade da PG de *R. pusillus* A 13.36 foi confirmada pela focalização isoeétrica, a qual revelou uma única banda cujo ponto isoeétrico ( $pI$ ) foi 3,8 (Figura não apresentada) e este valor foi similar aos citados para o  $pI$  de poligalacturonases variando de 3,3 a 8,5 (JAYANI et al, 2005).

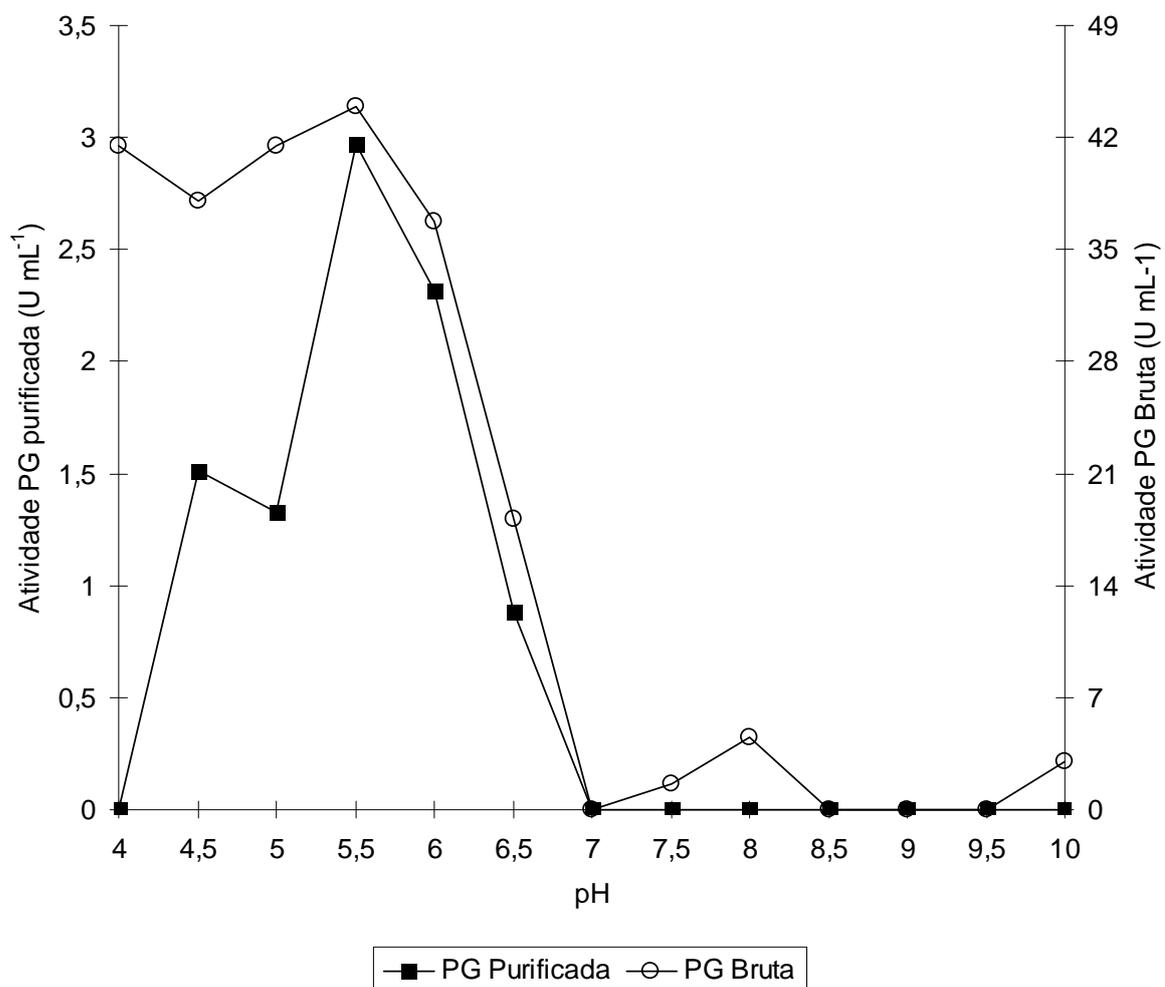
O fato da PG não ter saído no “void” da Sephacryl S-100 (Figura 7) indica sua natureza monomérica, o que foi confirmado pela massa molecular de 53700Da obtida por SDS-PAGE (Figura 8). A Sephacryl S-100 fraciona proteínas na faixa de 100 a 100000Da. Se a proteína fosse dimérica ela teria uma massa molecular duas vezes maior e teria saído no void da Sephacryl S-100.



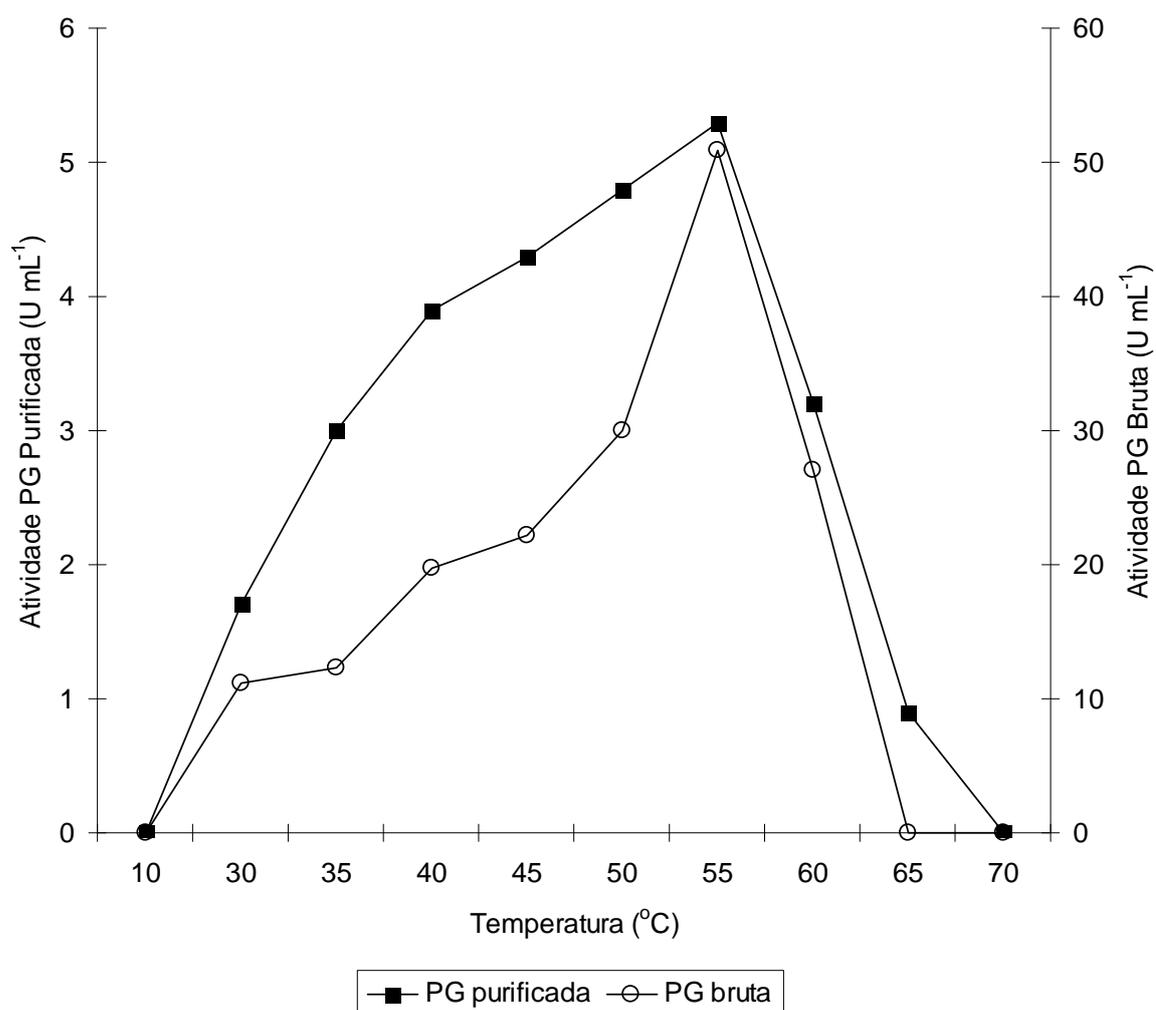
**Figura 8:** SDS-PAGE da PG produzida por *R. pusillus* A 13.36 sob FES. \*: Marcador molecular (SIGMA) em Daltons (Da).

A inativação e a estabilidade das enzimas são consideradas as maiores restrições ao rápido desenvolvimento dos processos biotecnológicos. Estudos de estabilidade fornecem informações importantes sobre a estrutura e a função das enzimas. Dois pontos importantes a se considerar ao selecionar pectinases para aplicações industriais são a estabilidade e a manutenção do nível desejado de atividade por um longo período. A estabilidade de pectinases é afetada por parâmetros físicos (pH e temperatura) e parâmetros químicos (inibidores e estimuladores) (GUMMADI e PANDA, 2003).

Para ambas as PGs, purificada e bruta, de *R. pusillus* A 13.36 o pH ótimo foi 5,5 e a temperatura ótima foi 55°C (Figuras 9 e 10). Estes resultados estão de acordo com a literatura onde a maior parte das poligalacturonases fúngicas possui pH ótimo na faixa ácida e temperaturas ótimas na faixa de 30 a 69°C (JAYANI et al, 2005). Nossos resultados são similares aos de Monteiro (2008) que relatou que a poligalacturonase do fungo *R. pusillus* apresentou atividade máxima em pH 5,0 e em temperaturas de 50 a 60°C, com atividade ligeiramente maior a 60°C. A diferença pode ser explicada pela utilização de um substrato diferente, o farelo de trigo, durante a fermentação e pelo tempo requerido para a mesma, 6 dias, que também não foi igual. Com um tempo maior de fermentação o fungo pode produzir enzimas diferentes e isoformas. Foda e colaboradores (1984) obtiveram máxima atividade da poligalacturonase de *R. pusillus* a 60°C. Martins e colaboradores (2007) obtiveram um pH ótimo de 5,5 e uma temperatura ótima de 65°C para a poligalacturonase purificada a partir de *Thermoascus aurantiacus*. Para duas poligalacturonases de *Sclerotium rolfsii*, Schnitzhofer e colaboradores (2007) encontraram como pH ótimo 5,0 e 4,5 e como temperatura ótima 60°C e 55°C. A poligalacturonase produzida por *Aspergillus* sp N12 (*A. fumigatus*) possui pH e temperatura ótimos 5,5 e 50°C (FREITAS et al, 2006). Phutela e colaboradores (2005) estudaram uma poligalacturonase produzida por *Aspergillus fumigatus* cuja atividade máxima foi em pH 5,0 e a 50°C. A poligalacturonase produzida por *Sporotrichum thermophile* Apinis foi otimamente ativa em pH 7,0 e a 55°C (KAUR et al, 2004). Kumar e Palanivelu (1999) encontraram para a poligalacturonase purificada do fungo *Thermomyces lanuginosus*, pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 60°C.



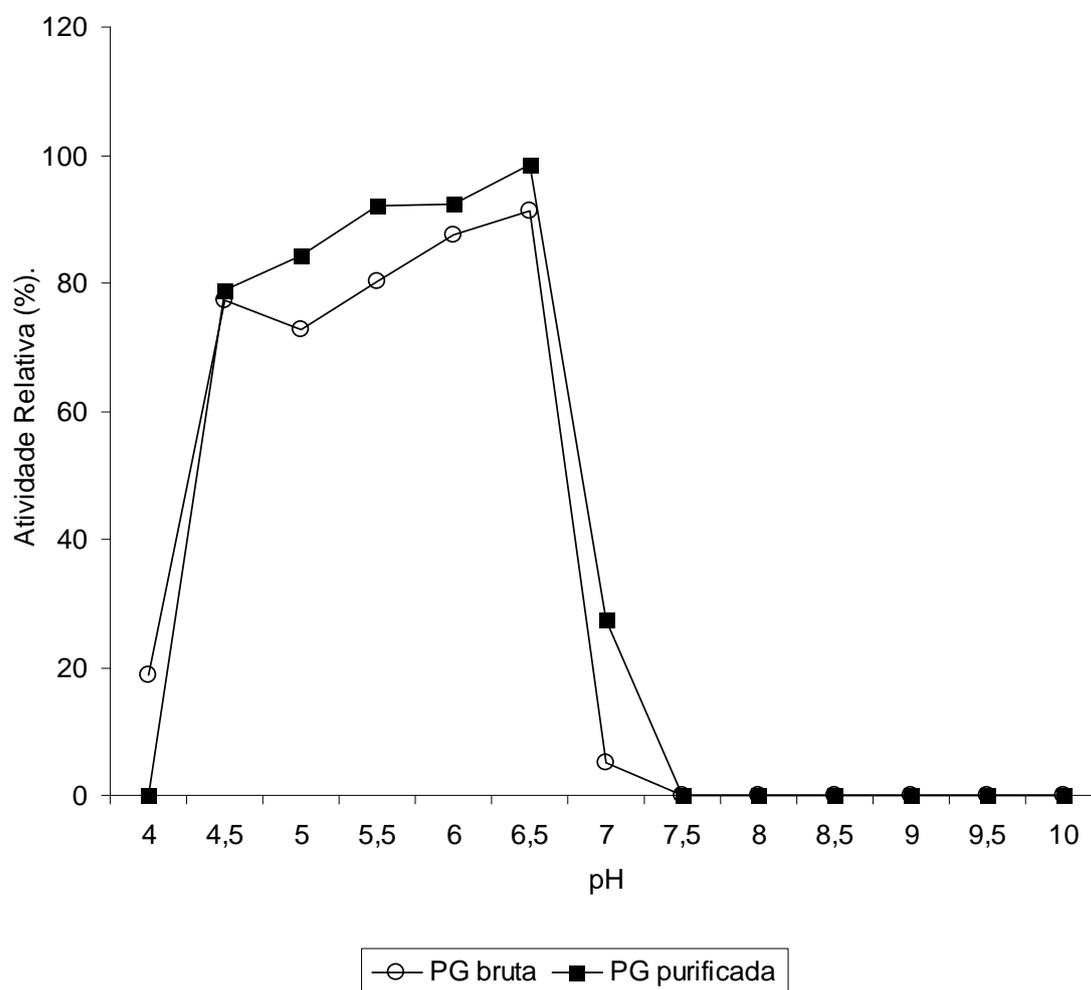
**Figura 9:** Efeito do pH sobre a atividade da PG produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36. Tampões utilizados: Ácido Acético-NaOH pH 4,0 -5,5; MES pH 5,5 – 7,0; HEPES pH 7,0 – 8,0; TAPS pH 8,0 – 9,0; Glicina-NaOH pH 9,0 – 10,0.



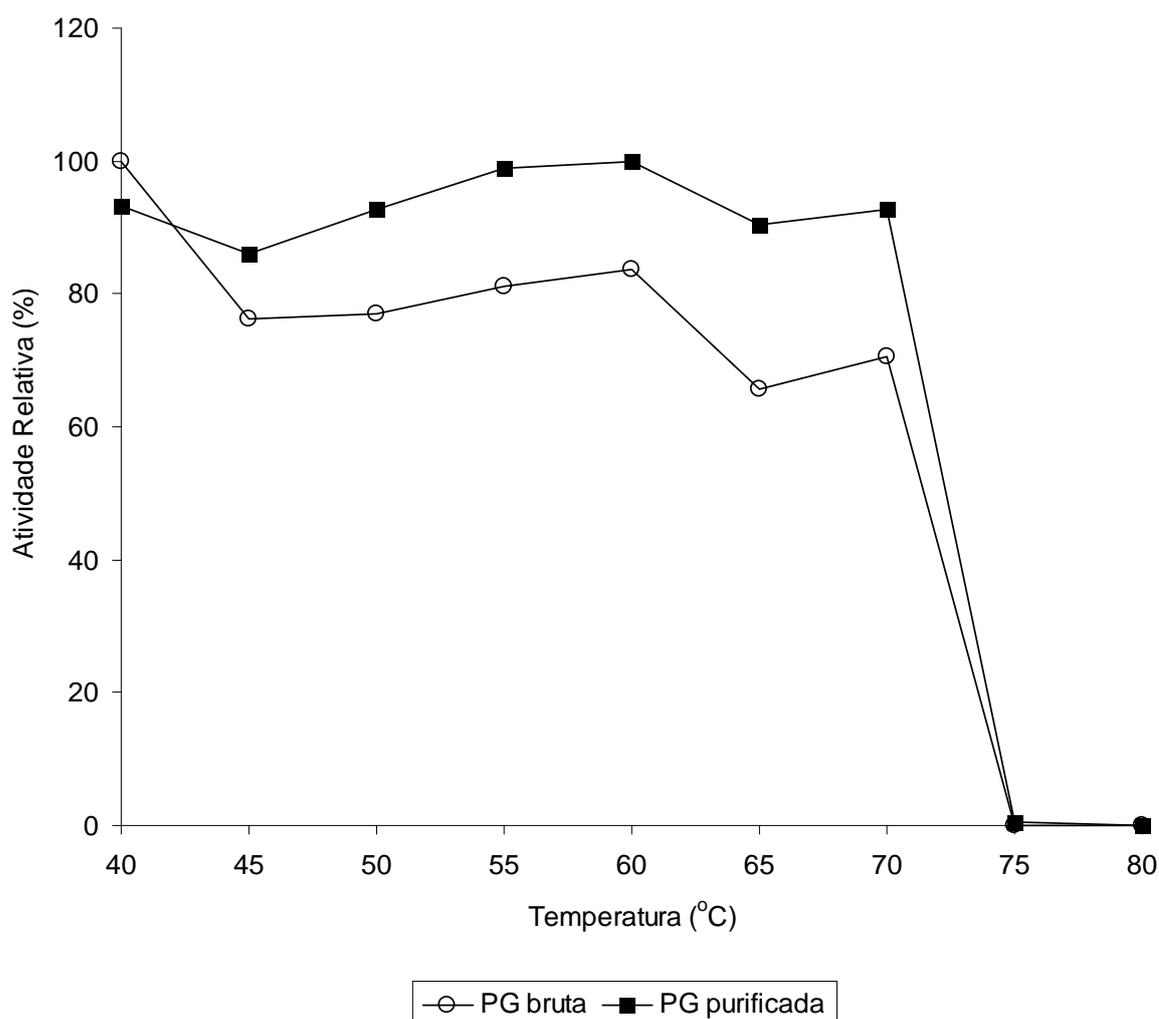
**Figura 10:** Efeito da temperatura sobre a atividade da PG produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36.

A PG purificada de *R. pusillus* A 13.36 foi estável por 1h na faixa de pH de 4,5 a 6,5 com uma atividade residual na faixa de 80 a 100% (Figura 11). Este resultado pode ser comparado ao obtido por Monteiro (2008) para a poligalacturonase produzida por *R. pusillus* em 6 dias de FES, cuja estabilidade da enzima foi superior a 80% em pH 3,0 a 8,5. Jacob e colaboradores (2008) relatam que, para a poligalacturonase purificada de *Streptomyces lydicus*, a faixa de estabilidade ao pH foi de 4,0 a 7,0. A PG bruta também apresentou estabilidade na faixa de pH entre 4,5 e 6,5 com uma atividade residual de 91,3% no pH 6,5 (Figura 11). Durante a purificação optamos por utilizar o pH 6,5 nos tampões por ser o pH em que a enzima demonstrou ser mais estável (Figura 11). A estabilidade ao pH das poligalacturonases pode variar de 2,5 a 12 (JAYANI et al, 2005).

Tanto a PG purificada quanto a bruta exibiram termoestabilidade até 70°C. Para a PG purificada a atividade residual ficou em 100% em 55-60°C e para a PG bruta ficou em 80% nas mesmas temperaturas. Geralmente, a enzima bruta apresenta uma estabilidade maior que a purificada. Entretanto, os resultados demonstraram uma estabilidade maior da enzima purificada, que pode ter acontecido devido à retirada de inibidores no processo de purificação. A 75°C as enzimas perderam completamente a atividade (Figura 12). Para uma poligalacturonase de *Sclerotium rolfsii*, Schnitzhofer e colaboradores (2007) encontraram um pH de 6,5 para as temperaturas de 50 e 70°C com meia-vida de 80 e 20min, respectivamente. A estabilidade à temperatura das poligalacturonases pode variar até 75°C (JAYANI et al, 2005). Apesar de estar dentro da faixa referida pela literatura, os dados encontrados por Monteiro (2008) para as poligalacturonases de *R. pusillus* diferem dos resultados discutidos aqui. Com relação a termoestabilidade em ausência de substrato, as poligalacturonases foram estáveis somente até 40°C, preservando 80% da atividade original (MONTEIRO, 2008).



**Figura 11:** Efeito do pH sobre a estabilidade da PG produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36. Tampões utilizados: Ácido Acético-NaOH pH 4,0 -5,5; MES pH 5,5 – 7,0; HEPES pH 7,0 – 8,0; TAPS pH 8,0 – 9,0; Glicina-NaOH pH 9,0 – 10,0.



**Figura 12:** Efeito da temperatura sobre a estabilidade da PG produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36.

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  inibiu totalmente a atividade da PG purificada e provocou 70% de inibição da atividade da PG bruta (Tabela 8). Cabanne e Donèche (2002) estudaram a inibição por íons cálcio da atividade da poligalacturonase de *Botrytis cinerea*. Eles chegaram à conclusão que o cálcio atua como um inibidor competitivo ocupando os sítios que o ácido poligalacturônico normalmente se ligaria à poligalacturonase.

Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  provocaram inibição total na atividade da PG purificada e inibiram 30% e 40%, respectivamente, da atividade da PG bruta. Já o  $\text{Mn}^{2+}$  inibiu apenas a PG purificada em 60%, não apresentando efeito na atividade da PG bruta (Tabela 8). Silva e colaboradores (2007) encontraram uma inibição por íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  de 92% da atividade da poligalacturonase purificada a partir de

*Penicillium viridicatum*. Os íons  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , e  $Zn^{2+}$  inibiram 100, 75 e 50%, respectivamente da atividade da poligalacturonase purificada a partir de *Thermoascus aurantiacus* (MARTINS et al, 2007). A inibição por agentes bloqueadores do grupo tiol, tais como  $Hg^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  mostra o envolvimento desse grupo no sítio ativo da enzima (MACIEIRA et al, 1997; VIEILLE e ZEIKUS, 2001; MARTINS et al, 2007; SILVA et al, 2007). Apesar do SDS inibir em apenas 15% a atividade da PG purificada, causou uma inibição de 35% na atividade da PG bruta (Tabela 8). Foi relatada uma inibição total por SDS da atividade da poligalacturonase purificada de *Streptomyces lydicus* (JACOB et al, 2008). O íon  $Fe^{3+}$  inibiu 80% da atividade da PG purificada e 30% da PG bruta (Tabela 8). Uma inibição de 60% na atividade de poligalacturonase provocada por íons  $Fe^{2+}$  foi encontrada por Silva e colaboradores (2007). O íon  $Ag^+$  inibiu em cerca de 80% a atividade da PG purificada e em 94% a atividade da PG bruta (Tabela 8). O EDTA provocou uma inibição parcial da atividade o que sugere, segundo Silva e colaboradores (2007), que a atividade é cátion dependente. O  $\beta$ -mercaptoetanol teve um efeito adverso inibindo em 70% a atividade da PG purificada e estimulando em 50% a PG bruta (Tabela 8). A estimulação por  $\beta$ -mercaptoetanol é consistente com os dados de Jacob e colaboradores (2008). Os reagentes triton X-100 e tween 20 inibiram em 60 e 40%, respectivamente, a atividade da PG bruta, mas ambos causaram um estímulo de 30% na atividade da PG purificada (Tabela 8).

Vários reagentes estimularam a atividade da PG purificada numa faixa de 12 a 104% de estimulação. São estes:  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , glicerol, triton X-100, tween 20 e tween 80. Os reagentes que estimularam a atividade da PG bruta numa faixa de 37 a 53% de estimulação são  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol e trehalose. Curiosamente os reagentes que estimularam a PG purificada não são os mesmos que estimularam a PG bruta e vice-versa, com exceção do glicerol (Tabela 8). As variações observadas entre a enzima bruta e a purificada podem estar ocorrendo devido ao fato de que a enzima bruta contém vários componentes que interferem diferentemente na atividade da PG, o que já não ocorre na amostra com a presença apenas da PG purificada.

**Tabela 8:** Efeito de potenciais inibidores e estimuladores sobre a atividade da PG produzida por *R. pusillus* A 13.36.

Reagentes	Atividade Residual (%)	
	PG bruta	PG purificada
Controle	100,0	100,0
Ag <sup>+</sup> 5mM	6,1	22,5
Ba <sup>2+</sup> 5mM	85,4	95,5
Ca <sup>2+</sup> 5mM	29,6	0
Co <sup>2+</sup> 5mM	104,5	118,0
Cu <sup>2+</sup> 5 mM	64,0	0
Fe <sup>3+</sup> 5mM	69,9	18,7
Hg <sup>2+</sup> 5mM	60,0	0
Mg <sup>2+</sup> 5mM	84,0	204,1
Mn <sup>2+</sup> 5mM	103,2	39,3
Ni <sup>2+</sup> 5mM	77,0	93,6
Zn <sup>2+</sup> 5mM	97,5	78,6
Trehalose 1%	143,0	73,0
Triton X-100 0,5%	38,7	131,1
Tween 20 0,5%	61,5	136,7
Tween 80 0,5%	91,6	123,6
β-mercaptoetanol 5mM	153,7	33,7
EDTA 0,25%	65,0	72,0
Glicerol 1%	137,0	112,3
SDS 0,5%	65,2	86,1

A análise dos resultados obtidos com o experimento de especificidade ao substrato (Figura 13) mostrou que a PG purificada é uma polimetilgalacturonase. Ambas as enzimas, PGs purificada e bruta, tiveram uma maior afinidade por pectinas de alta esterificação: de citrus (92% D.E.) com 13,5U mL<sup>-1</sup>, comercial (87% D.E) com 12,5U mL<sup>-1</sup> e de maçã (87% D.E) com 9,8U mL<sup>-1</sup>. A maior atividade enzimática ocorreu utilizando a pectina de citrus com 92% de esterificação. A afinidade por pectinas de alta esterificação e a ausência de atividade quando o ácido

poligalacturônico foi usado como substrato indica que a enzima purificada é uma polimetilgalacturonase e não uma poligalacturonase.

Fogarty e Ward (1972) relatam a classificação das pectina depolimerases de acordo com o seguinte critério: a preferência por pectina ou pectato como substrato, a cisão hidrolítica ou transeliminativa das ligações glicosídicas e o mecanismo endo ou exo de ação da enzima. Segundo Fogarty e Ward (1972) a hidrolase que atua principalmente em ácidos galacturônicos altamente metilesterificados pode ser chamada de polimetilgalacturonase.

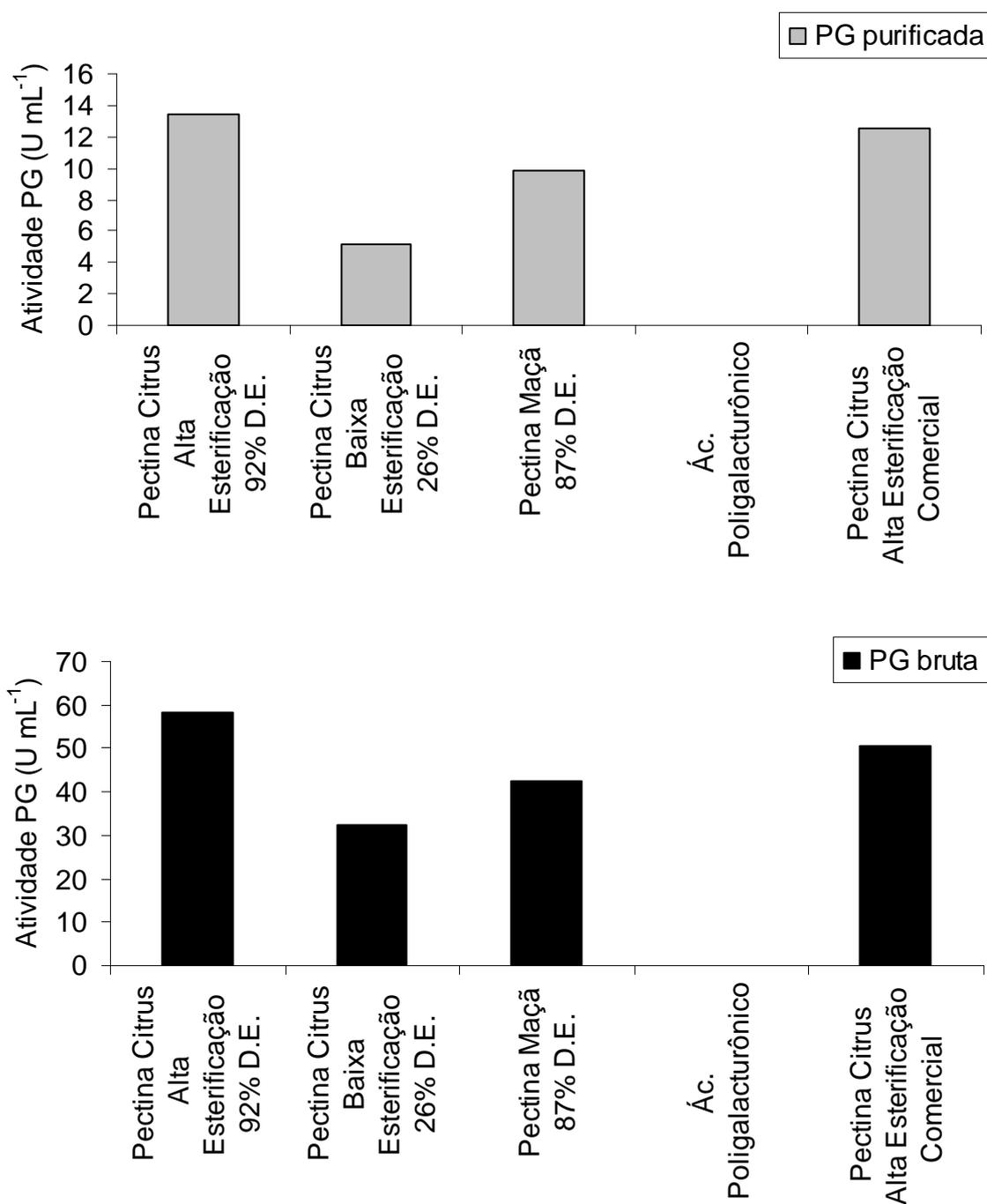
Ohtsuki e colaboradores (1995) investigaram a especificidade ao substrato de uma polimetilgalacturonase purificada do pólen do cedro japonês. Esta enzima teve atividade na pectina e nenhuma atividade no ácido poligalacturônico. A atividade da polimetilgalacturonase foi observada quando o ácido galacturônico foi metilesterificado e aumentou gradualmente à medida que o grau de metilesterificação aumentou e alcançou um máximo de 50–60% de metilesterificação.

Segundo Silva e colaboradores (2007) uma poligalacturonase foi purificada a partir de *Penicillium viridicatum*. Entretanto, com relação à especificidade ao substrato essa enzima exibiu maior atividade em pectinas de alta esterificação de maçã (87% D.E.), de citrus (92% D.E.) e de citrus comercial (87% D.E.), na ordem citada, indicando uma possível classificação dessa enzima como polimetilgalacturonase.

O ácido poligalacturônico foi o substrato pelo qual a poligalacturonase purificada de *Streptomyces lydicus* teve maior afinidade (JACOB et al, 2008).

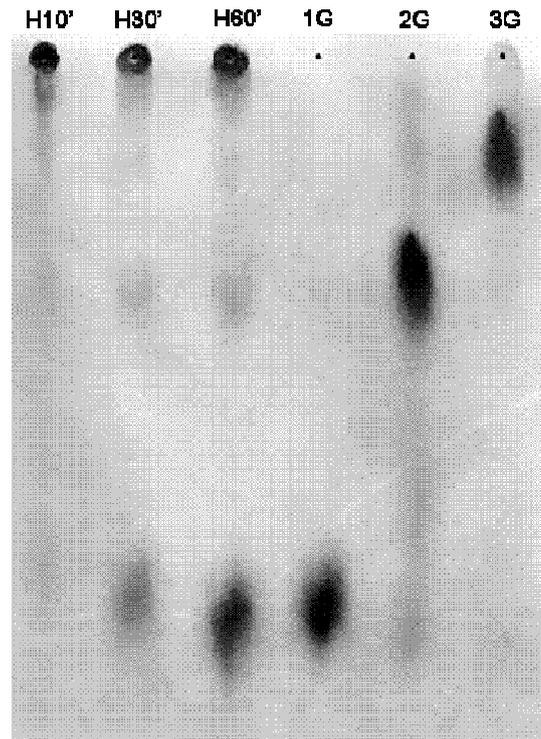
Martins e colaboradores (2007) purificaram uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus* cujo substrato que a enzima teve maior afinidade foi a pectina de citrus de baixa esterificação (26%).

A análise da especificidade ao substrato mostrou que a poligalacturonase purificada de *Aspergillus kawachii* hidrolisa melhor o ácido poligalacturônico do que a pectina parcialmente esterificada e é praticamente inativa contra a pectina de alta esterificação (92%) (ESQUIVEL e VOGET, 2004).



**Figura 13:** Especificidade ao substrato da polimetilgalacturonase produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36.

A polimetilgalacturonase purificada foi incubada por 10, 30 e 60min a 55°C com pectina de citrus 1% (92% D.E.). Observando o cromatograma (Figura 14) verifica-se que a enzima liberou ácidos monogalacturônico, digalacturônico e trigalacturônico em qualquer um dos tempos observados. Oligogalacturonatos maiores podem ser melhor observados no período inicial de incubação. O fato da enzima ter liberado monogalacturonatos e digalacturonatos no período inicial de incubação sugere que a enzima degradou o substrato por múltiplos ataques. Neste mecanismo, a enzima pode catalisar a hidrólise de várias ligações antes de se dissociar e formar um novo complexo ativo com outro polímero (ESQUIVEL e VOGET, 2004). Cook e colaboradores (1999) descreveram este mecanismo de degradação alternativo como modo de clivagem endo/exo misto da poligalacturonase. A poligalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* hidrolisou o ácido poligalacturônico e tanto os produtos iniciais como os produtos finais de hidrólise foram ácido monogalacturônico, digalacturônico e trigalacturônico indicando um modo de clivagem endo/exo misto (ENGLISH et al, 1972). Este modo misto de clivagem também foi relatado para a poligalacturonase purificada a partir de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (PIETRO e RONCERO, 1996). A poligalacturonase purificada a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 apresentou o modo de ação endo/exo misto da poligalacturonase. Esta enzima foi incubada com pectina de citrus 1% (26 D.E.) e liberou uma mistura de monômero, dímero, trimêro e oligômeros de ácido galacturônico como produtos de hidrólise depois de 5min de reação, sendo que di e monogalacturonatos foram liberados na etapa inicial do período de incubação (MARTINS et al, 2007). Não existem muitos estudos com caracterização de polimetilgalacturonases. Riou e colaboradores (1992) relataram que a polimetilgalacturonase purificada a partir de *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou o modo de ação exo liberando produtos de hidrólise de baixa massa molecular observados em cromatografia de camada delgada.



**Figura 14:** Cromatografia de papel dos produtos de hidrólise da polimetilgalacturonase purificada utilizando pectina de citrus (92% D.E.). (H10'), (H30') e (H60') são os hidrolisados com 10, 30 e 60min de incubação, respectivamente. 1G, 2G e 3G são os padrões de ácido monogalacturônico, digalacturônico e trigalacturônico, respectivamente.

O cálculo dos parâmetros cinéticos foi realizado com uma amostra de PG purificada obtida pela repetição do processo de purificação e não com a mesma amostra utilizada para o cálculo da tabela 7. Isto explica o fato do valor obtido para atividade específica (1080U/mg) não ter sido o mesmo que o obtido para a  $V_{max}$  (2379,04 $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  - Tabela 9). A pectina de alta esterificação (92%) (Sigma) foi utilizada e o ensaio foi realizado nas condições ótimas de atividade. Os valores para a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e para velocidade máxima ( $V_{max}$ ) de uma enzima são determinados pela medida das velocidades iniciais para várias concentrações de substrato.

A afinidade da polimetilgalacturonase pura por pectina de citrus de alta esterificação (92% - Sigma) foi analisada pelo gráfico duplo-recíproco de Lineweaver e Burk através do programa Origin 6,0. Os valores obtidos para  $K_m$  e velocidade máxima foram 10,78mg/mL e 2379,04 $\mu\text{molAG}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente e estão apresentados na Tabela 9. O  $K_m$  encontrado é elevado, o que reflete uma baixa

afinidade da enzima ao substrato, neste caso à pectina de alta metilação de citrus, pois uma concentração elevada de substrato é necessária para atingir uma velocidade que é  $\frac{1}{2} V_{\max}$ .

**Tabela 9:** Propriedades da polimetilgalacturonase purificada produzida por *R. pusillus A 13.36*.

$K_m$	10,78mg mL <sup>-1</sup>
$V_{\max}$	2379,04 $\mu$ molmin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
Massa Molecular (SDS-PAGE)	53,700Da
pI	3,8

Segundo Jayani e colaboradores (2005) os valores de  $K_m$  para pectinases variam de 0,059 a 4,7mg/mL, porém encontramos na literatura valores bem mais elevados que estes. Freixo e colaboradores (2008) encontraram um  $K_m$  de 13,23mg/mL para a poligalacturonase purificada de *Pleurotus ostreatus*. Lei e colaboradores (2007) encontraram para a poligalacturonase (Fluka Chemical Co.) um  $K_m$  de 8,28g/mL. Uma pectinase de *Penicillium italicum* foi purificada por Alana e colaboradores (1991) e obtiveram um  $K_m$  de 15mg/mL. Assim, deduzimos que não existe um intervalo definido onde os valores de  $K_m$  de pectinases microbianas devam ficar limitados. Estes valores são característicos para cada enzima.

## 6. CONCLUSÃO

A PG purificada foi identificada, no final deste trabalho, como uma polimetilgalacturonase devido a sua maior afinidade por pectinas de alta esterificação. Entretanto, não existem muitos relatos na literatura caracterizando polimetilgalacturonases e sim, poligalacturonases. Por esta razão, este trabalho foi baseado em estudos anteriores com produção e purificação de poligalacturonases. Isso porque as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases têm características muito similares, o que dificultou a identificação da enzima.

A purificação da polimetilgalacturonase produzida pelo fungo *R. pusillus* A 13.36 foi obtida através de procedimentos simples, apresentando temperatura e pH ótimos de 55°C e 5,5. A polimetilgalacturonase purificada exibiu termoestabilidade até 70°C com uma atividade residual de 100% a 55-60°C. Essas condições são excelentes para a utilização desta enzima no setor industrial, pois a alta temperatura é tecnicamente e economicamente interessante, pois reduz o risco de contaminação, reduz a viscosidade e aumenta a solubilidade do substrato. Entretanto, quando comparada com mesofílicos, a biomassa alcançada por organismos termofílicos é muito baixa. O baixo rendimento das células levanta problemas para a produção tanto em escala laboratorial quanto em larga escala comercial, o que dificulta estudos extensivos de suas enzimas. Apesar das dificuldades, as polimetilgalacturonases podem ser aplicadas na indústria de processamento têxtil e de fibras de celulose, na composição de detergentes, na degradação ou modificação de material vegetal, aditivo para alimentação animal e no processamento de vinhos e sucos. Uma alternativa para a redução dos custos de produção de enzimas termofílicas em escala industrial e aumento do rendimento é o uso da tecnologia do DNA recombinante. Uma grande variedade de enzimas termoestáveis foram clonadas e expressas com sucesso em organismos mesofílicos, tais como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*. Portanto, este trabalho pode dar continuidade a uma série de estudos aplicados com a polimetilgalacturonase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANA, A.; LLARNA, M.J.; SERRA, J.L. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. **FEBS Letters**, v.280, p.335-340, 1991.

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

ANTRANIKIAN, G. Microbial Degradation of Starch. In: Winkelmann, G. (ed). **Microbial Degradation of Natural Products**. UCH, Weinheim, Germany, p.27-51, 1992.

ARANDA, E.; SAMPEDRO, I.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA-ROMERA, I. Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.132-135, 2004.

BAI, Z.H.; ZHANG, H.X.; QI, H.Y.; PENG, X.W.; LI, B.J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, v.95, p.49-52, 2004.

BARON, A. & THIBAUT, J.F., **Les enzymes pectolytiques**. In: *Hydrolases et Dépolimérasés*, ed. A. Mouranche & C.Costes. Gauthier-Villars, Paris, p.143-164, 1985.

BELDMAN, G.; VAN DEN BROEK, L.A.M.; SCHOLS, H.A.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M.J.F.; VAN LAERE, K.M.J.; VORAGEN, A.G.J. **Biotechnology Letters**, v.18, p.707-712, 1996.

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v.53, p.47-53, 1997.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BOUTZ, D.R.; CASCIO, D.; WHITELEGGE, J.; PERRY, L.J.; YEATES, T.O. Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains. **Journal of Molecular Biology**, v.368, p.1332-1344, 2007.

BROCK, D.T.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 6<sup>a</sup> ed., 2001.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.90, p.155-185, 2001.

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

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

CHITRADON, L.; POONPAIROJ, P.; MAHAKHAN, P.; KITPREECHAVANICH, V.; LOTONG, N. Pectinases from *Rhizopus* sp. Efficient in enhancing the hydrolyzation of raw cassava starch: purification and characterization. **Pectin and Pectinases**, J. Visser and A.G.J. Voragen (Editors), p.715-722, 1996.

COOK, B.J.; CLAY, R.P.; BERGMANN, C.W.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.703-711, 1999.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p.291-302, 2006.

DAS, R.; GERSTEIN, M. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. **Functional Integrate Genomics**, v.1; p.76-88, 2000.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v.31(2), p.249-260, 1997.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.244-250, 2006.

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.

DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, v.45, p.78-85, 1991.

ENGLISH, P.D.; MAGLOTHIN, A.; KEEGSTRA, K. A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant physiology**, v.49, p.293-297, 1972.

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

FODA, M.S.; RIZK, I.R.S.; GIBRIEL, A.Y.; BASHA, S.I. Biochemical properties of polygalacturonase, produced by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*. **Zentralblatt fuer Mikrobiologie**, v.139, p.463-469, 1984.

FOGARTY, W.M.; WARD, O.P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. **Process Biochemistry**, v.7, p.13-17, 1972.

FREITAS, P.M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus* sp N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp N12 on solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.302-306, 2006.

FREIXO, M.R.; KARMALI, A.; ARTEIRO, J.M. Production and chromatographic behaviour of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. **Process Biochemistry**, v.43, p.531-539, 2008.

FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review Plant Physiology**, v.37, p.165-186, 1986.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.85-101, 2003.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, No.1, p.136-145, 2007.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1-22, 2008.

GRIFFIN, D.M. Water and microbial stress. **Advances in Microbial Ecology**, v.5, p.91-136, 1981.

GROMIHA, M.M.; THOMAS, S.; SANTHOSH, C. Role of cation- $\pi$  interactions to the stability of thermophilic proteins. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.32, n.4, p. 355-362, 2002.

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

GYGI, S.P.; CORTHALS, G.L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.9390-9395, 2000.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, p.17-34, 2003.

HARTREE, E.E. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.301-306, 2005.

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.

HUBER, D.J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural reviews**, v.5, p.169-219, 1983.

ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; ISHII, H.; YAMAMOTO, H. Purification of polygalacturonases produced by the pear scab pathogens, *Venturia nashicola* and *Venturia pirina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p.263-271, 2000.

JACOB, N.; POORNA, C.A.; PREMA, P.P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. **Bioresource Technology**, v.99, p.6697-6701, 2008.

JAIN, S.; DURAND, H.; TIRABY, G. Production of extracellular pectinase enzymes by a mutant (Po16) of *Penicillium occitanis*. **Applied. Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.308-312, 1990.

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

KAPOOR, M.; BEG, Q.W.; BHUSHAN, B.; DADHICH, K.S.; HOONDAL, G.S. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sun hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. **Process Biochemistry**, v.36, p.803-807, 2001.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications 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.

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. Fluctuations in ion pairs and their stabilities in proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v.43, p.433-454, 2001.

KUMAR, S.S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.643-646, 1999.

KYRIAKIDIS, N.B. Use of pectinesterase for detection of hidrocolloids addition in natural orange juice. **Food Hidrocolloids**, v.19, p.497-500, 1999.

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

LEI, Z.; BI, S.; YANG, H. Chitosan-tethered the silica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. **Food Chemistry**, v.104, p.577-584, 2007.

LI, W.F.; ZHOU, X.X.; LU, P. Structural features of Thermozyms. **Biotechnology Advances**, v.23, p.271-281, 2005.

LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.63-68, 2002.

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

MACIEIRA, F.I.G.; PIETRO, A.D.; RONCERO, I.G. Purification and characterization of novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p.37-43, 1997.

MADIGAN, M.T.; ORENT, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, n.3, p.265-269, 1999.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto.

MC NEILL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHELM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review Biochemistry**, v.53, p.625-663, 1984.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus- processing industry. **Bioresource Technology**, v.99, p.2373-2383, 2008.

MARTINS, E.S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v.37, p.949-954, 2002.

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

MAUGINI, E.; TRONELLI, D.; BOSSA, F.; PASCARELLA, S. Structural adaptation of the subunit interface of oligomeric thermophilic and hiperthermophilic enzymes. **Computational Biology and Chemistry**, v.33, p.137-148, 2009.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; GUPTA, N. Affinity precipitation of *Aspergillus niger* pectinase by microwave-treated alginate. **Protein Expression and Purification**, v.33, p.104-109, 2004.

MONTEIRO, A.C. **Produção de poligalacturonases por fungos termofílicos e mesofílicos em fermentação em estado sólido e comparação das isoformas da enzima produzidas por cada grupo.** 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T.; YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T. Purification and Characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.64, p.1729-1732, 2000.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p.375-380, 1944.

OHTSUKI, T.; TANIGUCHI, Y.; KOHNO, K.; FUKUDA, S.; USUI, M.; KURIMOTO, M. Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. **Allergy**, v.50, p.483-488, 1995.

PAIARDINI, A.; GIANESE, G.; BOSSA, F.; PASCARELLA, S. Structural plasticity of thermophilic serine hydroxymethyltransferases. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v.50, p.122-134, 2003.

PANDA, T.; NAIR, S.R.; KUMAR, M.P. Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.466-473, 2004.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.149-162, 1999.

PASHOVA, S.; SLOKOSKA, L.; KRUMOVA, E.; ANGELOVA, M. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.535-540, 1999.

PEDROLI, D.B.; MONTEIRO, A.C.; GOMES, E.; CARMONA, E.C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v.3, p.9-18, 2009.

PERÉZ, S.; MAZEAU, K.; HERVE DU PENHOAT, C. The three dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology Biochemistry**, v.38, p.37-55, 2000.

PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S.; CHADHA, B.S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.63-69, 2005.

PIETRO, A.D.; RONCERO, M.I.G. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: purification, characterization, and production during infection of tomato plants. **Biochemistry and Cell Biology**, V.86, p.1324-1330, 1996.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F.M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G.C.;BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K.J. (Ed.). **Enzymes and food processing**. London: Applied Science Publishers, p.105-128, 1981.

PILNIK, W.; VORAGEN, A.G.J. In: Hulme, A.C. (ed). **The Biochemistry of Fruits and their Products**. Academic Press, London and New York, p. 53-87, 1970.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnickÝ, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; BHAT, M.K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.355-361, 1999.

RABALHO A.A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. 2002. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

REXOVA-BENKOVA, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzymes. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v.33, p.323-385, 1976.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p.929-967, 2001.

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, No.2, p.578-583, 1992.

ROMBOULTS, F.M.; THIBAUT, J.F. **Carbohydrate Research**, v.154 p.177-187, 1986.

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

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances Applied Microbiology**, v.39, p.213-294, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DALBOIT, S.; MITCHELL, D.A.; KRIGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Biotechnology**, v.93, p.261-268, 2004.

SARABOJI, K.; GROMIHA, M.M.; PONNUSWAMY, M.N. Importance of main-chain hydrophobic free energy to the stability of thermophilic proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, p.211-220, 2005.

SATO, M.; KAJI, A. Action pattern of pectate lyase from *Streptomyces nitrosporeus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v.41, p.2199-2203, 1977.

SCHNITZHOFER, W.; WEBER, H.-J.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G.M. Purification and mechanistic characterization of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1739-1747, 2007.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.C.; DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.426-435, 2002.

SILVA, D.; MARTINS, E.S.; LEITE, R.S.R.; DA SILVA, R.; FERREIRA, V.; GOMES, E. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.42, p.1237-1243, 2007.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B.A. Thermal stability of  $\beta$ -xylanases produced by *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.502-508, 2000.

SOCCOL, R.S.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

SOLIS, S.; FLORES, M.E.; HUITRON, C. Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v.12, p.751-756, 1990.

SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.116-124, 2008.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova** [online], v.30, No.2, p.388-394, 2007.

VIDAL, S.; SALMON, J.M.; WILLIAMS, P.; PELLERIN, P. *Penicillium daleae*, a soil fungus able to degrade rhamnogalacturan II, a complex pectic polysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.283-290, 1999.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.1-43, 2001.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **TIBTECH**, v.14, p.183-190, 1996.

VIESTURS, U.F.; ASPITE, A.F.; LAUKEVIES, J.J.; OSE, V.P.; BEKERS, M.J. Solid-state fermentation of wheat straw with *Chaeromium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.11, p.359-369, 1981.

XAVIER-SANTOS, S.; CARVALHO, C.C.; BONFÁ, M.; SILVA, R.; CAPELARI, M.; GOMES, E. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. **Folia Microbiology**, v.49, p.46-52, 2004.

YANO, J.K.; POULOS, T. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.14, p.360-365, 2003.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.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.