



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

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

---

**Purificação e caracterização da poligalacturonase termoestável  
produzida pela linhagem fúngica *Thermomucor indicae-seudaticae*  
N31 em fermentação em estado sólido e submersa**

**NATALIA MARTIN**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro  
Setembro - 2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

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

---

**Purificação e caracterização da poligalacturonase termoestável  
produzida pela linhagem fúngica *Thermomucor indicae-seudaticae*  
N31 em fermentação em estado sólido e submersa**

**NATALIA MARTIN**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eleni Gomes  
**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloiza Ferreira Alves do Prado

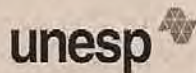
Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro  
Setembro - 2010**

576      Martin, Natalia  
M382c      Caracterização da Poligalacturonase Termoestável  
              produzida pela linhagem fúngica *Thermomucor*  
              *indicae-seudaticae* N31 em fermentação em estado sólido e  
              submersa. / Natalia Martin. - Rio Claro : [s.n.], 2010  
              85 f. : il., figs., gráfs., tabs.

              Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
              Instituto de Biociências de Rio Claro  
              Orientador: Eleni Gomes  
              Co-Orientador: Heloísa Ferreira Alves do Prado

              1. Microorganismos. 2. Enzimas termoestáveis. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** " Purificação e Caracterização da Poligalacturonase Termoestável produzida pela linhagem fúngica *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação em estado sólido e submersa"

**AUTORA:** NATALIA MARTIN

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. ELENI GOMES

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELENI GOMES

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - IBILCE / UNESP

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP / Ribeirão Preto

Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias / Divisão de Recursos Microbianos / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis / UNESP

Data da realização: 02 de julho de 2010.

**Aos meus pais, minha irmã e ao Elton,**

Na esperança de dar a chance de uma vida melhor, sacrifícios aconteceram e sonhos foram adiados e nem por isso faltou compreensão, dedicação e carinho. A vocês, por natureza, por vocação e por amor, resta dizer que esta grande vitória é o começo de muitas conquistas, a qual serei grata pelo resto de minha vida.

**AMO MUITO VOCÊS !!!**

## AGRADECIMENTOS

*"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada, há os que deixam muito, mas há os que não deixam nada. A maior responsabilidade de nossa vida é a certeza de que as pessoas não se encontram por acaso"*

Antoine de Saint-Exupery

Por esta razão, quero expressar meu sincero agradecimento:

À Deus pelos momentos que me envolve com sua presença e espírito, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar o meu caráter.

Aos meus pais José Francisco e Maria Tereza, que trabalharam em dobro, sacrificando seus sonhos em favor dos meus; e não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis.

A minha querida irmã Juliana por ser tão especial em minha vida e sempre presente nos momentos difíceis me amparando e trazendo sempre alegrias.

Ao meu marido Elton, pelo seu grande amor, carinho, amizade e por compartilhar comigo todos os momentos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eleni Gomes, pela valiosa orientação desde a minha iniciação científica, pelo carinho e amizade; por poder contar contigo amparando minhas dúvidas e suscitando em mim a maturidade profissional.

Ao Prof. Dr. Roberto Da Silva, pela ajuda, colaboração e sugestões valiosas.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloiza Ferreira Alves do Prado pela sua ajuda na co-orientação, apoio, colaboração, dedicação e amizade.

Aos amigos de laboratório pela ajuda na realização deste trabalho e pelos agradáveis momentos durante os últimos anos: André, Andréia, Ana Flávia, Ana Lúcia, Alexandre, Aline, Ariane, Bárbara, Bárbara, Carol, Carol, Dani, Dênis, Ellen, Eduardo, Érika, Fabi, Gisele, Heloíza, Larissa, Marcelo, Milla, Paula, Paula, Ricardo, Rodolfo, Roberto, Rodrigo, Ruan, Tássia, Tiago.

As minhas amigas Aline, Carol, Dani, Ellen e Fabi e ao Marcelo que me fizeram entender o significado da expressão "lembranças para sempre".

Em especial a Aline, por termos começado e terminado juntas esta etapa de nossa vida!!!

Aos funcionários da secretária da Pós-graduação em Ciências Biológicas, pela ajuda constante, eficiência, atenção e disponibilidade.

A CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada !!!**

"Crescer significa mudar  
e mudar envolve riscos,  
uma passagem do conhecido  
para o desconhecido."

Willian P. Young ( *A Cabana* )



Esta tese está dividida em três capítulos. Neste primeiro capítulo são introduzidos os principais itens do trabalho fazendo-se o respectivo enquadramento na área da biotecnologia e a revisão bibliográfica sobre o tema da pesquisa abordando aspectos sobre fungos termofílicos, pectina, pectinases, produção, caracterização e purificação da poligalacturonase. Os capítulos 2 e 3 tratam especificamente dos resultados obtidos já no formato de artigo para publicação. No capítulo 2 são apresentados os resultados sobre seleção da linhagem fúngica termofílica *Thermomucor indicae-seudaticae* foco do estudo, a produção da poligalacturonase por esse micro-organismo em fermentação em estado sólido (FES) e em fermentação submersa (FSm) e a caracterização destas enzimas em suas formas brutas sob o ponto de vista comparativo. Esse artigo está publicado no *Microbiology*.

No capítulo 3 apresentam-se os dados da purificação das enzimas produzidas em FSm e em FES e a caracterização bioquímica e físico química das enzimas puras e a cinética de termodesnaturação de ambas, sempre discutidos sob o ponto de vista comparativo.

Por último, são apresentadas as principais conclusões deste trabalho.

## RESUMO

Organismos termofílicos produzem enzimas que, em geral, são mais termoestáveis que aquelas produzidas por mesofílicos. Além disso, essas enzimas geralmente apresentam várias características importantes sob o ponto de vista de aplicação industrial, como estabilidade em ampla faixa de pH e maior tolerância a solventes e outros desnaturantes proteicos. O tipo de processo fermentativo usado também pode influenciar a produção e as propriedades das enzimas obtidas. Foram isoladas várias cepas fúngicas termofílicas e pectinolíticas e entre elas, o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi o que apresentou maior potencial de produção de poligalacturonase (PG) usando meios a base de resíduos agro-industriais. Em fermentação em estado sólido (FES) usando como meio de cultura uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1) a 70% de umidade, o fungo produziu 14 U/mL em 48 horas e em fermentação submersa (FSm) com 1% farelo de trigo e 1% bagaço de laranja como substrato foram obtidas 13 U/mL em 96 horas de fermentação. A PG presente na solução enzimática bruta obtida de FSm foi mais termoestável do que aquela de FSS e mais estável em ampla faixa de pH. As exo-PGs produzidas em FSm e FSS foram purificadas até homogeneidade, com um fator de purificação de 8 e 2,5 vezes e um rendimento de 27,7% e 15,5% para FSm e FSS, respectivamente. A PG da FSm apresentou um massa molar de 38,9 kDa e a de FSS 37,1, kDa. O pH e temperatura ótimos foram de 5,5 e 4,5-5,0 e 55° e 60°C, para enzimas de FSm e FES, respectivamente. Ambas as PGs mostraram perfil de exo-PG, liberando ácido galacturônico por hidrólise de pectina com baixo grau de esterificação (DE). O  $k_m$  foi 590,9 e 661,6 e o  $V_{max}$  de 4 e 4,9  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , para PG de FSm e FES, respectivamente. A termoestabilidade foi comprovada pela análise dos parâmetros termodinâmicos de ambas as enzimas, sendo a enzima produzida por FSm a que apresentou maior termoestabilidade com valores maiores de  $t_{(1/2)}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $E_a$  (energia para desnaturação) em temperaturas de 50 a 67°C. Esses dados foram opostos aos descritos em literatura, nos quais as PG produzidas por FES são mais estáveis.

**Palavras-chaves:** Pectinase, fungos termofílicos, *Thermomucor indicae-seudaticae*, fermentação, enzimas termoestáveis, poligalacturonase

## ABSTRACT

Thermophilic organisms produce enzymes that, in general, are more thermostable than the ones produced by mesophilic. Moreover, these enzymes generally exhibit many important characteristics under the perspective of industrial application, such as stability in a wide range of pH and more tolerance to solvents and other protein denaturing substances. The type of fermentative process can also influence the production and properties of the enzymes obtained. Numerous strains of thermophilic and pectinolytic fungi were isolated and among them, the *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 was the one that presented the highest potential for polygalacturonase (PG) production using media containing agro industrial residues. In solid state fermentation (SSF) using a mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1) as substrate, at 70% moisture, the fungus produced 14 U/mL in 48 hours and in submerged fermentation (SmF) with 1% wheat bran and 1% orange bagasse as substrate, 13 U/mL were obtained in 96 hours of fermentation. PG in the crude enzymatic extract obtained from SmF was more thermostable than the one produced in SSF and stable in a wider range of pH. The exo-PGs produced in SmF and SSF were purified to homogeneity, with a final purification of 8 and 2.5-fold and overall recovery of 27.7% and 15.5%, respectively. PG from SmF exhibited a molecular mass of 38.9 kDa and PG from SSF 37.1 kDa. Optimum pH and temperature were 5.5 and 4.5-5.0 and 55°C and 60°C for the enzymes from SmF and SSF, respectively. Both PGs exhibited exo-PG profile, releasing galacturonic acid through the hydrolysis of low esterification level pectin.  $K_m$  was 590.9 and 661.6 and  $V_{max}$  was 4 and 4.9  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , for PG from SmF and SSF, respectively. The thermostability was confirmed by analyzing the enzymes thermodynamic parameters with PG produced in SmF being the most thermostable exhibiting higher values of  $t_{(1/2)}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $E_a$  (denaturation energy) at temperatures of 50 to 67°C. These data were opposite to the ones described in the literature, in which PGs produced by SSF are more stable.

**Keywords:** Pectinase, thermophilic fungus, *Thermomucor indicae-seudaticae*, fermentation, thermostable enzyme, polygalacturonase

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....19

**Figura 1.** *Thermomucor indicae-seudaticae*.....25

**Figura 2:** A estrutura básica da pectina. Representações esquemáticas convencional (A) e da estrutura recentemente proposta (B) para pectina. É importante notar que os polímeros mostrados aqui pretendem ilustrar somente alguns dos principais domínios encontrados na maioria das estruturas mais definidas de pectinas (WILLATS, 2006).....32

**Figura 3:** Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécicas. (a) Radical H para PG e CH3 para PMG; (b) PE e (c) Radical H para PGL e CH3 para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias pécicas. PMG: polimetilgalacturonase, PGL: poligalacturonato liase, PG: poligalacturonase (EC 3.2.1 15), PE: pectinesterase (EC 3.1.1 11), PL: pectina liase (4.2.2 10) (GUMMADI; PANDA, 2003).....36

### CAPITULO II - PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO TERMOFÍLICO BRASILEIRO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO.....65

**Figure 1:** Production of PG by thermophilic fungal strains isolated in SSF.....78

**Figure 2:** Phylogenetic tree based on 28S rDNA D1/D2 analyses showing closest relatives of thermophilic fungal strain N31 (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm). Bootstrap values (1,000 replicate runs) greater than 50% are listed.....79

**Figure 3:** Effect of temperature on mycelial growth of *T. indicae-seudaticae* N31 on solid PDA medium. ■=27°C; ●=35°C; ▲= 40°C ; ▼=45°C; ◆=50°C; +=55°C.....80

**Figure 4:** Physicochemical properties of PG produced by *T. indicae-seudaticae* N31 in SSF and SmF. Effect of pH and temperature on the PG activity (a, c); effect of pH and temperature on the stability of enzymes when in absence of substrate (b, d, e). □=submerged fermentation; ■=solid state fermentation.....81

### CAPITULO III - Purificação e caracterização de exo-Poligalacturonase de um termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produzida em fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....83

**Figure 1:** Chromatographic steps for PG purification. Elution of PG obtained in SmF from Sephadex G75 (a) and Q-sepharose (b) columns; elution of PG obtained in SSF from Sephadex G75 (c) and Q-sepharose (d) columns.....99

**Figure 2:** SDS-PAGE analysis of the purified PG from *T. indicae-seudaticae*. PG was visualized by silver staining. The numbers on the left indicate the positions of mol. wt markers in *kDa* (line 1); line2=PG from SmF, line3=PG from SSF..... 100

**Figure 3:** Properties of PG. (a) Substrate specificity: 1 = citrus pectin (26% D.E.); 2 = citrus pectin (92% D.E.); 3 = apple pectin (82% D.E.); 4 = Polygalacturonic acid ; SSF = ■; SmF = ▨ . (b) Mode of action of PG (endo and exo activity). 1 = SmF; 2 = SSF; endo-PG = □; exo-PG = ☒.....101

**Figure 4:** Paper-chromatographic analysis of hydrolysis products of PG from *T. indicae-seudaticae* acting on 1.0 % (w/v) citrus pectin, at 60°C. lines **1 and 2**= hydrolyzed with enzyme from SmF for 10 and 60 min, respectively; lines **3 and 4**= hydrolyzed with enzyme from SSF for 10 and 60 min, respectively. 5=trigalacturonic acid; 6=digalacturonic acid; 7=galacturonic acid.....102

**Figure 5:** Properties of PG. Effect of pH (a), temperature (c) on activity of PG, effect of pH (b) and temperature (d) on stability of PG when in absence of substrate. SSF (■); SmF (●).....103

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPITULO I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 1.</b> Produção de PG sob FES.....	<b>28</b>
<b>Tabela 2.</b> Produção de PGs sob FSm.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3</b> – Propriedades bioquímica e físico-química de algumas poligalacturonases.....	<b>39</b>
<b>Tabela 4-</b> Características cinéticas de PGs.....	<b>40</b>
<b>Tabela 5</b> – Aplicação das Pectinases.....	<b>48</b>
<b>CAPITULO II - PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO TERMOFÍLICO BRASILEIRO <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO.....</b>	<b>65</b>
<b>Table 1:</b> Polygalacturonase production by <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 from SSF and SmF with different carbon sources.....	<b>82</b>
<b>CAPITULO III - Purificação e caracterização de exo-Poligalacturonase de um termofílico <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 produzida em fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 1.</b> Purification of the PG produced by <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	<b>95</b>
<b>Table 2 :</b> Kinetic parameters of PG from SSF and SmF (Michaelis-Menten-GraFit 5.0).....	<b>96</b>
<b>Table 3:</b> Ions effect on PG activities.....	<b>97</b>
<b>Table 4:</b> Kinetic parameters for thermal inactivation of the purified polygalacturonase from <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	<b>98</b>

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPITULO I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>I.1. Micro-organismos termofílicos e enzimas termoestáveis.....</b>	<b>20</b>
<b>I.2. <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>I.3. Fermentação em estado sólido e Fermentação submersa: comparação e produção de pectinases fúngicas.....</b>	<b>25</b>
<b>I.4. Pectinas.....</b>	<b>31</b>
<b>I.5. Pectinases.....</b>	<b>33</b>
<b>I.5.1. Protopectinases.....</b>	<b>33</b>
<b>I.5.2. Esterases.....</b>	<b>34</b>
<b>I.5.3. Liases.....</b>	<b>34</b>
<b>I.5.3.1. Pectato-liase.....</b>	<b>34</b>
<b>I.5.3.1.1. Endo-poligalacturonato liase.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.3.1.2. Exo-poligalacturonato liase.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.3.2. Pectina-liase.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.3.2.1. Endo-Polimetilgalacturonato liases.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.3.2.2. Exo-Polimetilgalacturonato liases.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.4. Poligalacturonases.....</b>	<b>35</b>
<b>I.5.4.1. Endo-PGs.....</b>	<b>36</b>
<b>I.5.4.2. Exo-PGs.....</b>	<b>36</b>
<b>I.6. Produção de PGs por fungos filamentosos e suas propriedades bioquímicas.....</b>	<b>37</b>
<b>I.7. Purificação de pectinases.....</b>	<b>41</b>
<b>I.8. Aplicação Enzimática.....</b>	<b>45</b>
<b>I.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

**CAPITULO II - PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO TERMOFÍLICO  
BRASILEIRO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 EM FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO.....65**

**Pectinase Production by a Brazilian Thermophilic Fungus *Thermomucor  
indicae-seudaticae* N31 in Solid-State and Submerged Fermentation.....66**

**Abstract.....66**

**Keywords.....66**

**II.1. Introduction.....67**

**II.2. Material and Methods.....68**

*II.2.1. Microorganisms: isolation, identification and maintenance.....68*

*II.2.2. Effect of temperature on fungal growth.....68*

*II.2.3. Enzyme production in solid-state (SSF) and in submerged (SmF)  
fermentations.....69*

*II.2.4. Enzyme activity measurements.....69*

*II.2.5. Enzyme characterization.....70*

**II.3. Results and discussion.....70**

*II.3.1. Isolation, selection and identification of thermophilic pectinolytic fungal  
strains.....70*

*II.3.2. Polygalacturonase production by *T. indicae-seudaticae* N31 in SSF and in  
SmF.....71*

*II.3.3. Properties of PG from SSF and SmF.....73*

**Acknowledgments.....74**

**II.4.References.....75**



<b>CAPITULO III - Purificação e caracterização de exo-Poligalacturonases de um termofílico <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 produzida em fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....</b>	<b>83</b>
<b>Purification and characterization of exo-polygalacturonases from a thermophilic <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 produced in solid state and submerged fermentations.....</b>	<b>84</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>84</b>
<b>Keywords.....</b>	<b>84</b>
<b>III.1. Introduction.....</b>	<b>85</b>
<b>III.2. Material and Methods.....</b>	<b>85</b>
<i>III.2.1. Microorganism.....</i>	<i>85</i>
<i>III.2.2. Fermentations and enzyme production.....</i>	<i>86</i>
<i>III.2.3. Enzyme activity measurements.....</i>	<i>86</i>
<i>III.2.4. Enzyme purification procedure.....</i>	<i>87</i>
<i>III.2.5. Analytical electrophoresis.....</i>	<i>87</i>
<i>III.2.6. Protein and carbohydrate measurement.....</i>	<i>88</i>
<i>III.2.7. Enzyme characterization.....</i>	<i>88</i>
<i>III.2.8. Kinetics constants and of thermal inactivation.....</i>	<i>88</i>
<b>III.3. Results and discussion.....</b>	<b>89</b>
<i>III.3.1. Obtainment of PG crude solution.....</i>	<i>89</i>
<i>III.3.2. Purification of PG.....</i>	<i>89</i>
<i>III.3.3. Physical-Chemical and Biochemical properties of PG.....</i>	<i>90</i>
<i>III.3.4. Kinetics parameters.....</i>	<i>90</i>
<i>III.3.5. Kinetics of thermal inactivation.....</i>	<i>91</i>
<b>III.4. Conclusions.....</b>	<b>92</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>92</b>
<b>III.5. References.....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>

## INTRODUÇÃO

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia de ácido poligalacturônico ou desesterificando as moléculas de pectina. São produzidas por plantas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Na maioria das preparações comerciais, as pectinases são de origem fúngica, principalmente aquelas produzidas por *Aspergillus niger*, além de outros fungos como *Coniocytrium diplodiela*, *Sclerotinia libertina* e espécies de *Botrytis*, *Penicillium* e *Rhizopus* (JAYANI et al., 2005; KASHYAP et al., 2001). Especial atenção tem sido dada às linhagens termofílicas, tendo em vista que os micro-organismos termofílicos produzem enzimas geralmente mais termoestáveis do que aquelas produzidas por fungos mesofílicos e que apresentam várias outras propriedades importantes como a estabilidade em ampla faixa de pH e maior resistência a solventes e outros agentes desnaturantes. Tais propriedades têm grande importância sob o ponto de vista da aplicação industrial destas enzimas, além de servirem como modelos para compreensão dos mecanismos adaptativos envolvidos na termofilia. Embora estas características sejam conhecidas e sua importância biotecnológica seja freqüentemente evidenciada, poucos trabalhos científicos têm sido publicados sobre produção de pectinases por micro-organismos termofílicos. Desta forma, é de grande interesse o isolamento de cepas microbianas pectinolíticas termofílicas, uma vez que o estudo dessas enzimas, sob os aspectos bioquímicos e físico-químicos, traria informações de grande relevância científica. Por outro lado tem sido discutido que o tipo de processo fermentativo (FES e FSm) influencia nas propriedades das enzimas expressas, principalmente na tolerância às variações de pH e termoestabilidade.

Dentro deste contexto, o presente trabalho foi proposto com o intuito de:

- a) isolar fungos termofílicos produtores de pectinases;
- b) produzir poligalacturonase pela linhagem selecionada *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais como fonte de carbono;
- c) purificar a poligalacturonase produzida pelo fungo em ambos os processos fermentativos;
- d) caracterizar as enzimas bioquímica e fisicoquimicamente.
- e) comparar as enzimas produzidas em FES e em FSm, principalmente sob o aspecto de termofilia e termoestabilidade.

*CAPITULO I*

*REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I.1. Micro-organismos termofílicos e enzimas termoestáveis

Apesar da grande importância ecológica, o número de espécies de micro-organismos conhecidos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana que pode ser encontrada na natureza. Acredita-se que apenas 5% das espécies, dependendo do habitat, tenham sido identificadas (O'BRIEN et al., 2005).

Os fungos constituem um grupo microbiano extremamente diverso, com uma ampla variedade morfológica, metabólica e de habitat. Levantamentos propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos era conhecida, com aproximadamente 75.000 espécies descritas na literatura. Atualmente estima-se que os fungos sejam o grupo microbiano com o maior número de espécies na natureza, com estimativas variando entre 3,5 a 5,1 milhões de espécies (O'BRIEN et al., 2005).

Uma das mais surpreendentes propriedades dos micro-organismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrão para a maioria dos organismos (LASA; BERENGUER, 1993). Entre todos esses fatores, a temperatura é o que mais influencia o funcionamento de moléculas e manutenção das 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 micro-organismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos e são classificados de acordo com Madigan et al. (2003) em:

1) Termofílicos: organismos com faixa de crescimento entre 20° e 55°C, sendo as temperaturas ótimas para o crescimento entre 40° e 50°C. Nesse grupo estão incluídos alguns representantes dos Domínios Bacteria e Archaea e alguns do Domínio Eukarya (fungos filamentosos).

2) Termofílicos extremos: organismos capazes de crescer em temperaturas entre 65° a 85°C. Esse grupo é representado por alguns procariotos dos Domínios Bactéria e Archaea.

3) Hipertermofílicos: Arqueobactérias com capacidade de crescer entre 85° e 110°C.

Evidências sugerem que organismos hipertermofílicos foram as primeiras formas de vida na Terra e suas proteínas podem, portanto, servir como modelo para o entendimento da evolução das enzimas sob os pontos de vista biológico, químico e físico-químico (SCANDURRA et al., 1998).

Existem mais de 70 espécies, 29 gêneros e 10 ordens de hipertermofílicos, sendo a maioria do Domínio Archaea. No Domínio Bacteria destacam-se duas espécies o *Fervidobacterium pennavorans* e *Thermotoga marítima* (MOUCHACCA et al., 1997).

Entre os eucariotos, poucas espécies conseguem crescer entre 45° a 55°C. Entre os gêneros descritos estão *Aspergillus*, *Canariomyces*, *Chaetomium*, *Coonemeria*, *Corynascus*, *Dactylomyces*, *Malbrenchea*, *Melanocarpus*, *Myceliophthora*, *Paelomyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Rhizomucor*, *Thermomucor*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Acrophiolophora*, *Stibella*, *Taloromyces* e *Thielavia* (MAHESHWARI et al., 2000).

A adaptação de um determinado micro-organismo à termofília envolve adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA a temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofília tem despertado grande interesse sob pontos de vista biológicos e evolutivos. Porém, foi na biotecnologia que esse interesse foi mais significativo, considerando que os mecanismos de termoresistência das biomoléculas desses micro-organismos podem constituir interessantes modelos para a bioengenharia ou ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Proteínas de micro-organismos termofílicos apresentam seqüências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas. Algumas diferenças na composição de aminoácidos, nos mecanismos de manutenção do enovelamento e da estabilização da estrutura foram constatadas entre enzimas de mesófilos e termófilos, porém, os fatores de pressão seletiva (pressão, pH e temperatura) e as variações filogenéticas devem ser considerados (GOMES et al., 2007).

Em relação às proteínas, os fatores que afetam a estabilidade e cinética das mesmas (calor, pH, detergentes e agentes caotrópicos) o calor é o que mais requer propriedades adaptativas no contexto biológico. Essas modificações têm sido foco de inúmeras pesquisas visando à compreensão dos mecanismos

envolvidos. Enzimas estáveis a elevadas temperaturas são chamadas termozimas ou enzimas termoestáveis (BRUINS et al., 2001).

Micro-organismos que vivem em condições extremas são, usualmente, uma rica fonte para obtenção de bioprodutos com características diferenciadas, em particular, enzimas. Devido as suas propriedades únicas, esses bioprodutos podem ser empregados em condições ambientais drásticas, que freqüentemente ocorrem na prática industrial. Em geral, há uma correlação alta entre a termofilia do organismo e a termoestabilidade de suas proteínas (intra e extracelulares). Enzimas de micro-organismos mesofílicos são usualmente moléculas mais lábeis, que perdem a sua configuração original e a sua atividade em temperaturas elevadas, enquanto que enzimas produzidas por organismos termofílicos são estáveis em temperaturas acima de 40°C, em ampla faixa de pH e mostram maior resistência a desnaturantes como detergentes e uréia (NIEHAUS et al., 1999, BRUINS et al., 2001). Como vários processos industriais requerem enzimas funcionais a temperaturas superiores a 70°C, há um grande interesse comercial na busca desses novos catalisadores, com maior termoestabilidade (VIEILLE; ZEIKUS, 2001; BRUINS et al., 2001).

É esperado que fungos termofílicos decompositores de material vegetal produzam pectinases. Entretanto, alguns fungos termofílicos não conseguem utilizar a celulose como fonte de carbono. Esses organismos podem crescer comensalmente utilizando açúcares liberados por outros organismos que degradam o polímero. Por outro lado, a incapacidade de hidrólise em determinado polímero como celulose, não significa que o fungo não tenha sistema enzimático para hidrólise de outro polímero.

A produção de pectinases microbianas tem sido muito estudada, porém, a maioria das pesquisas tem focado a produção destas enzimas por linhagens fúngicas mesofílicas (CASTILHO et al., 1999; COURI et al., 2000; SILVA et al., 2002 e 2005; SAITO et al. 2004; HASUNUMA et al., 2003; SINGH; RAO, 2002; NAGAI et al., 2000). Poucos relatos são apresentados na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI et al., 2000; MARTINS et al., 2002; PHUTELA et al., 2005; KAUR et al., 2004; CELESTINO et al., 2006; MARTINS et al., 2007; SCHNITZHOFER et al. 2007).

INAMDAR (citado por MAHESHWARI 2000) estudou 40 fungos termofílicos, dos quais, apenas 7 gêneros foram capazes de crescer em meio líquido contendo pectina. Desses, a maioria não mostrou atividade de

poligalacturonase detectável no meio. Somente a espécie *Thermoascus aurantiacus* produziu quantidades consideráveis de pectinase em meio à base de casca de citrus. A poligalacturonase produzida por esse fungo foi também estudada por MARTINS et al. (2002).

Várias linhagens diferentes de *T. lanuginosus* foram estudadas produziram pectinases em pectina citrus e polpa de beterraba como substratos (PUCHART et al. 1999). Alves, Campos-Takaki e Porto (2002) isolaram 56 espécies do gênero *Mucor*, totalizando 11 diferentes táxons, a partir de fezes de herbívoros. Destes, 96% produziram PG.

Kaur e colaboradores (2004) estudaram a produção de poligalacturonase termoestável por uma forma termofílica de *S. thermophile* apinis em FSm e Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) reportaram a produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *T. lanuginosus* por FSm em meio com 1% de pectina e sacarose.

Martins e colaboradores (2002) relataram a produção de poligalacturonase pelo fungo *T. aurantiacus* CBMA1756 quando cultivado sob FES, contendo farelo de trigo e bagaço de laranja. Phutela e colaboradores (2005) reportaram a produção de pectinase e poligalacturonase pelo fungo termofílico *A. fumigatus* em cultivo em estado sólido.

## **I.2. *Thermomucor indicae-seudaticae***

A espécie *Thermomucor indicae-seudaticae* pertence ao filo Zygomycota, classe Zygomycetes, ordem Mucorales, família Mucoraceae e gênero *Thermomucor*.

Os zigomicetos caracterizam-se, dentre outros aspectos, por apresentarem a parede celular constituída por quitina e quitosano, além de apresentarem micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução, ou quando a colônia envelhece. O nome zigomiceto significa, literalmente, fungo (*mykés*) que tem zigoto (*zygós* = ovo), sendo este tipo de reprodução tão característica, que acabou por dar nome ao grupo.

A reprodução assexuada ocorre com a diferenciação de esporos imóveis, que são formados em diferentes estruturas, chamadas esporângios. Ainda pode ocorrer a partir de fragmentos de micélio, pois os fungos são altamente capazes de regeneração, bem como a formação de gemas ou clamidósporos, que

correspondem a segmentos do micélio que são compartimentalizados com a formação de septos.

A reprodução sexuada apenas ocorre quando dois micélios geneticamente compatíveis se colocam lado a lado, uma vez que a maioria das espécies desse grupo de fungos é heterotálica. Um dos micélios é dito + e o outro -, fazendo, cada um deles, o papel de elemento masculino ou feminino, pois em fungos não se fala em sexo.

Mucorales é a ordem com maior número de espécies dentro do filo (cerca de 300), sendo seus representantes também conhecido como “fungos do açúcar”. São os primeiros fungos a colonizarem um substrato, crescendo rápida e exuberantemente, com micélio denso e distinto, chegando a atingir 2-3 cm de altura (TRUFEM, S.F.B. 1984).

O gênero *Thermomucor* é um fungo filamentososo encontrado em solo e vegetal em decomposição e possui apenas uma espécie descrita, a *T. indicae-seudaticae*. Essa espécie é termofílica, podendo crescer em temperatura de até 54°C. *T. indicae-seudaticae* foi primeiramente descrito *Mucor indicae-seudaticae* (SCHIPPER et al., 1975). Mais tarde, foi denominado *Thermomucor indicae-seudaticae* (SUBRAHAMANYAM et al., 1977).

Schipper (1979), estudando *T. indicae-seudaticae*, relatou que a formação de zigosporo em cultura pode ser obtida em meio PDA (Potato dextrose Agar) acrescentado de 50% ácido láctico por litro (baseado em TUIITE, 1969)].

As características macroscópicas dessa espécie em meio de cultura em placa correspondem a colônia flocosa de crescimento rápido e de coloração acinzentada/amarronzada e esporangióforos eretos. Suas características microscópicas principais consistem de esporangióforo amarelo ouro medindo de 22-44 µm em diâmetro, esporângios globóides de 33-110 µm em diâmetro e esporangiosporos globosos/subglobosos de 3.3-7.7 µm em diâmetro (Fig 1). (TRUFEM, S.F.B. 1984).



**Figura 1.** *Thermomucor indicae-seudaticae*.



### **I.3. Fermentação em estado sólido (FES) e Fermentação submersa (FSm): comparação e produção de pectinases fúngicas**

Os processos fermentativos são ferramentas importantes na obtenção de diversos produtos, tais como biomassa microbiana, vitaminas, hormônios, pigmentos, enzimas, biosurfactantes, biopesticidas, etc (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003).

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia o qual tem muito ainda para ser conhecido e explorado. A produção de enzimas por micro-organismos é afetada por diversos fatores como o tipo de processo empregado (fermentação submersa ou em estado sólido); o tempo de fermentação; o tipo de substrato e fatores físico-químicos como umidade, concentração de oxigênio, pH e temperatura (HESSELTINE, 1972; PANDEY, 1992; PANDEY et al., 2000; MARTINS et al., 2002; PANDEY, 2002; SILVA et al., 2005). Entre esses processos, a fermentação submersa tem sido a mais usada. Entretanto, nas últimas décadas têm aumentado a tendência do uso da fermentação em estado sólido para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

Tanto o processo de FES quanto o de FSm apresentam características importantes, as quais devem ser levadas em conta no momento da escolha, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o micro-organismo a ser utilizado.

A FES é definida como um processo de fermentação que ocorre em baixa quantidade ou na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido podendo ser usado como substrato ou apenas como suporte inerte, neste caso embedido em nutrientes (PANDEY et al., 2000 e 2002; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005; HOLKER; LENZ, 2005). A FSm por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas, no líquido normalmente água. Em FSm a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e

consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados (MITCHELL et al., 2000).

Na FES podem ser destacadas como principais vantagens: utilização de resíduos agroindustriais de baixo custo como substrato, entre os quais os farelos de trigo, soja, algodão, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, entre muitos outros. Como é empregada pequena quantidade de água é possível a obtenção de mistura mais concentrada dos metabólitos e uma redução da formação de resíduos. Além disso, favorece o desenvolvimento de fungos filamentosos, que geralmente crescem na natureza em substratos sólidos como madeira, raízes e folhas de plantas e outros materiais orgânicos e por ser um processo estacionário, não acarreta em custos energéticos adicionais. A alta produtividade, o menor requerimento de espaço e energia são também atrativos para o uso de FES (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2000 e 2003; GERMANO et al., 2003; SANDHYA et al., 2005). Como desvantagens podem ser destacadas as dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição (PANDEY, et al., 1999 e 2002; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

O uso da fermentação no estado sólido geralmente leva a uma comparação com a fermentação submersa (FSm), para uma melhor compreensão do processo, e é citada por diversos autores (MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1987). GERVAIS & MOLIN (2003) relatam que a principal diferença entre a FSm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As fermentações submersas são consideradas reações de mistura perfeita, onde, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos e os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto. RAMANA MURTHY et al. (1993) descrevem que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se a utilização, na FES, do substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FSm, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido.

Inúmeros materiais orgânicos como resíduos agrícolas, florestais e industriais têm sido propostos como substratos para a FES (KALOGERIS, et al., 2003). Esses resíduos promovem, ao mesmo tempo, uma alternativa de baixo custo para a fermentação, além da redução dos problemas ambientais causados pela sua disposição aleatória no meio ambiente (RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de mandioca, têm sido empregados com sucesso como substratos na produção de enzimas por FES (MARTINS et al., 2002, SILVA et al., 2002 e 2005; FREITAS et al., 2006).

Os fungos têm sido considerados os organismos mais adaptados a FES, devido a capacidade de suas hifas crescerem na superfície da partícula e por serem capazes de penetrarem nos espaços interpartículas colonizando os substratos sólidos (SANTOS et al., 2004).

As pectinases constituem um importante grupo de enzimas com uso industrial sendo a maioria das PGs produzidas industrialmente obtidas por fermentação submersa, embora vários estudos têm sido conduzidos visando fermentação em estado sólido (MINJARES-CARRANCO et al., 1997; NITURE, 2008).

As composições dos complexos pectinolíticos de origem microbiana variam de acordo com a espécie do micro-organismo produtor e, sendo assim, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas com propriedades adequadas a cada processo é fundamental para a utilização das mesmas (SATHISH-KUMAR; PALANIVELU, 1998, NITURE; PANT, 2007).

As tabelas abaixo mostram resultados obtidos para a produção de PGs por diferentes fungos sob fermentação em estado sólido e fermentação submersa (Tabela 1 e 2).

Condições de processo afetam de forma distinta a morfologia de diferentes linhagens dos fungos. Conseqüentemente, essas condições devem ser avaliadas a fim de que favoreçam o desenvolvimento e a produção pelo micro-organismo. Acuna-Arguelles e colaboradores (1995) relataram distintas respostas fisiológicas com a mesma linhagem de *A. niger*, de acordo com a técnica de fermentação utilizada, mostrando vantagens na produção de pectinases em estado sólido sobre o processo submerso. Por outro lado, a necessidade de seleção de linhagens adaptadas a cada tipo de produção foi enfatizada por Minjarres-Carranco e colaboradores (1997).

**Tabela 1.** Produção de PG sob FES.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade PG (U/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo	480	Singh et al., 1999
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo	400	Kavitha; Umesh-Kumar, 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e glicose	370	Fontana et al., 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Pectina	357,5	Diaz-Godinez et al., 2001
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e soja	152,5	Castilho et al., 2000
<i>Fusarium moniliforme</i>	Farelo de trigo e polpa de laranja	81	Niture; Pant, 2004
<i>Penicillium viridicatum</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo	71,2	Silva et al., 2005
<i>Thermoascus auriantacus</i>	Farelo de trigo e bagaço de laranja	43	Martins et al., 2002
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e dextrose	36,3	Debing et al., 2006
<i>Lentinus edodes</i>	Polpa de morango	29,4	Zheng; Shetty, 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e pectina	27,5	Taragano; Pilosof, 1999
<i>Moniliella sp.</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	26	Martin et al., 2004
<i>Aspergillus awamori</i>	Polpa de uva	25	Botella et al., 2007
<i>Penicillium sp.</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	12	Martin et al., 2004
<i>Aspergillus awamori</i>	Grão de trigo	9,6	Blandino et al., 2002
<i>Fomes sclerodermeus</i>	Farelo de soja e farelo de trigo	26	Salariato et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i> CCT0916	Bagaço de maçã	11	Alcântara et al., 2010

**Tabela 2.** Produção de PGs sob FSm

<b>Micro-organismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade PG (U/mL)</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus japonicus</i>	Pectina e glicose	500	Teixeira et al., 2000
<i>Penicillium occitanis</i>	Pectina de citrus	221	Hadj-Taieb et al., 2002
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de trigo e pectina	54	Malvessi; Da Silveira, 2004
Alkalophilic bacteria	Pectina de citrus	29,1	Sunnotel; Nigam 2002
<i>Penicillium dierckxii</i>	Pectina de beterraba	32,6	Shubakov; Elkina 2002
<i>Aspergillus Níger</i>	Farinha de milho e glicose	1,9	Panda et al., 2004
<i>Polyporus squamosus</i>	Pectina	1,5	Antov; Pericin e Dimic 2001
<i>Trichoderma reesei</i>	Pectina de beterraba	1,1	Olsson et al., 2003
<i>Penicillium griseoroseum</i>	Pectina	0,7	Pereira et al., 2002
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Pellet de citrus	0,5	Kaur et al., 2004
<i>Mucor flavus</i>	Pectina de citrus e polpa de beterraba	0,4	Gadre et al., 2003
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pectina de citrus e glicose	0,3	Niture; Pant, 2004
<i>Aspergillus Níger</i>	Pectina	0,055	Maldonado; Strasser de Saad, 1998
<i>Aspergillus awamori</i>	Pectina	0,046	Blandino et al., 2002
<i>Aspergillus giganteus</i>	Pectina cítrica	9,5	Pedrolli et al., 2008
	Bagaço de laranja	48,5	
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e amido	6,1	Palaniyappan et al., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	pectina	1,03	Martos et al., 2009
<i>Penicillium veridicatum</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo	4,1	Gomes et al., 2009

Na comparação da produção de enzimas por FSM e por FES tem-se constatado uma maior quantidade nesta última (AGUILAR et al., 2004). A produção de poligalacturonase e pectinaliase por *Aspergillus niger* foi cerca de 5 e 1,3 vezes maior em FES do que em FSM, respectivamente (TARAGANO e PILOSOFF, 1999).

Solis-Pereyra et al. (1993) compararam as produções de endo-poligalacturonase (endo-PG) e exo-poligalacturonase (exo-PG) por *Aspergillus niger* em FES e FSM. Os resultados obtidos por esses autores mostraram que a produção de ambas as enzimas foi maior em FES. Os dados mostraram ainda que, além de proporcionar uma maior atividade das enzimas, o tempo requerido para a síntese foi menor na FES. Além disso, nesse processo, a síntese das enzimas foi estimulada quando o substrato possuía altas concentrações de açúcar, enquanto que em FSM, a produção decrescia, indicando a ocorrência de repressão catabólica neste último sistema e ausência no primeiro.

Díaz-Godínez e colaboradores (2001) mostraram que *A. niger* teve maior produtividade de pectinase (10x) em FES do que em FSM, enquanto que *F. moniliforme* produziu 3x em FES (NITURE e PANT, 2004)

Patil e Dayanand (2006) obtiveram resultados que revelaram a produção máxima de endo-pectinase ocorreu em FSM e a de exo-pectinase em FES. No entanto a produção de endo-pectinase foi menor quando comparado significativamente com exo-pectinase em FES e FSM.

Ustok; Tari; Gogus (2007) relataram que em condições otimizadas individualmente a produção de PG foi 48% maior em FES do que em FSM.

Estudos da produção de invertase por *A. niger* indicaram que o fungo cresceu mais eficientemente e produziu mais enzima em FES do que em FSM, quando os níveis de sacarose foram altos. Esses estudos sugeriram que os altos níveis do açúcar impediram a desnaturação da enzima em FES (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Os autores ainda demonstraram que o fungo produziu maior quantidade de pectinase em FSM, porém, quando a sacarose foi adicionada, a maior produção foi obtida em FES, corroborando dados de outros autores que mostraram que a produção de enzimas é mais sensível à repressão catabólica em FSM (RAIMBAULT, 1998; NANDAKUMAR et al., 1999; RAHARDJO et al., 2006).

Ainda, propriedades intrínsecas das moléculas de proteínas extracelulares microbianas como temperatura e pH ótimos para a atividade,

termoestabilidade, estabilidade em diferentes faixas de pH e afinidade pelo substrato, em muitos casos, também mostram ser influenciadas pelo tipo de processo fermentativo usado para a produção das mesmas (ALAZARD e RAIMBAULT, 1981).

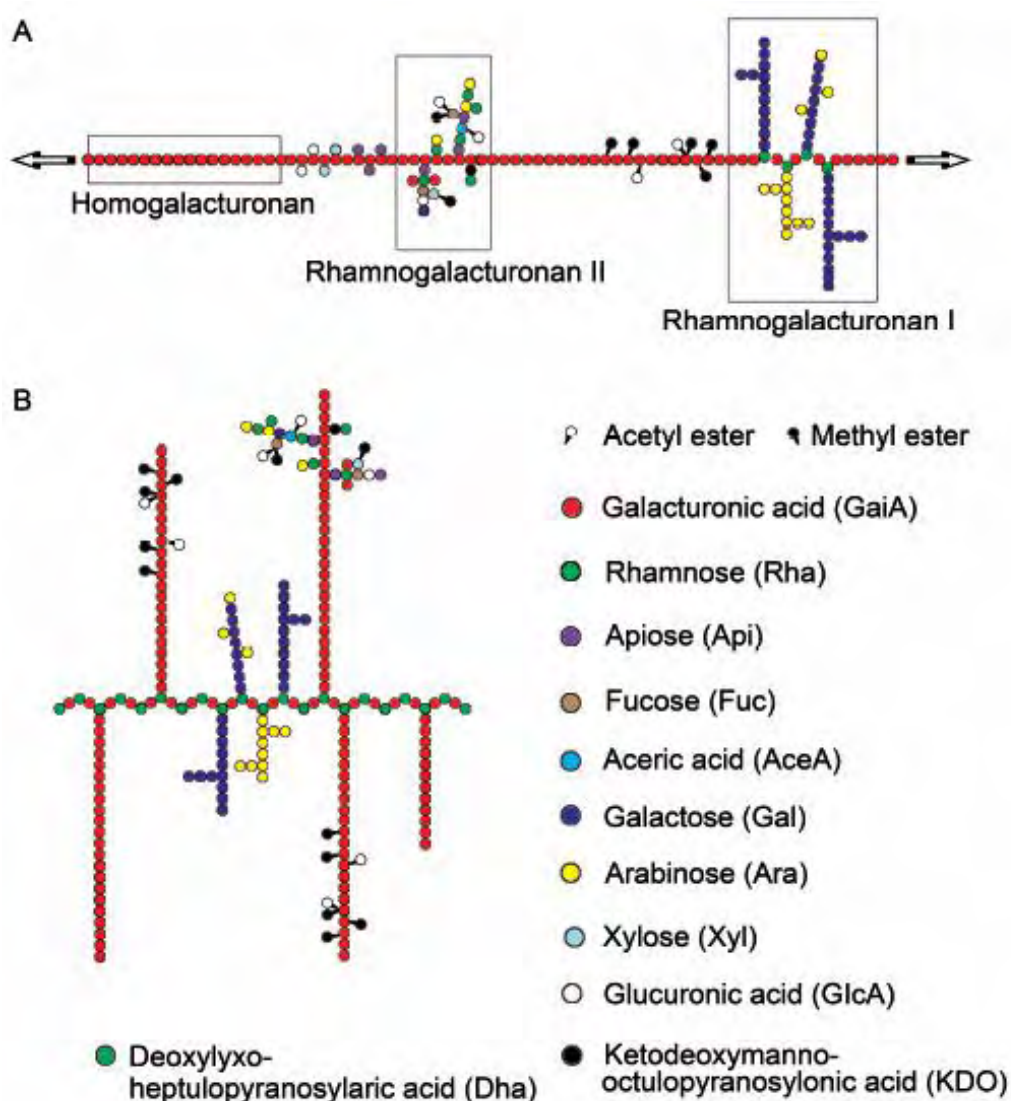
Acuña-Argüelles et al. (1995) compararam as propriedades de endo e exo-PG produzidas por *Aspergillus niger* em FES e FSM. Os resultados revelaram que houve diferenças na estabilidade a diferentes valores de pH e temperatura e nas taxas de afinidade pelo substrato. Quando expostas a 60°C por 30 minutos, a endo e exo-PG de origem em FES mantiveram cerca de 90 e 70% da atividade original, enquanto que aquelas obtidas por FSM mantiveram apenas 40% da atividade. A endo-PG mostrou-se estável na faixa de pH entre 2,6 a 6,0 quando produzida por FES e entre 6,0 e 7,0 quando produzida por FSM. A exo-PG obtida por FES foi estável entre 3,5 e 5,0 e entre 4,0 e 5,0 quando obtida por FSM. A endo-PG produzida por FSM mostrou uma maior afinidade pelo substrato, enquanto que a exo-PG não mostrou diferenças nesta propriedade quando produzida nos dois processos fermentativos. A presença de compostos não protéicos, gerados no meio de FES foi sugerido por Diaz et al. (2006), como possíveis fatores responsáveis por diferenças cinéticas, como maior atividade específica e aumento da termoestabilidade observadas em lipases produzidas por *Rhizopus homothalicus* em FES em relação aquelas obtida em FSM.

#### **I.4. Pectinas**

Pectinas são um grupo de polímeros extremamente complexo e estruturalmente diversificado. A estrutura da pectina pode ser muito heterogênea entre as plantas, entre os tecidos e até mesmo dentro de uma única parede celular. A composição da pectina é variada em espécies diferentes de plantas dependendo da idade e maturidade da parte da planta. A pectina ocorre como um constituinte da parede celular de plantas superiores entre as fibras de celulose e são extremamente diversas em sua estrutura (RIDLEY et al. 2001, NITURE, 2008, PEDROLLI et al. 2009, YADAV et al. 2009)

Na parede celular de planta, três maiores polissacarídeos pécticos são identificados, todos contendo ácido galacturônico (GalA) em maior ou menor grau. Como mostrado na figura 2 três polissacarídeos pécticos (homogalacturonana,

ramnogalacturonana-I e galacturonanas substituídas) foram isolados da parede primária de células e estruturalmente caracterizados (RIDLEY et al., 2001), todos contendo GalA com uma extensão maior ou menor. Homogalacturonana (HG) é um polímero linear consistindo de ligações 1,4  $\alpha$ -D-GalA, enquanto ramnogalacturonana I (RGI) consiste no dissacarídeo repetido [1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)] para que uma variedade de diferentes cadeias de gliconas (principalmente arabinana e galactana) fiquem presas aos resíduos de Ramnose (Rha). A ramnogalacturonana II (RGII) tem uma cadeia principal de HG melhor que RG, com as cadeias laterais complexas unidas aos resíduos de GalA (WILLATS, 2006, PEDROLI et al. 2009).



**Figura 2:** A estrutura básica da pectina. Representações esquemáticas convencional (A) e da estrutura recentemente proposta (B) para pectina. É importante notar que os polímeros mostrados aqui pretendem ilustrar somente alguns dos principais domínios encontrados na maioria das estruturas mais definidas de pectinas (WILLATS, 2006).

Substâncias pécnicas são macromoléculas glicosídicas complexas, de alto peso molecular, carregadas negativamente e acídicas (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005):

Os sítios de ligação da molécula de pectina consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxil do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil e parcialmente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Baseado no tipo de modificações das ligações da cadeia principal, substâncias pécnicas são classificadas em protopectinas, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina.

- i) Protopectina: substância pécnica insolúvel em água, presente em tecidos intactos.
- ii) Ácido Pécnico: substância solúvel em água, formada por polímero de galacturonas que contém quantidade insignificante de grupos carboxila esterificados com grupo metil.
- iii) Ácido Pectínico: são cadeias de poligalacturonas com até 75% de unidades de galacturonatos metilados.
- iv) Pectina: é o nome genérico de misturas pécnicas que contêm ácido pectínico como principal componente.

## **I.5. Pectinases**

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécnicas presentes no material vegetal e são produzidas por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (PILNIK; ROMBOUTS, 1981, PEDROLLI et al. 2009). A classificação destas enzimas é baseada no modo de ataque à cadeia de ácido poligalacturônico dos polímeros pécnicos, sendo descritos três tipos de enzimas: as desesterificantes (pectinesterases), as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. A classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato, pectina ou pectato, e na região em que atuam na molécula, podendo, neste caso, atuar de forma randômica, atividade endo, ou a partir da extremidade não redutora da molécula, atividade exo (FOGARTY; WARD, 1972; PILNIK; ROMBOUTS, 1981; KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005, YADAV et al. 2009).

### **I.5.1. Protopectinases**



São enzimas que solubilizam protopectinas. Liberam pectinas solúveis e altamente polimerizadas a partir da protopectina (ALKORTA et al, 1998; KASHYAP et al, 2001). São classificadas em dois tipos: Um tipo reage com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (tipo A), e a outra com cadeias de polissacarídeo que podem conectar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (SAKAI et al, 1993).

A atividade enzimática é determinada pela medição do total de substâncias pécticas liberadas a partir da protopectina pelo método do carbazole-ácido sulfúrico (SEIBERT; ANTO 1946; JAYANI et al, 2005 ).

### **I.5.2. Esterases**

Pectinesterases (EC 3.1.1.11) são conhecidas também como pectinametilesterases, pectase, pectina metoxilase (KYRIAKIDIS, 1999), ou pectinametilhidrolases.

Pectinesterases catalisam a desesterificação do grupo metoxila da pectina formando ácido péctico (KASHYAP et al, 2001). Este processo libera metanol e grupos carboxílicos livres na cadeia de pectina (KORNER; ZIMMERMANN; BERK, 1980; VERSTEG, 1979).

As pectinesterases 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), as quais ocorrem em diversos tecidos, especialmente nos frutos (BARON; THIBAUT, 1985).

A atividade enzimática pode ser determinada pelo método de Kertez (1937) em que se faz a titulação dos grupos carboxílicos liberados dos ácidos galacturônicos da pectina, ou pelo método de difusão em gel (DOWNIE et al, 1998).

### **I.5.3. Liasas**

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).

#### **I.5.3.1. Pectato-liase**

Pectato-liase (EC 4.2.2.2) atacam pectatos e pectinas com baixo grau de esterificação randomicamente. São dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade e possuem pH ótimo na categoria neutro-alcálico, entre 8-10, o que limita o seu uso na indústria alimentícia. São secretadas por várias espécies de bactérias, incluindo *Bacillus* sp, *Erwinia* sp. (SINGH et al, 1999) e *Amycolata* sp (BRUHLMANN, 1994).

Podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o modo de ataque ao substrato:

**I.5.3.1.1. Endo-poligalacturonato liase:** Atacam ácido péctico aleatoriamente liberando oligogalacturonatos insaturados (JAYANI et al, 2005).

**I.5.3.1.2. Exo- poligalacturonato liase:** Atacam ácido péctico a partir da terminação redutora, liberando 4-5 digalacturonatos (SCHOMBURG; SALZMANN, 1990).

#### **I.5.3.2. Pectina-liase**

Pectina-liase (EC 4.2.2.10) tem recebido crescente atenção para aplicação porque é a única enzima capaz de despolimerizar pectinas diretamente, quebrando as ligações  $\alpha$ -1-4 de pectinas de alta esterificação sem a ação prévia de outras enzimas. De fato, a pectina-liase é uma enzima que degrada diretamente pectinas de alta esterificação através da quebra  $\beta$  eliminativa de ligações glicosídicas (Figura 4) (BUSTO, et al, 2006; ALAFIA; LLAMA; SERRA et al, 1991; SPAGNA et al, 1995).

Elas são observadas principalmente em bactérias, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia* e *Clostridium* (SINGH et al, 1999). Pouco é conhecido sobre pectina-liases de fungos (SEMENOVA et al, 2006).

Podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o modo de ataque ao substrato:

**I.5.3.2.1. Endo-Polimetilgalacturonato liases:** atacam polimetilgalacturonatos randomicamente liberando metiloligogalacturonatos insaturados.

**I.5.3.2.2. Exo-Polimetilgalacturonato liases:** Atacam polimetilgalacturonatos a partir da terminação redutora liberando metilmonogalacturonatos insaturados.

O método mais apropriado para determinar a atividade enzimática é a medida do aumento de absorbância a 235nm devido à formação de ligações  $\Delta$ -4:5 na terminação não redutora dos produtos insaturados, conforme descrito por Albersheim (1966).

#### **I.5.4. Poligalacturonases**

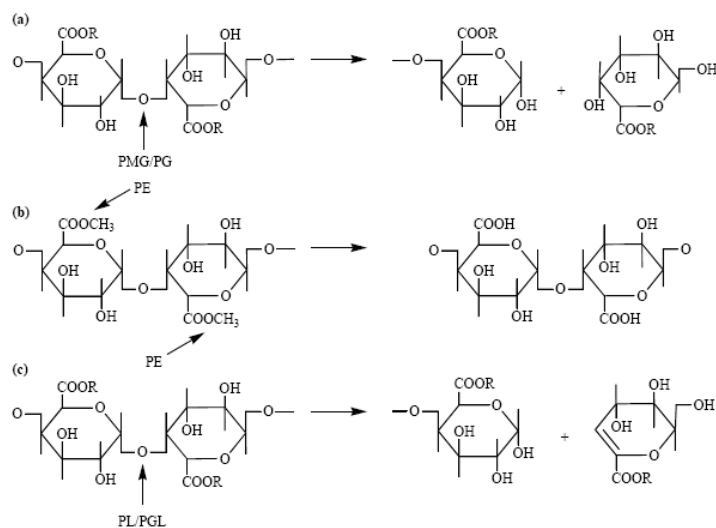
São enzimas pectinolíticas despolimerizantes que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico com o consumo de uma molécula de água na ponte de hidrogênio (JAYANI et al, 2005).

As PGs são classificadas como endo-PGs e exo-PGs de acordo com o seu modo de ataque ao substrato (Figura 4).

**I.5.4.1. Endo-PGs:** (E.C. 3.2.1.15) Hidrolizam de forma randômica as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula e liberando como produto oligogalacturonatos.

**I.5.4.2. Exo-PGs:** 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 (JAYANI et al, 2005;. DA SILVA et al, 1997; PILNIK; ROMBOUTS, 1981).

A atividade da PG é determinada medindo-se, durante o curso da reação, a taxa de aumento no número de grupos redutores e/ou a diminuição da viscosidade da solução com substrato em um aparelho denominado viscosímetro. No primeiro caso, a quantidade de açúcares redutores pode ser medida pelo método colorimétrico usando o reagente 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) ou pelo método de Somogyi-Nelson (1952).



**Figura 3:** Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécnicas. (a) Radical H para PG e CH<sub>3</sub> para PMG; (b) PE e (c) Radical H para PGL e CH<sub>3</sub> para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias pécnicas. PMG: polimetilgalacturonse, PGL: poligalacturonato liase, PG: poligalacturonase (EC 3.2.1 15), PE: pectinesterase (EC 3.1.1 11), PL: pectina liase (4.2.2 10) (GUMMADI; PANDA, 2003).

## 1.6. Produção de PGs por fungos filamentosos e suas propriedades bioquímicas.

Vários fungos, como *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium italicum*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp., *Thermomyces lanuginosus*, *Sporotrichum thermophile* (HASUNUMA et al, 2003; SATHISH-KUMAR; PALANIVELU et al., 1999; KAUR et al., 2004; JAYANI et al., 2005), *Trichoderma viride*, *F. oxysporum*, *P. viridicatum*, (SILVA et al., 2005 e 2007; JAYANI et al., 2005). Produzem endo/exo ou ambas PGs *Mucor rouxii* NRRL 1894, *Trichoderma harzianum*, *Burkholderia cepacia*, *Rhizopus. oryzae* 99-880, *Pleurotus ostreatus* (USTOK; TARI; GOGUS, 2007; SAAD et al., 2007; MOHAMED et al., 2006; MASSA et al., 2007; EL-SHEEKH et al., 2009; MERTENS et al., 2008; FREIXO et al. 2008) *Colletorichum lindemuthianum*, *F. moniliforme*, *P. frequentans*, *Rhizopus* AG-G (SCHEJTER; MARCUS, 1988; CABANNE; DONECHE, 2002; HERERT et al., 2004; BONNIN et al., 2001; NITURE; PANT; KUMAR, 2001; BARENSE et al., 2001; CHELLEGATTI et al., 2002; MACHINANDIARENA et al., 2005). Entretanto são poucos os relatos de

produção de pectinases por fungos termofílicos, como *Thermoascus aurantiacus* (MARTINS et al., 2002) e *Acrophialophora nainiana* (CELESTINO et al., 2006).

A produção de PG é induzida pela presença por ácido galacturônico, polímeros (pectina ou ácido poligalacturônico) e galactose no meio de cultivo (MALDONADO; STRASSER DE SAAD, 1998; MALVESSI; DA SILVEIRA, 2004). A produção de PG por *A. niger* foi reprimida por adição de alta concentração de glicose (10%) (FONTANA et al., 2005), embora a produção de PG por *Kluyveromyces marxianus* não tenha sido afetada na presença de 10% de glicose no meio líquido (SERRAT et al., 2002). Niture et al. (2006) mostrou que 0,2% de glicose com 1% de pectina foi essencial para a produção máxima de PG por *F. moniliforme* NCIM1276, enquanto a alta concentração de glicose diminui a expressão da enzima. A repressão por glicose é um fenômeno comum na regulação de PGs fúngicas. A glicose atua como um repressor catabólico para a produção de PG (NITURE 2008). Naidu; Panda (2004) reportaram recentemente os papéis das diferentes fontes de carbono e outros parâmetros fermentativos para a produção de pectinases incluindo PGs.

A maioria dos fungos secretam PG em meio com pH ácido. Existem diferentes evidências sugeridas que o meio extracelular ou o local hospedeiro regula o pH ácido da produção de pectinases. Algumas bactérias representantes dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* são conhecidas como produtoras de PGs em pH alcalino (KUHAD; KAPPOR; RUSTAGI; 2004).

O conhecimento sobre as propriedades bioquímicas das PGs é relevante, visto que essas enzimas são usadas em diferentes aplicações biotecnológicas. PGs isoladas de diferentes fontes microbianas diferem uma da outra em suas propriedades físico-química e bioquímica e seu modo de ação. Algumas das propriedades bioquímicas das PGs produzidas por diferentes fungos são mostradas na tabela 4.

As propriedades físico-químicas mostram que a maioria das PGs fúngicas tem o pH ótimo entre 3,5 e 5,5 (HASUNUMA et al., 2003; MARGO et al., 1994; MARTINS et al., 2002; MARTINS et al., 2007; SINGH; RAO, 2002; NAGAI et al., 2000; SATHISH-KUMAR; PALANIVELU 1999; SAITO et al., 2004; SILVA et al., 2005; SCHNITZHOFER et al., 2007; MOHAMED et al. 2006; YAN; LIOU, 2005; JACOB et al., 2007; DINU et al., 2007; DOGAN; TARI, 2008; SAAD et al., 2007; MASSA et al., 2007). Entretanto as PGs dos fungos *Sporotrichum thermophile* apinis, *Pleurotus ostreatus* e *Acrophialophora nainiana* apresentaram pH ótimo de

7,0 e 8,0 respectivamente (KAUR et al., 2004; FREIXO et al., 2008; CELESTINO et al. 2006), enquanto *Aspergillus kawachii* apresentou pH ótimo de 2,0 – 3,0 (CONTRERAS ESQUIVEL; VOGET, 2004).

A maioria das PGs relatadas na literatura tem pl entre 3,3 a 8,0, como mostra a tabela 3.

Em relação a temperatura, a literatura mostra que a maioria das PGs apresentaram temperatura ótima entre 40 e 60°C (KAUR et al., 2004; MARGO et al., 1994; MARTINS et al., 2002; MARTINS et al., 2007; SINGH; RAO, 2002; NAGAI et al., 2000; SATHISH-KUMAR; PALANIVELU 1999; SAITO et al., 2004; SILVA et al., 2005; SCHNITZHOFFER et al., 2007; CELESTINO et al. 2006; MOHAMED et al. 2006; YAN; LIOU, 2005; CONTRERAS ESQUIVEL; VOGET, 2004; JACOB et al., 2007; DINU et al., 2007; FREIXO et al., 2008; DOGAN; TARI, 2008; MASSA et al., 2007). Os fungos *Aspergillus japonicus* e *Mucor rouxii* NRRL 1894 apresentaram temperatura ótima das PGs de 30 e 35°C, respectivamente (HASUNUMA et al., 2003; SAAD et al., 2007).

**Tabela 3** – Propriedades bioquímica e físico-química de algumas poligalacturonases

Fontes das PGs	Massa Molar (kDa)	pl	Temp ótima(°C)	pH ótimo	Referência
<i>Aspergillus japonicus</i>	38 (PGI)	5,6	30	4,0 – 5,5	Hasunuma et al., 2003
	65 (PGII)	3,3	30	4,0 – 5,5	
<i>Sporotrichum thermophile apinis</i>	-	-	55	7,0	Kaur et al., 2004
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	35	5,9	55	5,0	Martins et al., 2002
	30		60 - 65	5,5	Martins et al., 2007
<i>Aspergillus Níger</i>	61 (PGI)	-	43	3,8 – 4,3	Singh; Rao, 2002
	38 (PGII)	-	45	3,0 – 4,6	
<i>Aspergillus awamori</i>	41	6,1	40	5,0	Nagai et al., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	59	-	60	5,5	Sathish-Kumar; Palanivelu 1999
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 4707	29,7	-	45	4,5	Saito et al., 2004
<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	-	-	55	5,0	Silva et al., 2005
<i>Sclerotium rofsii</i>	39,5 (PGI)	6,5	60	5	Schnitzhofer et al., 2007
	38 (PGII)	5,4	55	4,5	
<i>Acrophialophora nainiana</i>	35,5	-	60	8,0	Celestino et al. 2006

<i>Trichoderma harzianum</i>	31	4,5	-	5,0	Mohamed et al. 2006
<i>Phytophthora parasítica</i>	39,2	5,2	-	-	Yan; Liou, 2005
<i>Aspergillus kawachii</i>	60	3,55	-	2,0 – 3,0	Contreras Esquivel; Voget, 2004
<i>Streptomyces lydicus</i>	43		50	6,0	Jacob et al., 2007
<i>Apergillus niger</i> MIUG 16	36,3	5,13	40	4,6	Dinu et al., 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	50	7,0	Freixo et al., 2008
<i>Aspergillus sojae</i>	36 – 53	-	55	4,0	Dogan; Tari, 2008
<i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894	43,1	6	35	4,5	Saad et al., 2007
<i>Burkholderia cepaia</i> ATCC 25416	-	8,0	-	3,5	Massa et al., 2007
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	42	-	50 - 60	4,8	Quiroga et al., 2009
<i>Aspergillus giganteus</i>	-	-	55 - 60	5,5 – 6,5	Pedrolli et al., 2008
<i>Penicillium solitum</i>	50	-	-	4 - 5	Jurick et al., 2009
<i>Penicillium veridicatum</i>	92	-	50 - 55	5,0	Gomes et al., 2009
<i>Pleurotus ostreatus</i> NRRL0366	21	-	30	3,5	Rashad et al., 2010

A maioria das PGs fúngicas purificadas apresentam peso molecular entre 29,7 kDa a 65 kDa (SAKAMOTO et al. 2002). Os autores têm usado diferentes métodos para a determinação da massa molar, como filtração em gel, SDS-PAGE e HPLC. Portanto a comparação da massa molar é essencial para determinar o peso molecular da proteína usando o mesmo método. A maioria do peso molecular das diferentes PGs mostrado na tabela 4, acima é determinada por SDS-PAGE.

A Tabela 4 está mostrando os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de PGs de diferentes linhagens fúngicas.

**Tabela 4.** Características cinéticas de PGs.

Micro-organismo	$K_m$ (mgL <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$ )	Referência
<i>Sporotrichum thermophile apinis</i>	0,41	0,52	Kaur et al., 2004
<i>Thermoascus aurantiascus</i>	1,46	2433,3	Martins et al., 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13,23	5530,8	Freixo et al., 2008
<i>Mucor rouxii</i> 1894	1,88	0,045	Saad et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i> MIUG16	0,94	3114,3	Dinu et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i>	0,94	3114,3	Singh; Rao, 2002
<i>Streptomyces lydicus</i>	1,63	677,8	Jacob et al, 2007
<i>Aspergillus sojae</i>	0,75 (gL <sup>-1</sup> )	1,14	Dogan; Tari., 2008
<i>Aspergillus flavus</i>	0,59	-	Yadav et al., 2008

<i>Penicillium oxallicum</i>	4,6	-	Yadav; Shastri., 2007
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,55	-	Quiroga et al., 2009
<i>Penicillium veridicatum</i>	1,30	1,76	Gomes et al., 2009
<i>Pleurotus ostreatus</i> NRRL0366	1,33	28,6	Rashad et al., 2010
<i>Mucor circinelloides</i> ITCC6025	2,2	4,81	Thakur et al., 2010

Niture; Pant; Kumar (2001) reportaram que uma PG produzida por *Fusarium moniliforme* NCIM1276 mostrou um valor de  $K_m$  de 0,12 mg/mL em presença de ácido poligalacturônico e atividade específica de 178 U/mg. Uma PG produzida por outra linhagem de *F moniliforme* mostrou alta afinidade em homogalacturonana,  $K_m$  0,16 mg/mL (BONNIN et al., 2001).

Algumas PGs fúngicas tem valores de  $K_m$  entre 0,19 – 20 mg/mL (DEVI; RAO, 1996).

PGs fúngicas são proteínas monoméricas compreendendo um polipeptídeo único covalentemente associado com diferentes moléculas de açúcar por modificações pós-tradução. Geralmente, a maioria das PGs fúngicas contém de 5-10% de carboidratos (RAO et al. 1996; NITURE; PANT; KUMAR; 2001; YAN; LIOU, 2005). Endo-PG e Exo-PG produzida por *Penicillium frequentans* possuem maior quantidade de carboidratos contendo 20% e 81%, respectivamente (CHELLEGATTI et al. 2002). A PG de *Aspergillus niger* apresenta pelo menos duas cadeias polipeptídicas com diferente glicosilação. A glicosilação de proteínas tem se mostrado importante na manutenção da estrutura e função, além de ser também importante durante as interações proteína-proteína (HALTIWANGER; LOWE, 2004; NITURE, 2008).

NITURE; PANT (2004) purificaram duas poligalacturonases de *Fusarium moniliforme*, sendo que o conteúdo de carboidrato da PGI foi de 4% e da PGII de 8,6%. Entretanto CHELLEGATTI et al. (2002) encontraram valores bem maiores, 81% de carboidrato em uma exopoligalacturonase purificada produzida por *Penicillium frequentans*.

A caracterização físico-química enzimática é um passo importante para se estabelecer às condições do processo, pH e temperatura na qual a enzima se mantém estável. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo.

## **I.7. Purificação de pectinases**

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 é laboroso, envolvendo experimentação do tipo tentativa e erro. Conhecendo as características físico-químicas da proteína a ser purificada 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 (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002).

O requerimento inicial para a purificação de uma proteína é a liberação e/ou obtenção da mesma de sua fonte natural, como os tecidos vegetais e os micro-organismos. No caso das enzimas microbianas, o conjunto de enzimas liberadas da fonte natural (extrato bruto) pode ser facilmente obtido já que estas podem ser liberadas para o meio de cultura. Este é um sistema cada vez mais usado para a obtenção de grandes quantidades de proteínas em solução aquosa. O passo seguinte consiste na clarificação da amostra, sendo que esta etapa representa um grande problema, especialmente para purificações em grande escala ou em escala industrial. Na maioria das vezes, são utilizadas técnicas de centrifugação ou de filtração para clarificar o extrato enzimático bruto (HO *et al.*, 2000; PESSOA; KILIKILIAN, 2005). O prosseguimento ao processo deve ser feito após um planejamento da estratégia a ser utilizada, na qual, além da estabilidade da proteína, deve-se também considerar os seguintes itens: eficiência do processo, viabilidade econômica e tipo de aplicação final do produto (HO *et al.*, 2000).

Durante um processo de purificação, deve-se levar em consideração também as características dos contaminantes presentes no extrato bruto e não apenas das características da proteína de interesse. A linha geral a ser seguida pode ser dividida em três fases principais: os primeiros passos são geralmente aqueles que apresentam um menor poder de resolução, mas que permitem o tratamento de grande quantidade de material, como a diálise ou a precipitação. Numa segunda fase, são exploradas diferentes características físico-químicas das proteínas, com o uso de diferentes técnicas de cromatografia em coluna, que são classificadas de acordo com a característica da proteína que as mesmas selecionam (MARTINS *et al.*, 2007). Para esse fim, existem várias metodologias que podem ser empregadas, como as colunas cromatográficas, que podem promover o fracionamento proteico utilizando-se de diferentes características das

moléculas, como diferenças de cargas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades (NELSON; COX, 2002). Diferentes métodos já foram descritos para purificar as pectinases.

Para se atestar a pureza final da proteína, pode ser usada várias técnicas que apresentam sensibilidades distintas, sendo que a mais comum é a eletroforese em gel de poliacrilamida. Além disso, a pureza da amostra pode ser indicada com grande confiabilidade por algum tipo de cromatografia em coluna quando realizado em sistemas de HPLC, que dispõem de detectores altamente sensíveis, que determinam a absorvidade do eluído da coluna em todo espectro de luz visível e ultravioleta (MARTINS et al., 2007).

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. Na literatura são encontrados muitos trabalhos sobre a produção e aplicações biotecnológicas de pectinases. Porém, menor número trata da purificação e propriedades bioquímicas de pectinases purificadas (GUMMADI; PANDA, 2003; SAKAMOTO et al, 2002; SATHISH-KUMAR; PALANIVELU, 1999; CABANNE; DONÈCHE, 2002; ISSHIKI et al, 2000; KAPOOR et al, 2001; YAO et al, 1996; DEVI; RAO, 1996, GUMMADI; PANDA, 2003).

DEVI; RAO (1996) purificaram e caracterizaram 3 poligalacturonases (PGI, PGII e PGIII) produzidas por *Aspergillus carbonarius* sob FES, utilizando farelo de trigo como substrato. As enzimas foram purificadas através de filtração em gel em resina Sephacryl S-200, seguida de cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex e filtração em gel Sephadex G-50.

NAGAI et al. (2000) purificaram até a homogeneidade uma endo-PG extracelular produzida por *A. awamori* IFO 4033 usando cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular.

Uma endo-PG ácida produzida pelo fungo *Sclerotium rolfsii* foi purificada até homogeneidade por técnicas de precipitação e cinco passos de cromatografia: Sephadex G-100, DEAE-cellulose, Sephadex G-200, SE Sephadex C-50 e Sephadex G-100 (SCHNITZHOFER et al. 2006). A endo-PG extracelular de *R. oryzae* NBRC 4707 foi purificada com um rendimento de 41,1% e um fator de purificação de 188 vezes (SAITO et al., 2004). A enzima foi dialisada e submetida em CM – toyopearl 650 M. As amostras coletadas foram novamente dialisada e em seguida aplicada em uma cromatografia de hidroxapatita.

SATHISH-KUMAR; PALANIVELU (1999) purificaram uma poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *T. lanuginosus*, apresentando um rendimento de 12,7% e um fator de purificação de 5,57 vezes. Primeiramente, o extrato enzimático bruto foi submetido à ultrafiltração e a precipitação com acetona e posteriormente a uma cromatografia de troca iônica, DEAE-Sepharose. A purificação parcial e caracterização de uma poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo termofílico *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa foi realizada por Kaur (2004). A enzima foi precipitada com 30% de saturação de acetona e em seguida dialisada, obtendo um rendimento de 22,18% e um fator de purificação de 19 vezes.

CELESTINO et al. (2006) purificou uma pectinase do fungo termofílico *Acrophialophora nainiana* por ultrafiltração, usando o sistema Amicon, cromatografia de filtração em gel, Sephacryl S-100, cromatografia de exclusão molecular, DEAE-Sepharose e cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50, obtendo um rendimento de 60,64% e um fator de purificação de 9,37 vezes.

Uma poligalacturonase produzida por *Tetracoccusporium* sp foi purificada por precipitação por sulfato de amônio e dois passos de cromatografia de troca iônica (AMINZADEH et al., 2006).

Uma PG extracelular de *Mucor rouxii* NRRL 1894 foi purificada a homogeneidade por dois passos de purificação, CM-Sepharose e Superdex 75, obtendo rendimento de 1,87% e fator de purificação de 85 vezes (SAAD, et al., 2007).

A enzima exo-PG produzida por *Aspergillus sojae* ATCC 20235 foi purificada usando fracionamento em três fases (TPP), uma técnica emergente de bio-separação. A enzima bruta em solução em pH 6,6, foi saturada com 30% de sulfato de amônio e a seguir com uma razão de 1:1 de tert – butanol a 25°C, o qual resultou em rendimento de 25,5% e um fator de purificação de 6,7 vezes (DOGAN; TARI, 2008).

JACOB et al. (2007) purificou a homogeneidade uma PG produzida por *Streptomyces lydicus* por ultrafiltração e procedimentos de troca catiônica e filtração em gel, sendo que resultou em 57,1% de rendimento e um fator de purificação de 54,9 vezes.

GOMES et al. (2009) purificaram um exo-poligalacturonase produzida por fermentação em estado sólido por *Penicillium veridicatum* até a homogeneidade por ultrafiltração e passos de filtração em gel utilizando sephadex G-75 e troca

iônica Q-sepharose, resultando em um fator de purificação de 37,7 vezes e um rendimento de 3,4 %.

RASHAD et al. (2010) purificaram uma poligalacturonase produzida por *Pleurotus ostreatus* NRRL0366 até a homogeneidade com um fator de purificação de 27 vezes e atividade específica de 158 U/mg de proteína através de dois passos, DEAE cellulose e sephacryl S-300. Enquanto que uma PG de *Mucor circinelloides* ITCC6025 foi obtida até a homogeneidade com passos de precipitação com etanol a 60% e sephacryl S-100 obtendo um fator de purificação de 13,3 e um rendimento de 3,4% (THAKUR et al., 2010).

Não há muitos relatos na literatura sobre a purificação de poligalacturonases em fungos filamentosos termofílicos, por isso, o estudo da poligalacturonase de *T. indicae-seudaticae* pode trazer informações importantes.

## **I.8. Aplicação Enzimática**

As enzimas foram descobertas na segunda metade do século 19, e desde então foram usadas extensivamente em diversos processos industriais. As enzimas são biocatalisadores extremamente eficientes e altamente específicos. Com o avanço da biotecnologia nas últimas três décadas, especialmente na área da genética e de engenharia de proteínas, as enzimas encontraram seu caminho em muitos processos industriais novos. As enzimas microbianas são usadas rotineiramente em muitos setores industriais ambientalmente favoráveis e econômicos. A poluição ambiental não é mais tão aceita como inevitável na sociedade moderna.

No século passado, houve um grande aumento na consciência dos efeitos da poluição, e a pressão pública influenciou a indústria e o governo. Em virtude disso, está aumentando a demanda para substituir alguns processos químicos tradicionais em processos biotecnológicos que envolvem micro-organismos e enzimas, como pectinases, xilanases, celulases,  $\alpha$ -galactosidades, lacases e ligninases, que não somente forneçam alternativas econômicas, mas que também sejam mais ambientalmente viáveis (HOONDAL, 2002).

As enzimas são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria manufatureira. Como suplementos de ração animal desempenham importante papel por reduzirem a produção de resíduos.

Também se empregam em muitas atividades industriais, como no processamento da polpa e do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas onde, com freqüência, substituem compostos ou processos químicos.

No sentido, em muitos segmentos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para técnicas de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas. Outra vantagem em se aplicar enzimas em processos industriais seria pela sua alta especificidade e eficiência e por se fazer necessárias apenas pequenas quantidade do composto. Além disso, muitas vezes contribuiriam para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia.

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por micro-organismos mesofílicos, que são a maioria em um ambiente industrial. Por outro lado, 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. 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. Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise. A maior resistência a desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (GOMES et al., 2007).

As pectinases microbianas possuem grande potencial para oferecer a humanidade e têm importância significativa na era biotecnológica atual, devido a suas variadas aplicações, como extração e clarificação de suco de frutas, processamento do algodão, degumação de fibras e plantas, tratamento de água, extração do óleo vegetal, chá e fermentação de café, clareamento de papel, como aditivo em ração de aves e em indústrias de bebidas alcoólicas e de alimentos (JAYANI et al., 2005).

Em relação a alguns destes processos, o uso de temperaturas elevadas durante a produção de suco e outros produtos vegetais são etapas importantes dos segmentos industriais e têm diversas finalidades. Na maceração da uva para extração de suco, a incubação a 60 - 65°C promove 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 suco 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 de laranja (mistura de polpa e semente), resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90°C para desnaturar a pectinestrase 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 (GOMES et al., 2007).

Em relação ao pH, o trabalho na utilização de pectinases alcalinas permanece pouco desenvolvido, no qual somente alguns relatos estão disponíveis para aplicações destas enzimas. As pectinases alcalinas estão sendo utilizadas para o pré-tratamento de água residual das indústrias de alimento, de processamento vegetal, que contêm material péctico, e para processar e degomar fibras de plantas, tais como o rami, o cânhamo, o linho e a juta. Estas fibras são geralmente usadas para fazer cordas, sacos, redes etc. em países desenvolvidos. Neste sentido, há uma grande necessidade de reunir informações detalhadas das pectinases alcalinas microbianas relacionadas aos potenciais de aplicações industriais, que ditarão por sua vez o sentido da pesquisa destas enzimas (HOONDAL, 2002).

Por outro lado, as pectinases ácidas são utilizadas freqüentemente na indústria de sucos de frutas e fabricação de vinho, tendo como fonte o *A. niger*. Os processos industriais incluem: clareamento de sucos (maçã, pêsego e uva) e obtenção de sucos concentrados (sucos cítricos, de tomate e néctar). Como exemplos podem citar a preparação de saladas de frutas cítricas, manufatura da maçã, fabricação de sidras, processo de fabricação de sucos e néctar de pêra, morango, laranja, limão e várias outras frutas como a uva e também no processamento do vinho. Além da recuperação de óleos da casca de frutas, como

terpenos, sesquiterpenos e flavonóides, assim como alcoóis, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis; maceração do tecido de plantas, liquefação e sacarificação da biomassa e isolamento de protoplasma para manipulações genéticas. As pectinases alcalinas são usadas principalmente na retirada da fibra e pré-tratamento de sucos de frutas industriais, porém estas enzimas são obtidas na maioria das vezes de fontes bacterianas. Outros exemplos de aplicação seriam na produção de papel japonês, fabricação de papel, extração de óleos (ex. canola) e fermentação de café e chás (KASHYAP et al., 2000).

Muitos estudos têm sido realizados sobre aplicações de enzimas pectinolíticas, não somente em processamento de alimentos, mas também para outras aplicações industriais (Tabela 5).

**Tabela 5:** Aplicações das pectinases

<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
Clarificação de sucos e vinhos	Reid e Ricard, (2000); Hoondal et al. (2002); Gummadi e Panda (2003); Busto et al. (2006)
Tratamento e a degomagem de fibras vegetais, processo de cura de café, cacau e tabaco.	Nair e Panda, (1997); Kashyap et al. (2001); Kapoor et al. (2001); Sharma e Satyanarayana (2006); Silva et al. (2000)
Extração de óleos essenciais e pigmentos de materiais vegetais	Coelho et al. (1995); Hoondal et al. (2002); Gummadi e Panda, (2003); Hadj-Taieb et al. (2006)
Indústria têxtil e de papel	Reid e Ricard, (2000); Olsson et al. (2003); Kaur et al. (2004); Jayani et al. (2005); Sharma e Satyanarayana (2006)

## I.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA-ARGÜELLES, M., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZALES, FAVELA-TORRES, E., Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 16, p. 23-28, 1994.

AGUILAR, C.N., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRIGUEZ, R., PRADO, L.A., LOERA, O. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. **Food Science Biotechnology**, v. 13, p. 109-113, 2004

ALAFIA, A.; LLAMA, M.J. AND SERRA, J.L. **The Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 280, p. 335-340, 1991.

ALAZARD, D., RAIMBAULT, M., Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 113-117, 1981.

ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 628-631, 1966.

ALCÂNTARA, S. R., ALMEIDA, F. C. A., SILVA, F. L. H. Pectinases production by solid state fermentation with cashew Apple bagasse: water activity and influence of nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 121 – 126, 2010.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n 1, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biociência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 30-35, 2002.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F. Screening de *Mucor* spp para produção de amilase, lipase, poligalacturonase e protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 33, p. 325 - 330, 2002

ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; DIMIC, G. R. Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. **Journal of Biotechnology**. Vol. 91, n 1, pp. 83-87, 2001.

AMINZADEH, S.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K; NADERI-MANESH, M. Purification, characterization, kinetic properties, and thermal behavior of extracellular polygalacturonase produced by filamentous fungus *Tetracoccusporium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 135 n 3, p. 193-208, 2006.



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

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

BLANDINO, A., IQBALSAYAH, T., PANDIELLA, S. S., CANTERO, D., WEBB, C., Polygalacturonase production by *Aspergillus awamorii* on wheat in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 164 - 169, 2002

BONNIN, E., LE GOFF, A., KORNER, R., VAN ALEBEEK, G. W., CHRISTENSEN, T. M., VORAGEN, A. G., ROEPSTORFF, P., CAPRARI, C., THIBAUT, J., Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1526, p. 301 – 319, 2001

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42 p. 98, 2007.

BRUHLMANN, F.; KIM, K. S.; ZIMMERMAN, W.; FIECHTER, A. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2107-2112, 1994.

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

BUSTO, M. D.; GARCÍA-TRAMONTÍN, K. E.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1477-1483, 2006.

CABANNE, C. AND DONÈCHE, B. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. **Microbiology Resource**. v. 157, p. 1-7, 2002

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.34, p. 181-186, 1999.

CELESTINO, S. M.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; SOUSA, M. V.; 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.

CHELLEGATTI M. A. S. C.; FONSECA M. J. V.; SAID S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. **Microbiology Resource**; v. 157, p.19-24, 2002.

COELHO, M.A.Z., MEDRONHO, R.A., LEITE, S.G.F., COURI, S. Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B8. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**. v. 26, p. 318-322, 1995.

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

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; DA COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255 - 261, 2000.

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

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, Y.; 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.

DIAZ-GODINEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 271, 2001.

DIAZ, J.C.M., RODRIGUEZ, J.A., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., ABOUSALHAM, A., CARRIERE, F., BARATTI, J., Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 39, p. 1042–1050, 2006.

DINU, D.; NECHIFOR, M. T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG16. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 128 – 137, 2007.

DOGAN, N.; TARI, C. Characterization of three-phase partitioned exopolysaccharidase from *Aspergillus sojae* with unique properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 43-50, 2008.

DOWNIE, B.; DIRK, L. M.; HADFIELD, K. A.; WILKINS, T. A.; BENNETT, A. B.; BRADFORD, K. J. Gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 264, p. 149-57, 1998.

EL-SHEEKH, M. M., ISMAIL, A. S., EL-ABD, M. A., HEGAZY, E. M., EL-DIWANY, A. I., Effective technological by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the Egyptian orange juice industry scraps. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 12 – 18, 2009.

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

FONTANA, R. C., SALVADOR, S., SILVEIRA, M. M., Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus Níger* in solid-state cultivation. **Journal of Industry of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 371 – 377, 2005

FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; 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.

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

GALIOTOU-PANAYOTOU, M, RODIS, P., KAPANTAI, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. **Letters Applied Microbiology**, v. 17, p.145-148, 1993.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.

GOMES, E., LEITE, R. S. R., DA SILVA, R., SILVA, D. Purification of an Exopolysaccharidase from *Penicillium viridicatum* RFC3 Produced in Submerged Fermentation. **International Journal of Microbiology** Volume 2009, Article ID 631942, 8 pages doi:10.1155/2009/631942.

GOMES, E., UMSZA GUEZ, M. A., MARTIN, N., DA SILVA, R., Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136 – 145, 2007.

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

HADJ-TAIEB, N.; AYADI, M.; KHLIF, M.; MRAD, K.; HASSAIRI, I.; GARGOURI A.. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p. 1072–1076, 2006.

HADJ-TAIEB, N., AYADI, M., TRIGUI, S., BOUABDALLAH, F., GARGOURI, A., Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanus*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 662 – 666, 2002.

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

HALTIWANGER, R. S., LOWE, J. B., Role of glycosilation in development. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 491 – 537, 2004

HASUNUMA, T.; FUKUSAKI, E. I.; KOBAYASHI, A. Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. **Journal of Biotechnology**, v. 106, p. 45-52, 2003.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude,significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641 – 55, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422 – 1432, 2001.

HERERT, C., O'CONNELL, R., GAULIN, E., SALESSES, V., ESQUERRE-TUGAYE, M. T., DUMAS, B., Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetic and Biology**, v. 41, p. 140 – 147, 2004

HESELTIME, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 517-532, 1972.

HO, P. L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 13, p. 24-26, 2000.

HOLKER, 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.

ISSHIK, A., AKIMITSU, K., ISHII, H. AND YAMAMOTO, H. Purification of polygalacturonases produced by pear pathogens, *Venturia naschicola* and *Venturia pirina*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 263-271, 2000

JACOB, N., POORNA, C. A., PREMA, P., Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6697 – 6701, 2007.

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

JURICK, W. M., II, VICO, I., MCEVOY, J. L., WHITAKER, B. D., JANISIEWICZ, W., CONWAY, W. S., Isolation, Purification, and Characterization of a Polygalacturonase Produced in *Penicillium solitum*-Decayed 'Golden Delicious' Apple Fruit. **Postharvest Pathology and Mycotoxins**, v. 99, n. 6, p. 636 - 641 2009.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKIS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural waste. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BLUSHAN, B.; SINGH, K.; 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 sunn 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. **Applied of Science** London, p.217-225, 2000.

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

KAVITHA, R., UMESH-KUMAR, S. Genetic improvement of *Aspergillus carbonarius* for pectinase overproduction during solid-state growth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 121 – 125, 2000

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.

KAWANO, C. Y., CHELLEGATTI, M.A., SAID, S., FONSECA, M. J., Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p. 133 – 140, 1999

KERTEZ, Z. I. Pectic enzymes. I. The determination of pectin-methoxylase activity **Journal of Biological Chemistry**, v. 121, p. 589-598, 1937.

KORNER, B.; ZIMMERMANN, G.; BERK, B. Orange pectinesterase: purification, properties and effect on cloud stability. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1203-1206, 1980.

KUHAD, R. C., KAPOOR, M., RUSTAGI, R. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 257 – 263, 2001

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

LASA, I.; BERENQUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potencial, **Microbiology Seminary**, v 9, p 77-89, 1993.

MACHINANDIARENA, M. F., WOLSKI, E. A., BARRERA, V., DALEO, G. R., ANDREU, A. B., Characterization and *in vitro* expression patterns of extracellular degradative enzymes from non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* AG-G. **Mycopathologia**, v. 159, p.441 – 448, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 10<sup>a</sup> ed., 2003.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MARGO, P.; VARVARO, L.; CHILOSI, G.; AVANZO, C. BALESTRA. G. M. Pectinolytic encimes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 117, p. 1-6, 1994.

MALDONADO, M. C., STRASSER DE SAAD, A. M., Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus Níger* on submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.**, v. 20, p. 34 – 38, 1998.

MALVESSI, E. DA SILVEIRA, M. M., Influence of médium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 47, p. 693 – 702, 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E.; Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives Biology and Technology**, vol.47, p. 813-819, 2004.

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

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.

MARTOS, M. A., VAZQUEZ, F. M., BENASSI, F. O., HOURS, R. A. Production of Pectinases by *A. niger*: Influence of Fermentation Conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3: p. 567-572, 2009.

MASSA, C., DEGRASSI, G. DEVESCOVI, G. VENTURI, V. LAMBA, D., Isolation, heterologous expression and characterization of na endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia*. **Protein Expression and Purification**, v. 54, p. 300 - 308, 2007.

MERTENS, J. A., BURDICK, R. C., ROONEY, A. P., Identification, biochemical characterization, and evolution of the *Rhizopus oryzae* 99 – 880 polygalacturonase gene family. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 1616 – 1624, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

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

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bireactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MOHAMED, S. A.; FARID, N. M.; HOSSINY, E. N.; BASSUINY, R. I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 54 – 64, 2006.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. **Cryptogamie Mycology**, v.18, p.19-69, 1997.

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

NAIDU, G. S. N., PANDA, T., Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 355 – 361, 2004

NAIR, S.R. E PANDA, T. Statistical optimization of medium componentes from improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 169-173, 1997.

NANDAKUMAR, M.P., THAKUR, M.S., RAGHAVARAO, K.S.M.S., GHILDYAL, N.P., Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 380-384, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

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

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 51, p: 711 -729, 1999.

NITURE, S. K., Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. **Biologia**, v. 63, p. 1 – 19, 2008.

NITURE, S. K., KUMAR, A. R., PANT, A., Role of glucose in production and repression of polygalacturonase and pectate lyase from phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276., **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 893 – 899, 2006.

NITURE, S. K.; PANT, A., Production of cell-wall degrading enzymes by pH tolerant estuarine isolate *Fusarium moniliforme* NCIM1276 in different culture conditions. **World Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1169 – 1177, 2007.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 305 – 314, 2004.

NITURE, S. K.; PANT, A., KUMAR, A. R., Active site characterization of the single endo-polygalacturonase produced by *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 832 – 840, 2001.



O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5544–5550, 2005.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *trichoderma reesei* rut c-30. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 33, p. 612 – 619, 2003.

PALANIYAPPAN, M., VIJAYAGOPAL, V., VISWANATHAN, R., VIRUTHAGIRI, T. Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281, **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 4, pp. 682-686, 2009

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. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed Column Bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14, p. 486-488, 1992.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054, 2006.

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.

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

- PESSOA, A. JR., KLIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos** Editora Manole, p. 456, 2005.
- PHUTELA, U. DHUNA, V.; SANDHU, 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.
- 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.
- PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnický, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRRSANSKÁ, 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.
- QUIROGA, E.N., SGARIGLIA, M.A., MOLINA, C.F., SAMPIETRO, D.A., SOBERÓN, J., VATTUONE, M.A. Purification And Characterization Of An Exopolygalacturonase From *Pycnoporus sanguineus*, **Mycological Research** (2009), doi: 10.1016/j.mycres.2009.09.007
- RAHARDJO, Y.S.P., TRAMPER, J., RINZEMA, A., Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**. v. 24, p. 161-179, 2006.
- RAIMBAULT, M., General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**. v. 1, p. 174-188, 1998.
- RASHAD, M. M., ABDU, H. M., SHOUSA, W. G. H., ALI, M. M., EL-SAYED, N. N., Purification and Characterization of Extracellular Polygalacturonase from *Pleurotus Ostreatus* Using Citrus Limonium Waste. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 1, p. 81-88, 2010.
- REID, I.; RICARD, M.. Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 26, p. 115–123, 2000.
- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.
- RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- SAAD, N., BRIAND, M., GARDARIN, C., BRIAND, Y., MICHAUD, Ph., Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 800 – 805, 2007.

SAITO, K., TAKAKUWA, N., ODA, Y. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC. **Microbiology 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

SAKAMOTO, T.; BONNIN, E.; QUEMENER, B.; THIBAUT, J-F. Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 10 – 18, 2002.

SALARIATO, D., DIORIO, L. A., MOUSO, N., FORCHIASSIN, F., Extraction and characterization of polygalacturonase of *Fomes sclerodermeus* produced by solid-state fermentation. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, p. 57-62, 2010.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SANTOS, M. M., ROSA, A. S. DAL'BOIT, S., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Technology**, v. 93, p. 261 – 268, 2004.

SATHISH-KUMAR, 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.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Short Note: Production and properties of pectinolytic enzymes from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 781 – 782, 1998.

SCANDURRA, R.; CONSALVI, V.; CHIARALUCE, R.; POLITI, L.; ENGEL, P.C. Protein thermostability in extremophiles. **Biochimie**, v .80, p. 933-941, 1998.

SCHEJTER, A. MARCUS, L., Isozymes of pectinesterases and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. **Methods Enzymology**, v. 161, p. 366 -373, 1988.

SCHIPPER, M.A.A.. *Thermomucor* (Mucorales). **Antonie van Leeuwenhoek J. Serol. Microbiol.** , v 45, p. 275 - 280, 1979.

SCHIPPER, M. A. A.; SAMSON, R. A.; STALPERS, J. A. Zygospore ornamentation in the genera *Mucor* and *Zygorhynchus*. **Persoonia** v 8, p. 321-328.,1975

SCHMIDELL, W. et al. (a) **Biociencia Industrial**. Volume 2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 247-270, 2001.

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

SCHNITZHOFER, W.; KANDELBAUER, A.; KLUG-SANTNER, B.; ONOS, M.; CALAFELL, M.; GUEBITZ, G. M. Production of cellulase-free polygalacturonase preparation by *Sclerotium rolfsii* for bioscouring of cotton. **Journal of Natural Fibers**, v 3, p.19 – 38, 2006.

SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M. editors. **Enzyme handbook 1**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

SEIBERT, F. B.; ANTO, J. Determination of polysaccharides in serum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 163, p. 511-522, 1946.

SEMENOVA, M.; SINITSYNA, O.; MOROZOVA, V.; FEDOROVA, E.; GUSAKOV, A.; OKUNEV, O.; SOKOLOVA, L.; KOSHELEV, A.; BUBNOVA, T.; VINETSKII, YU.; SINITSYN, A. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 598-602, 2006.

SERRAT, M., BERMUDEZ, R. C., VILLA, T. G., Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, p. 193 – 208, 2002.

SHARMA, D.C. E SATYANARAYANA T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 5, p. 727-733, 2006

SILVA, C.F; SCHWANM, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; LEITE, R. S. R., DA SILVA, R.; FERRERIA, 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.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.

SINGH, S. A.; RAO, A. G. A. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 35, p. 115–123, 2002

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

SINGH, R. F.; COOPER, R.M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 420-425, 1999.

SUBRAHAMANYAM, A.; B.S.; MEHROTRA, B. S.; THIRUMALACHER, M. J. *Thermomucor* — a new genus of Mucorales. **Georgia Journal Science.**, v. 35, p. 1-4, 1977.

SOLÍS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 36-41, 1993.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 455-458, 2003.

SPAGNA, G.; PIFFERI, P. G.; GILIOLI, E. Immobilization of a pectin lyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 17, p. 729-738, 1995.

SUNNOTEL, O.; NIGAM, P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 835-839, 2002.

TAGARANO, V.M., PILOSO, A.M.R., Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme of Microbiology and Technology**, v. 25, p. 411-419, 1999.

TEIXEIRA, M. F. S., LIMA FILHO, J. L., DURAN, N., Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 286 – 290, 2000.

THAKUR, A., PAHWA, R., SINGH, S., GUPTA, R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme Research** Volume 2010, Article ID 170549, 7 pages doi:10.4061/2010/170549.

TRUFEM, S.F.B. 1984. Mucorales do Estado de São Paulo. 4. Espécies coprófilas. *Rickia*, 11:53-64.

TUITE, J. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria**. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. 239 p., 1969

VERSTEEG, C. Pectinesterases from the orange fruit – their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. Agricultural University of Wageningen, **Agricultural Research Report**, v. 4, p. 969-974, 1979.

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.

VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J. McCANN, M. C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G., VISSER, R. G., If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781 – 1789, 2003.

VINAEGRA-GONZÁLEZ, G., FAVELA-TORRES, E., AGUILAR, C.N., RÓMERO-GOMÉZ, S.J., DÍAZ-GODÍNEZ, G., AUGUR, C., Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

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

YADAV, S., SHASTRI, N. V., Purification and properties of an extracellular pectin lyase produced by the strain of *Penicillium oxalicum* in solid-state fermentation. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p. 247 – 251, 2007.

YADAV, S., YADAV, P. K., YADAV, D., YADAV, K. D. S., Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1 – 10, 2009.

YADAV, S., YADAV, P. K., YADAV, D., YADAV, K. D. S., Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 547 – 552, 2008.

YAN, H. Z., LIOU, R. F., Cloning and analysis of pppg1 an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. **Fungal Genetics Biology**, v. 42, p. 339 – 350, 2005.

YAO, C., CONWAY, W.C. AND SAMS, C.E. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. **Biochemistry. And Cellular Biology**, v. 86, p. 1160-1166, 1996.

USTOK, F. I., TARI, C., GOGUS, N., Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 322 – 334, 2007.

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

## CAPITULO II

### PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO FUNGO TERMOFÍLICO BRASILEIRO *Thermomucor* *indicae-seudaticae* N31 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO.

Este artigo está publicado: *ISSN 0026-2617, Microbiology, 2010, Vol. 79, No. 3,*  
*pp. 306–313.*



**Pectinase Production by a Brazilian Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in Solid-State and Submerged Fermentation**

**N. Martin<sup>a</sup>, M. A. U. Guez<sup>a</sup>, L. D. Sette<sup>b</sup>, R. Da Silva<sup>a</sup>, and E. Gomes<sup>a,1</sup>**

**(Footnote 1: Corresponding author; e-mail: eleni@ibilce.unesp.br),**

<sup>a</sup> UNESP- Universidade Estadual Paulista, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada-IBILCE, São José do Rio Preto/SP, Brazil.

<sup>b</sup> UNICAMP – University of Campinas, Divisão de Recursos Microbianos/CPQBA, Paulínia/SP, Brazil

**Abstract** - Thermophilic organisms produce thermostable enzymes, which have a number of applications, justifying the interest in the isolation of new thermophilic strains and study of their enzymes. Thirty-four thermophilic and thermotolerant fungal strains were isolated from soil, organic compost, and an industrial waste pile based on their ability to grow at 45°C and in a liquid medium containing pectin as the only carbon source. Among these fungi, 50% were identified at the genus level as *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Chaetomium*, *Neosartoria*, *Scopulariopsis*, and *Thermomucor*. All isolated strains produced pectinase during solid-state fermentation (SSF). The highest polygalacturonase (PG) activity was obtained in the culture medium of thermophilic strain N31 identified as *Thermomucor indicae-seudaticae*. Under SSF conditions on media containing a mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1) at 70% of initial moisture, this fungus produced the maximum of 120 U/ml of exo-PG, while in submerged fermentation (SmF) it produced 13.6 U/ml. The crude PG from SmF was more thermostable than that from SSF and exhibited higher stability in acidic pH

**Keywords:** Pectinase, thermophilic fungus, *Thermomucor*, fermentation, thermostable enzyme, polygalacturonase

## II.1. Introduction

The majority of works on pectinase production by fungi refers to mesophilic strains [1], and only few studies have been carried out with thermophilic fungi [2, 3, 4]. However, the interest in enzyme production by thermophilic microorganisms has recently increased, especially due to their biochemical and physicochemical properties and inherent stability [5, 4]. On the other hand, a number of thermophilic fungal genera have been described, such as *Canariomyces*, *Chaetomium*, *Coonemeria*, *Corynascus*, *Dactylomyces*, *Malbrenchea*, *Melanocarpus*, *Myceliophthora*, *Paelomyces*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Rhizomucor*, *Thermomucor*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Acrophialophora*, *Stibella*, *Taloromyces*, and *Thielavia* [6]. Therefore, the isolation of thermophilic microorganisms and the subsequent identification of their thermostable enzymes is an useful approach to the development of new biotechnology tools.

Fungi have been considered among the most important industrial microorganisms mainly due to their capacity for secretion of the enzymes which carry out the degradation of plant cell walls, such as cellulases, xylanases, ligninases, and pectinases, as well as their ability to grow on solid substrates and therefore applicability to solid-state fermentation (SSF) [7]. However, some fungi secrete higher levels of lignocellulolytic enzymes in submerged fermentation (SmF) than in SSF [8]. The effect of culture conditions on enzyme production has been attributed to the water activity and humidity of the media [9], to the catabolic repression, to the available substrate levels [10] and to the structure of cell membrane, which may change accordingly to the growth conditions [11]. Thus, the evaluation of fermentation systems to be used and the understanding of the way the microorganisms adapt to SSF and SmF conditions are essential to the improvement of the enzyme production [12].

The major problem concerning the fermentation processes is the dissipation of the heat generated from microbial growth, which can inhibit the microbial metabolism. In this context, the use of microorganisms that are able to grow at higher temperatures could facilitate this process [13].

In the present investigation we report the isolation and selection of thermophilic fungal strains capable of growing in the medium with pectin as the only carbon source, and the use of one selected isolate for pectinase production in SSF and SmF by using agro-industrial waste as carbon source. Additionally, a

comparative study on the physicochemical properties of the enzymes produced in both fermentative systems was presented.

## **II.2. Material and Methods**

*II.2.1. Microorganisms: isolation, identification and maintenance.* The thermophilic and thermotolerant fungal strains were isolated from soil, organic compost and an industrial waste pile. Samples (2g) were pooled and homogenized in sterile medium containing the following (g/l): citrus pectin, 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2; and 10 (ml/l) of trace elements solution (5 mg/l  $\text{FSSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.6 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1.4 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.0 mg/l  $\text{CoCl}_2$ ); pH 5.0. The inoculated medium was incubated at 45°C for 24 h and a loop of the homogenized culture was then streaked on agar plates (30 g/l) containing the same medium, and incubated at 45°C for 24 to 72 h. The organisms with morphologically different colonies were isolated by repeated streaking. Pure cultures were subcultured on slants of the same medium for identification and enzymatic studies.

In general, identification of filamentous thermophilic fungi was based on the morphological and biochemical characteristics [14]. However, the selected fungal strain N31 was identified by both conventional and molecular approaches. Morphological characterization was carried out by colony observation through a stereomicroscope (Leica MZ6, Wetzlar, Germany) and by the observation of squashed lumps stained with lactophenol and cotton blue under a light microscope (Leica DM LS, Wetzlar, Germany) [15]. Molecular identification was performed by 28S rRNA D1/D2 gene sequencing and phylogenetic analyses as described by Sette [16].

The stock cultures were maintained at 7°C on Potato Dextrose Agar medium (PDA) under water and mineral oil, at room temperature.

*II.2.2. Effect of temperature on fungal growth.* In order to investigate the performance of strains at various temperatures, mycelial hyphae from pure cultures were spotted on agar plates and incubated at 27, 35, 40, 45, 50 and 55°C. The diameters of the colonies were measured at 12 h intervals.

*II.2.3. Enzyme production in solid-state (SSF) and in submerged (SmF) fermentations.* The solid substrates wheat bran, sugarcane bagasse, and orange bagasse (compressed mixture of pulp, peel and seeds) were obtained and processed as described previously [13]. Five grams of mixtures of wheat bran, orange and sugarcane bagasse at variable proportions (wt/wt) were placed in 250-ml Erlenmeyer flasks, and sterilized at 120°C for 40 min. This substrate was inoculated with 10 ml of a spore suspension, consisting of spores obtained from 1-day agar slant cultures in a sterile nutrient solution containing 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The material was moistened to 70% with sterile distilled water. The fermentation was carried out at 45°C for 12 days. Every day, one flask was removed and the fermented material was mixed with 8 ml of distilled water per gram of fermented material, stirred for 30 min, filtered, and centrifuged at 10,000 g, at 6°C. The supernatant was used as a crude enzyme solution.

The submerged fermentation (SmF) was carried out in 125 ml Erlenmeyer flasks, each with 20 ml of medium containing the following (g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 10; and supplemented with 20 g/l of the carbons source (citrus pectin with degree of esterification (D.E.) of 67% (kelco), wheat bran, orange bagasse, or a mixture (1:1) of wheat bran and orange bagasse). This substrate was inoculated with 10 ml of a spore suspension, consisting of spores obtained from 1-day agar slant cultures in a sterile nutrient solution of 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Fermentation was carried out on a rotary shaker at 100 rpm for 120 h at 45°C. Every 24 h, one flask was removed and the biomass was separated by filtering through Whatman No. 1 paper in a Büchner funnel. The filtrate was used for the evaluation of the enzyme activity.

The fermentation experiments were performed in triplicate and the results are reported as means.

*II.2.4. Enzyme activity measurements.* Exo-polygalacturonase (exo-PG) activity was assayed by the DNS method [17] to quantify the number of reducing groups, expressed as galacturonic acid, released by enzymatic action in a controlled reaction, carried out in a solution containing 1% of citrus pectin (67% esterified with methyl groups – Sigma) in 0.2M sodium acetate buffer (pH 5.5) at 60°C for 10 min. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release one  $\mu\text{mol}$  of galacturonic acid per minute under these assay conditions.

*II.2.5. Enzyme characterization.* Optimal activity of PG was assayed as a function of pH, using acetate (pH 3.0-5.0), citrate–phosphate (pH 5.0-7.0), Tris–HCl (pH 7.0-8.5) and glycine–NaOH (pH 8.5–10.5) as buffers at 60°C, and 1% of citrus pectin (Sigma) with D.E. of 67% as substrate. The effect of temperature on PG activity was determined by incubating the reaction mixture at temperatures ranging from 35 to 75°C, at optimum pH. Both assays were carried out according to the procedure described above.

The thermal stability was investigated by measuring the enzyme activity after incubation of the enzyme solution for 1 h, in the absence of substrates, at temperatures between 30°C and 70°C. Another experiment was carried out maintaining the crude enzyme solution at 60°C for 2 h, in the absence of substrates. Remaining PG activity was determined at optimum pH and temperature, using 67% D.E. citrus pectin as substrate.

pH stability of the crude enzyme was evaluated by mixing the enzyme solution and 0.1 M buffers of pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (Tris-HCl) and pH 8.5-11.0 (glycine-NaOH), to the final proportion of (1:1 vol/vol). These solutions were incubated at 25°C for 24 h. An aliquot was taken to determine the remaining enzyme activity at the optimum pH and temperature.

### **II.3. Results and discussion**

*II.3.1. Isolation, selection and identification of thermophilic pectinolytic fungal strains.* Thirty-four thermophilic fungi with ability to grow at 45°C on a liquid medium containing pectin as the only carbon source were isolated from 40 collected samples. Some strains were identified as representatives of the genera *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Neosartoria*, *Scopulariopsis*, and *Thermomucor*, which are all described as thermophilic or thermotolerant. The number of thermophilic strains isolated was low considering the total microbial population that can be found in a decaying plant. However, according to Maheshwari [6], few thermophilic fungal species are known (around 30), in comparison with more than 75,000 mesophilic forms already described.

When the capacity for pectinase production by the thermophilic fungi in SSF was evaluated, it was observed from 1 up to 87 U per gram of substrate. The

highest PG activity (87.3 U/g) was achieved by *Thermomucor* N31 (Fig 1), which was selected for use in other assays and for species identification procedures.

Data derived from BLAST analysis (28S rDNA D1/D2 region) showed that strain N31 shared a high sequence similarity (99%) with the type strain of *Thermomucor indicae-seudaticae* (NRRL 6429) and that these two fungal strains form a cluster in the phylogenetic tree (Fig. 2) supported by a 100% bootstrap value. In addition, data of the morphological identification were corroborative with the molecular data, allowing the affiliation of strain N31 to the genus and species *Thermomucor indicae-seudaticae* (*Fungi*; *Zygomycetes*; *Mucorales*; *Mucoraceae*).

The effect of incubation temperature on *T. indicae-seudaticae* N31 growth on solid medium is presented in Fig. 3. The maximum growth rate at 45-50°C confirms its thermophilic profile. According to Mouchacca's taxonomic review [18], fungi with optimal growth temperatures above the mesophilic range consist of a few *Rhizomucorales*, *Eurotiales*, *Sphaeriales*, and *Hyphomycetes*, and of agonomycete species. Among the *Rhizomucorales*, there are thermophilic species in the genera *Rhizomucor* and *Thermomucor*. In a recent revision of the genus *Absidia* (*Mucorales*, *Zygomycetes*), the fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* formed a clade, based on the actin gene, with other thermotolerant or thermophilic species like *Rhizopus oryzae* and *R. microsporus* [19]. It is worth mentioning that, in the present study, results from rDNA phylogeny based on 28S rDNA D1/D2 of 21 *Mucorales* species were corroborative with Hoffmann's data based on the actin gene [19]. A 28S rDNA phylogenetic tree is represented in Fig 2, in which *Mucorales* form a monophyletic clade to the *Mortierellales* outgroup, supported by a bootstrap of 100%, and the mesophilic species are well-separated from the thermotolerant ones. Therefore, phylogenetic relationships based on actin [19] and 28S ribosomal DNA nucleotide sequences confirm the thermophilic profile of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

*II.3.2. Polygalacturonase production by T. indicae-seudaticae N31 in SSF and in SmF.* After screening for pectinolytic activity, the strain *T. indicae-seudaticae* N31 was selected for subsequent SSF and SmF assays at 45°C. The table shows that the fungus exhibited exo-PG activity when grown on various agro-industrial wastes such as orange bagasse, wheat bran and sugarcane bagasse with 70% of initial moisture. The data showed that wheat bran was an effective medium for PG production. The addition of orange bagasse to wheat bran increased the enzyme

activity up to 108 U/ml (mixture of wheat bran, orange bagasse, and sugar cane bagasse (2:2:1). Lignocellulosic material was successfully used as carbon source for SSF due to its degradability and to the presence of various nutrients besides the carbon source [20].

According to Martins [13] and Silva [21] the sugar cane bagasse increased production of pectinases by *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 and *Penicillium viridicatum* RFC3 by enlarging the interparticle space, which improves the aeration, the nutrient and enzyme diffusion, and the heat transfer rates in the fermentation media. However, improvement of enzyme production by sugarcane bagasse addition was not observed in this study.

The total enzyme activity in the crude enzyme extracts obtained from SSF was higher than in SmF. There was no difference between the enzyme activities in SmF when media with wheat bran and a mixture of wheat bran and orange bagasse were used, but both conditions produced higher levels than that obtained with the medium containing citrus pectin (Table 1).

Several investigators have observed lower production of extracellular enzymes in SmF than in SSF since the conditions of SSF are more similar to fungal growth conditions in nature [22]. The data obtained by Silva [23] showed that PG production by *P. viridicatum* RFC3 was lower in SmF than in SSF. A similar result was reported by Morita *et al.* (1998), in which the maximum production of polygalacturonase was observed at  $a_w$  of 0.99, whereas the synthesis of  $\beta$ -glucosidase was increased at  $a_w$  between 0.96 and 0.98. The production of extracellular enzymes such as amylases, glucoamylases, xylanases, tannases and invertases was higher in SSF when compared with SmF [9]. The differential expression of proteins in SSF and SmF has been attributed to the effect of low  $a_w$  and physical barriers to the hyphal extension on the enzyme expression [22, 25]. The presence of proteases in the fermentation medium has also been associated with a more pronounced decrease in the activity of the target enzyme during the fermentation process in liquid medium, reflecting a lower productivity in this type of culture [26].

In spite of this, the of PG activity observed in the present work was similar to the amount reported for PG production in SmF. *Aspergillus niger* produced 14.5 U/ml of pectinases in the medium containing citrus pectin [27]. The related *Aspergillus sojae* produced 15.5 U/ml of pectinases in the medium supplemented with maltrin [28]. On the other hand, it was lower than the value obtained by Patil

and Dayanand [29] (30.3 U/ml) from *Aspergillus niger* DMF 27 when they used deseeded sunflower and glucose as carbon sources.

*II.3.3. Properties of PG from SSF and SmF.* Fig. 4a shows that the optimum pH for PG from SmF condition was 5.0 while from SSF was 4.0 -5.0. However, when in absence of a substrate, the PG from SmF was more stable in acidic pH while the PG from SSF was more stable in alkaline pH. Both enzymes retained above 80% of maximum activity in the pH range from 3.0 to 10.0 (Fig. 3b). The results reported by Acuña-Argüelles [30] showed that PG from *A. niger* obtained in SSF and SmF conditions were stable between pH 3.5 and 5.0 and 4.0 and 5.0, respectively.

The maximum PG activity was observed at 60°C (Figure 4c) for both SSF and SmF and is consistent with the optimum temperature reported for polygalacturonase from thermophilic *T. lanuginosus* [2] and *Sporotrichum thermophile* (55°C) [3].

In the absence of the substrate, the PG from SmF showed an increase of activity when incubated for 1 h at temperatures over 40°C, reaching 120% of the initial activity after 1 h at 60°C, while the enzyme from SSF lost 80% of its activity at 60°C (Fig. 4d). When the enzymes were incubated at 60°C for periods from 5 to 120 min, this difference was confirmed. The enzyme from SmF had the activity increased after 1 h at 60°C, although a slight decrease was observed during the first minute at this temperature. The PG from SSF lost 85% of activity after 20 min at 60°C (Fig. 4e). Data obtained by Acuña-Argüelles [30] revealed that the exo-PG produced by *A. niger* from SSF was more stable at 60°C than that obtained from SmF. The same was reported for amylase obtained from *Rhizopus homothalicus* [31]. However, the opposite was observed in this work, whereas PG from SmF showed to be more thermostable than that from SSF.

Intrinsic properties of microbial extracellular proteins such as temperature and pH optima for activity, thermostability, stability in different pH ranges and substrate affinity are often affected by the type of fermentation process used for their production [32]. Our data revealed that PG from SmF was more stable at acidic pH and more thermostable than that from SSF. It is worth mentioning that the main difference between the microorganism used in the present work and others reported in the literature is its thermophily. Probably, the fungus cultivation at 45°C could have influenced the enzymes properties.



Thus, the thermophilic fungus isolated from a compost pile and identified in the present study as *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produced higher quantity of PG in SSF than in SmF in accordance to the results reported for other fungal genera. However, it is important to highlight that the PG obtained in SmF was more stable at high temperature and acid pH than those obtained from SSF in contrast to several studies, in which enzymes from SSF displayed more stability at acid pH and high temperature than those from SmF.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) for financial support.

## II.4. References

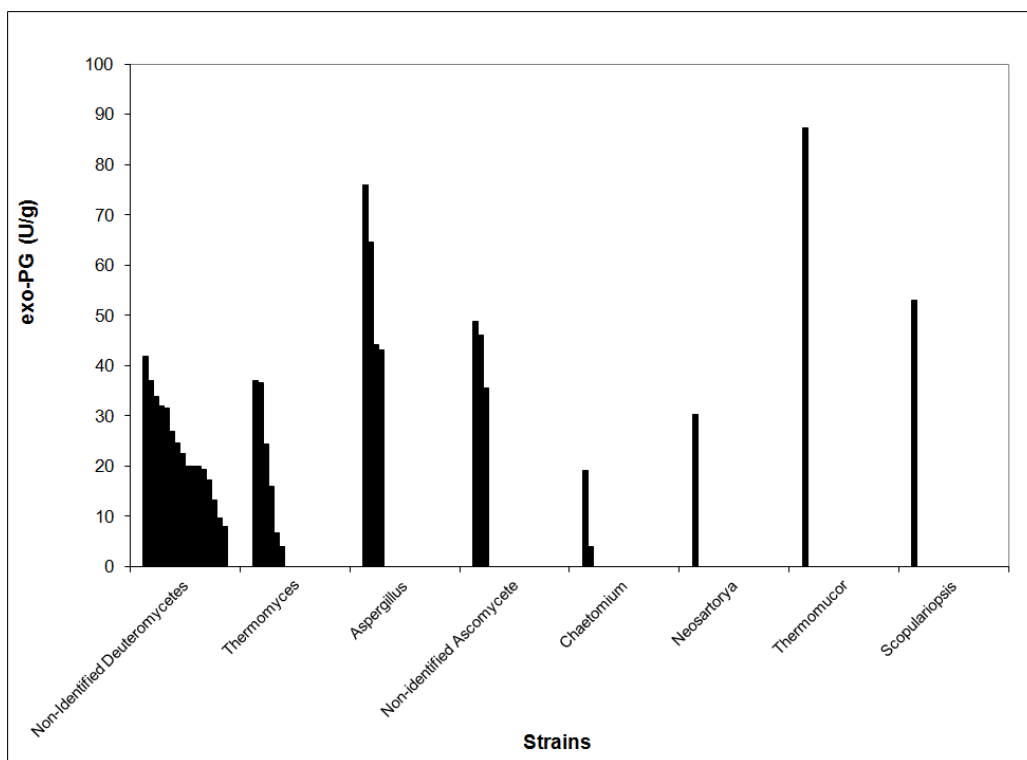
1. Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C., Pectin and Pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes., *Open Biotechnol J.*, 2009, vol. 3, pp 9 - 18.
2. Sathish-Kumar, S, and Palanivelu, P., Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus.*, *World J Microb Biot.*, 1999, vol. 15, pp 643-646.
3. Kaur, G., Kumar, S., Satyarayana, T., Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis., *Bioresource Technol.*, 2004, vol. 94, pp 239-243.
4. Martins, E.S., Silva, D., Leite, R.S.R., Da Silva, R., Gomes, E., Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation., *Anton Leeuw Int. J. G.*, 2007, vol. 91, pp 291 – 299.
5. Anisha Rojan, G.S., John, P., Prema, P., Biochemical and hydrolytic properties of multiple thermostable  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*: Obvious existence of a novel galactose-tolerant., *Process Biochem.*, . 2009, vol. 44, pp 327-333.
6. Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bath, M.K., Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, pp 461-488.
7. Santos, M.M., Rosa, A.S., Dal'Bort, S., Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes., *Bioresource Technol.*, 2004, vol. 93, pp 261 – 268.
8. Taragano, V.M. and Pilosof, A.M.R., Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation., *Enzyme Microb Tech.*, 1999, vol. 25, pp 411-419.
9. Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K., Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1990, vol. 33, pp 501 - 505.
10. Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K., Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ -amilase production by *Bacillus licheniformis* M27., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, vol. 35, pp 591 – 593.
11. Diaz-Godinez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., Viniestra-Gonzalez, G., Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study., *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 2001, vol. 26, pp 271.

12. Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G., *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition., *Bioresource Technol.*, 2008, vol. 99, pp 457-462.
13. Martins, E.S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E., Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*., *Process Biochem.*, 2002, vol. 37, pp 949-954.
14. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Daird, J.C., Stalpers, J.A., Ainsworth Bisby's *Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford. 9<sup>a</sup> ed. 2001.
15. Da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C., Sette, L.D., Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterization and RBBR decolorization screening., *Environ Technol.*, 2008, vol. 29, pp 1331-1339.
16. Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F., Duarte, M.C.T., Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants., *World J Microb Biot.*, 2006, vol. 22, pp 1185–1195.
17. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar., *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, pp 426-428.
18. Mouchacca, J.M.. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. *Cryptog, Mycology.*, 1997, vol.18, pp. 19-69,
19. Hoffmann, K., Discher, S., Voigt, K., Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. nov., *Mycol Res.*, 2007, vol. 111, pp 1169-1183.
20. Martin, N., Souza, S.R., Da Silva, R., Gomes, E., Pectinase production by fungal strains in solid – state fermentation using agro – industrial bioproduct., *Braz Arch Biol Technol.*, 2004, vol. 47, pp 813 – 819.
21. Silva, D., Martins, E.S., Da Silva, R., Gomes, E., Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products., *Braz. J. Microbiol.*, 2002, vol. 33, pp 318-324.
22. Aguilar, C.N., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez, R., Prado, L.A., Loera, O., Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures, *Food Sci. Biotechnol.*, 2004, vol. 13, pp 109-113.
23. 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 Biochem.*, 2007, vol. 42, pp 1237–1243.
24. Morita, H. And Fujio, Y., Polygalacturonase production of *Rhizopus* sp. MKU 18 using a metal-ion-regulated liquid medium., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1999, vol. 45, pp 199 – 201.

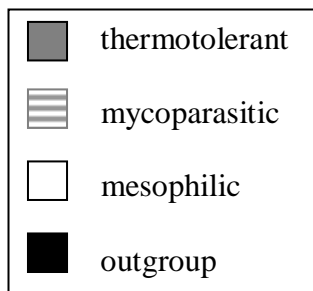
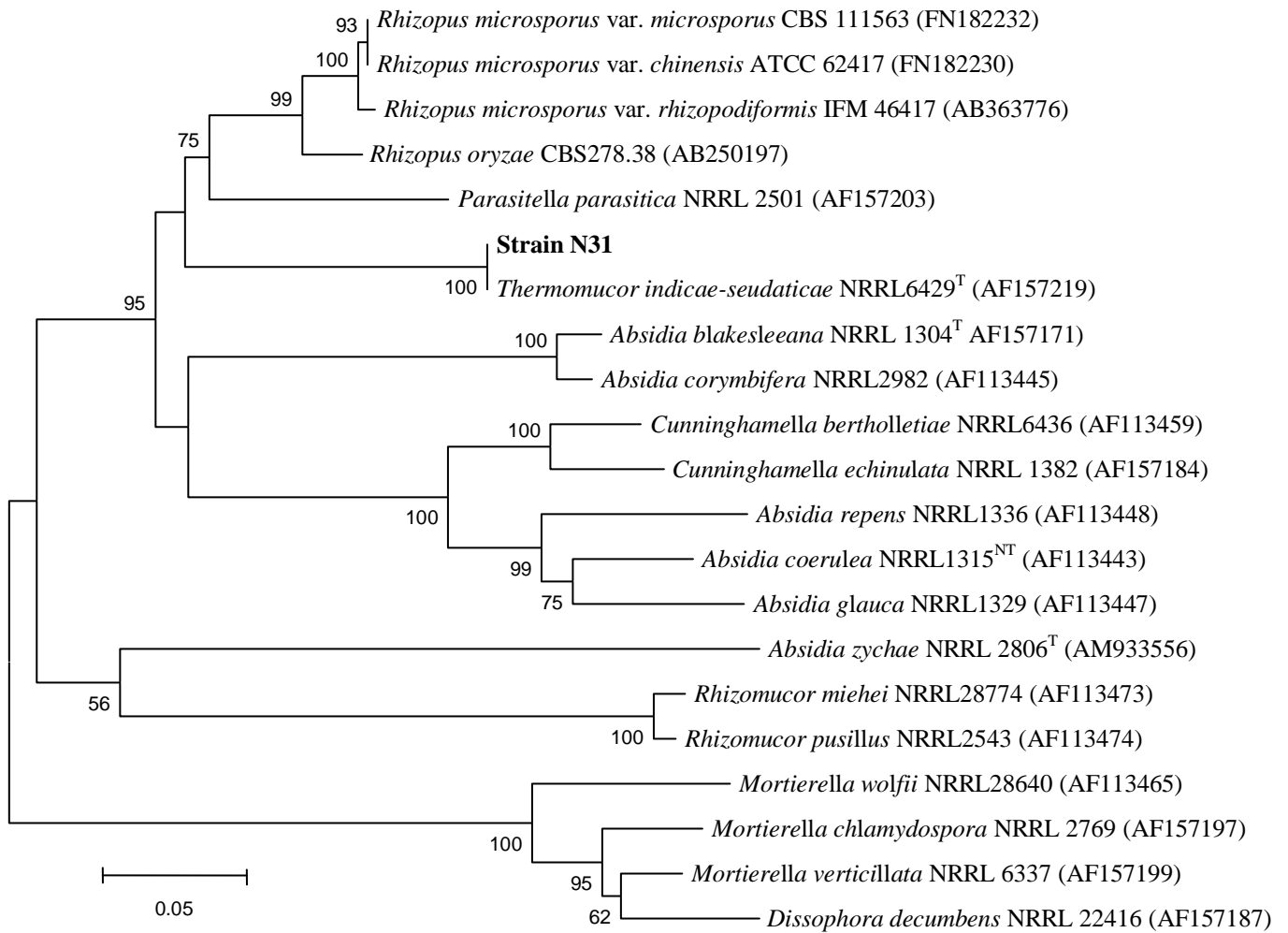
25. Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y.S.P., Hoogschagen, M.J., Heerikhuisen, M., Levin, A., Van Driel, K.G.A., Schutyser, M.A.I., Dijksterhuis, J., Zhu, Y., Weber, F.J., De Vos, W.M., Van Den Hondel, K.A.M.J.J., Rinzema, A., Punt, P.J., *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project., *FEMS Yeast Research.*, 2002, vol. 2, pp 245-248.
26. Viniestra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J., Díaz-Godínez, G., Augur, C., Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems., *Biochem Eng J.*, 2003, vol. 13, pp 157–167
27. Galiotou-Panayotou, M., Rodis, P., Kapantai, M., Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin., *Letters Appl Microbiol.*, 1993, vol. 17, pp 145-148.
28. Tari, C., Göğüs, N., Tokatli, F., Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology., *Enzyme Microb Tech.*, 2007, vol. 40, pp 1108-1116.
29. Patil, S.R. and Dayanand, A., Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions., *Bioresource Technol.*, 2006, vol. 97, pp 2340-2344.
30. Acunã-Argüelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-González, G., Favela-Torres, E., Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1995, vol. 43, pp 808–814.
31. Diaz, J.C.M., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J., Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures., *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, vol. 39, pp 1042-1050.
32. Alazard, D. and Raimbault, M., Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation, *European J Appl Microbiol Biotechnol.*, 1981, vol. 12, pp 113-117.

**Figure 1:** Production of PG by thermophilic fungal strains isolated in SSF.

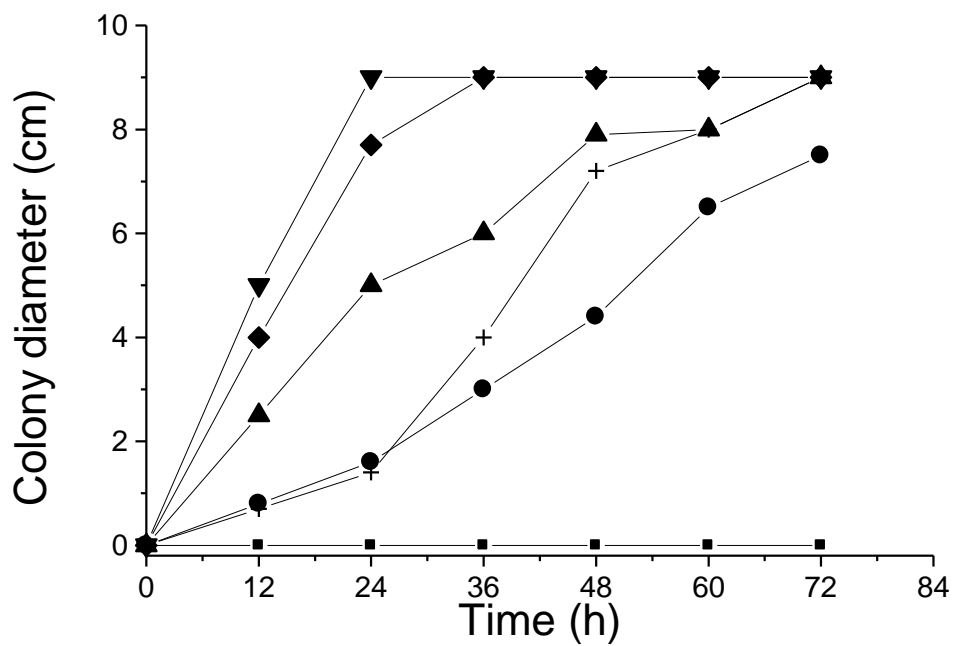
Strains: non-identified deuteromycetes (16); *Thermomyces* (6); *Aspergillus* (4); non-identified ascomycete (3); *Chaetomium* (2); *Neosartoria* (1); *Scopulariopsis* (1); and *Thermomucor* N31 (01)



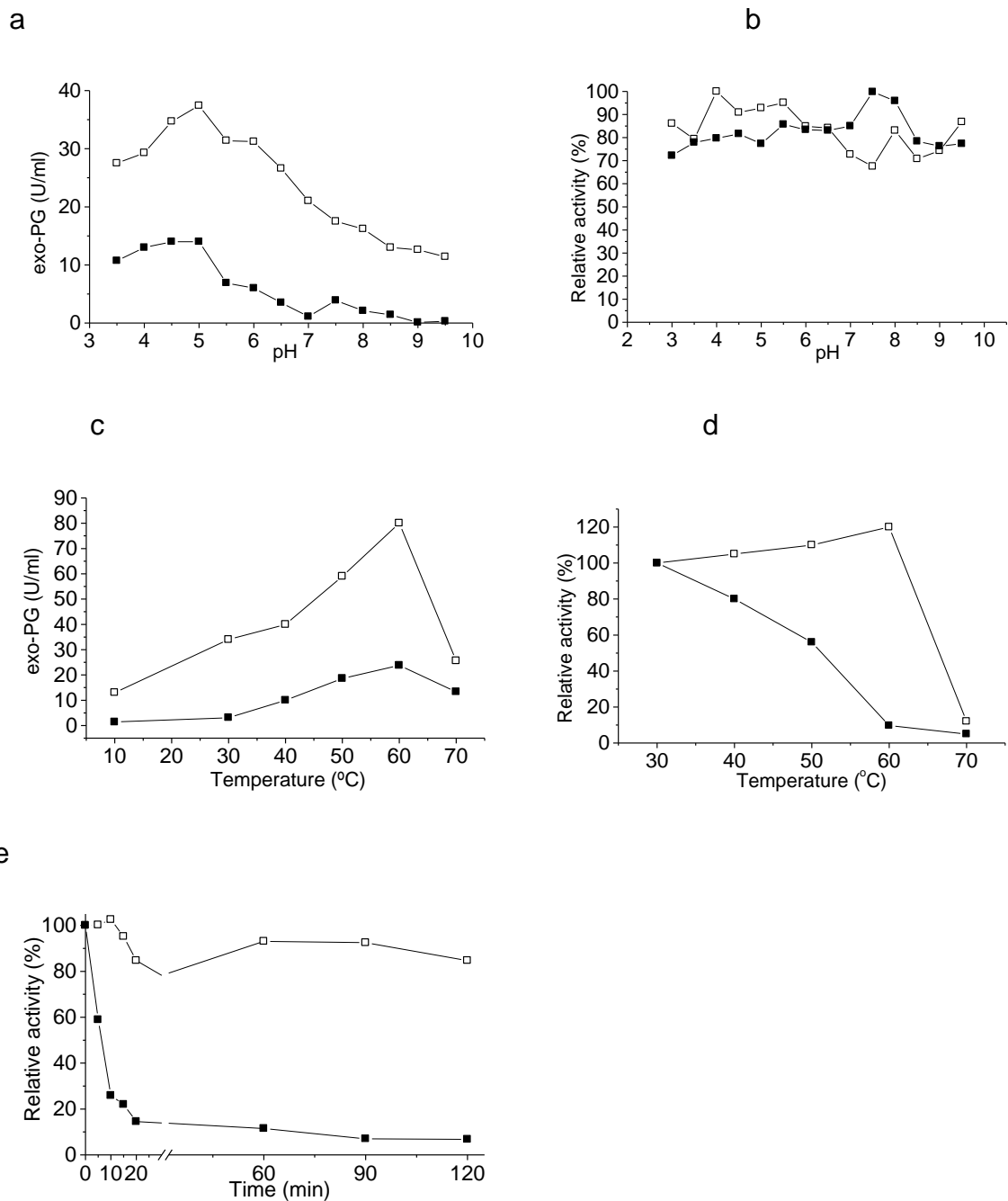
**Figure 2:** Phylogenetic tree based on 28S rDNA D1/D2 analyses showing closest relatives of thermophilic fungal strain N31 (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm). Bootstrap values (1,000 replicate runs) greater than 50% are listed.



**Figure 3:** Effect of temperature on mycelial growth of *T. indicae-seudaticae* N31 on solid PDA medium. ■=27°C; ●=35°C; ▲= 40°C ; ▼=45°C; ◆=50°C; +=55°C .



**Figure 4 :** Physicochemical properties of PG produced by *T. indicae-seudaticae* N31 in SSF and SmF. Effect of pH and temperature on the PG activity (a, c); effect of pH and temperature on the stability of enzymes when in absence of substrate (b, d, e). □=submerged fermentation; ■=solid state fermentation.





**Table 1:** Polygalacturonase production by *T. indiciae-seudaticae* N31 from SSF and SmF with different carbon sources

<b>SSF</b>			
<b>Culture media composition (w/w)</b>	<b>Maximum PG production (U of enzyme per gram of substrate used)</b>	<b>Maximum PG production (U of enzyme in 40 ml of crude enzyme solution)</b>	<b>U Cultivation time (h)</b>
Wheat bran	98.0	488	192
70% wheat bran 30% orange bagasse	87.3	436	24
50% wheat bran 50% orange bagasse	105.0	524	48
50% wheat bran 50% sugarcane bagasse	100.0	500	48
50% orange bagasse 50% sugarcane bagasse	40.0	200	288
40% orange bagasse, 40% wheat bran, 20% sugarcane bagasse	108.0	540	48
<b>SmF</b>			
70% orange bagasse, 20% sugarcane bagasse, 10% wheat bran	57.2	284	48
<b>Carbon source of media</b>			
Wheat bran 2%	12.8	256	72
Wheat bran 1% + orange bagasse 1%	13.6	272	96
Citrus pectin 2%	9.5	190	72

### CAPITULO III

*Purificação e caracterização de exo-  
Poligalacturonase de um termofílico  
Thermomucor indicae-seudaticae N31  
produzida em fermentação em estado sólido  
e fermentação submersa.*

**Purification and characterization of exo-polygalacturonases from the thermophilic *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produced in solid state and submerged fermentation**

Natalia Martin, Roberto da Silva, Eleni Gomes\*

*Laboratorio de Bioquimica e Microbiologia Aplicada, Ibilce, Universidade Estadual Paulista-Unesp, Rua Cristovao Colombo, 2265, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, S.P., Brazil, CEP 15054-000.*

**\*Correspondent author, phone nº +55 17 32212393, fax +55 17 32212390.**

*E-mail address: [eleni@ibilce.unesp.br](mailto:eleni@ibilce.unesp.br) (E. Gomes).*

**Running title:** Purification of a polygalacturonase from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

---

**Abstract**

Exo-polygalacturonases (exo-PG) isolated from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in submerged fermentation and in solid state fermentation were purified to homogeneity. The enzymes obtained through submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF) exhibited apparent molecular weight of 38.9 kDa and 37.1 kDa, and glycosylation levels of 31.2 and 22.2, respectively. The identified optimum pH were 5.5 for the enzyme from SmF and 4.5-5.0 for the exo-PG from SSF, and the optimum temperature for both enzymes ranged from 55 to 60°C. Both enzymes hydrolyzed preferentially pectin with low degree of esterification (26%D.E.), and released only galacturonic acid, the product therefore proving them to be exo-PGs. The  $K_m$  were 590.9 and 661.6 mg ml<sup>-1</sup> and the  $V_{max}$  were 4 and 4.9 µmol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> for the PG from SmF and SSF, respectively. The kinetic parameters for thermal inactivation indicate that the exo-PG from SmF was more thermostable than the PG from SSF.

*Keywords:* *Thermomucor indicae-seudaticae*, thermophilic fungi, polygalacturonase thermostable, submerged fermentation, solid state fermentation

### III.1. Introduction

Pectinases is a group of enzymes which includes protopectinases capable of degrading insoluble pectin, esterases able to catalyze the de-esterification of pectin by removing the methoxyl esters groups, and depolymerases that cleave  $\alpha$ -(1→4)-glycosidic bonds by hydrolysis or trans-elimination mechanisms. Polygalacturonases are depolymerizing pectinases that catalyse the hydrolysis of the glycosidic bonds in pectin in a random fashion (endo-polygalacturonase- EC.3.2.1.15), or remove monogalacturonate units from the non-reducing end of homogalacturonan, releasing galacturonic or digalacturonic acid residues (exo-polygalacturonases EC.3.2.1.67 and EC 3.2.1.82) [1].

The pectinase properties and its production by fungi can vary accordingly to the composition of the medium, to the physicochemical conditions, and to the fermentative system employed, such as solid state (SSF) or submerged fermentations (SmF) [2].

The purification of PG is an important step to achieve the understanding of its properties and to elucidate its structure and functional mechanism. In general, fungal PGs are monomeric proteins, with a carbohydrate content of 5-81% and molecular masses ranging from 13 to 82 kDa [3; 4; 5; 6].

Although a large number of fungal pectinases have already been purified, only a few of them were produced by thermophilic fungi such as *Acrophialophora nainiana* [7], *Thermoascus aurantiacus* [8], and *Thermomyces lanuginosus* [9]. Therefore, the isolation of a great number of thermophilic microorganisms and the subsequent purification of their thermostable pectinases are crucial procedures to increase the general knowledge regarding the structural and functional properties of these enzymes, so that it may be equivalent to the mesophilic ones.

In this paper, we report the purification of an exo-polygalacturonase produced by the thermophilic *Thermomucor indicae-seudaticae*N31 both in submerged and solid state fermentation systems, and their physicochemical and thermostability properties, under a comparative view.

### III.2. Material and Methods

*III.2.1. Microorganism.* The microorganism used was *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, isolated from decaying sugar cane bagasse, in São José do Rio Preto, SP, Brazil

and identified as described in Martin et al. [10]. The stock culture was maintained on Sabouraud dextrose agar (Oxoid) containing 0.3% of citrus pectin, at room temperature.

*III.2.2. Fermentation systems and enzyme production.* Polygalacturonase was obtained both from submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF). The submerged fermentation was carried out in a 250 ml Erlenmeyer flask containing 40 ml of sterilized (120°C / 30 min) liquid medium, containing 1.0 % ground orange bagasse (pulp and rind from juiced oranges) provided by Bascitrus [Mirassol, SP], 1.0% wheat bran and the following nutrients ( $\text{g L}^{-1}$ ): 1.0  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1.0  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.11  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.05  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.016,  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.016  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.011  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.5 EDTA. The medium was sterilized at 120°C for 30 min, inoculated with a volume of conidial suspension equivalent to  $10^7$  spores per ml in the final medium, and incubated at 45°C for 24 h. The fermented material was filtered and centrifuged at 10,000  $\times g$  for 15 min at 4°C. The supernatant was used as crude enzyme solution.

The solid state fermentation was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks with 5g of a 1:1 (w/w) mixture of wheat bran and dried orange bagasse, sterilized at 120°C for 40 min. This substrate was inoculated with a volume of conidial suspension in sterile solution of the nutrient solution described above (equivalent to  $10^7$  spores per gram of dry substrate), using a volume that provided a hydration to the media of 70% of moisture, and cultured at 45°C for 24 h. The fermented material therein was mixed with 8 ml of distilled water per gram of substrate, stirred for 30 min, filtered and centrifuged at 10,000  $\times g$  for 15min at 4°C. The supernatant was used as crude enzyme solution.

*III.2.3. Enzyme activity measurements.* Exo-polygalacturonase (exo-PG) activity was assayed in a reaction mixture composed by 0.9 ml of 1% citrus pectin solution (degree of esterification - D.E. of 26 %-Sigma) in 0.2M sodium acetate buffer (pH 5.0) and 0.1 ml of enzyme solution, incubated at 60°C for 10 min. The number of reducing groups released by enzymatic action was measured using the Somogyi-Nelson method [11]. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release one  $\mu\text{mol}$  of galacturonic acid per minute, under the test conditions [2].

Endo-polygalacturonase (endo-PG) was measured viscosimetrically by adding 2.0 ml of crude enzyme to 6.0 ml of 0.2 M citrate-NaOH buffer (pH 5.0) containing 3 % citrus pectin with 26 % D.E. (Sigma). The reaction mixture was incubated at 60°C for 10

min, after which its viscosity was determined with a Basic viscosimeter (Fungilab). The blank contained thermally-inactivated crude enzyme. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that reduced the initial viscosity by 50 % per minute, under assay conditions.

*III.2.4. Enzyme purification procedure.* Volumes of 35 and 10 ml of crude enzyme solution (SmF and SSF, respectively) were dialyzed overnight against 20 mM acetate buffer pH 4.5 using an acetate cellulose membrane (Pharmacia), and concentrated by ultra filtration using Quixstand<sup>TM</sup> Benchtop (GE) with a 10 kDa cut-off. The retentate was loaded onto a Sephadex G-75 (Pharmacia) column (2.6 x 90 cm) equilibrated with 40 mM acetate buffer (pH 4.5) containing 100 mM NaCl, and eluted with the same buffer at a flow rate of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Fractions of 4 ml were collected and assayed for PG activity.

Protein fractions collected from the Sephadex column, corresponding to the PG activity peak, were pooled and loaded onto a Q Sepharose column (Aldrich 30 x 1 cm) equilibrated with 40 mM acetate buffer, pH 4.0. The bound material was eluted with a linear gradient (0.0 to 1.0 M) of NaCl, in the same buffer, at a flow rate of 0.3 ml min<sup>-1</sup>. The protein fraction with PG activity was desalted overnight by dialysis against 20 mM acetate buffer, pH 4.5, at 4°C.

*III.2.5. Analytical electrophoresis.* The homogeneity and molecular weight of the purified enzyme were determined by SDS-PAGE in a Mini Protean II apparatus (10 x 8 cm) (Biorad). Electrophoresis was carried out through a 4% (w/v) polyacrylamide stacking gel and 12% (w/v) resolving gel in Tris/glycine buffer (pH 8.3) [12] with the molecular weight marker Fermentas-14.4 - 116 kDa in a parallel lane. Protein bands were visualized by silver staining.

Analytical isoelectric focusing-PAGE was performed using an Ettan IPGphor II Isoelectric focusing system (Amersham), an established pH gradient from pH 3.0 - 10.0 (according to the supplier), and a 12% polyacrylamide gel (14 x 15 cm) containing 5% Pharmalyte (GE). Protein bands were visualized by silver staining.

### *III.2.6. Protein and carbohydrate measurement*

Protein concentration was measured by the Bradford method [13], using bovine serum albumin as standard. The enzyme carbohydrate content was determined by the method of Dubois et al. [14], using glucose as standard.

### *III.2.7. Enzyme characterization*

PG activity was assayed as a function of pH, in 0.2M acetate buffer (pH 3.0-5.5), citrate buffer (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.5-9.0) and Glicine-NaOH (pH 9.5-11.0), at 60°C, using 1 % of 26 % D.E. citrus pectin as substrate. The effect of temperature on PG activity was determined in the same mixture, by incubating it at temperatures ranging from 30 and 75°C, at the pH optimum (acetate buffer). The enzyme thermal stability was investigated in the absence of substrate by measuring the residual activity of the enzyme after 1h incubation at temperatures between 10°C and 80°C. pH stability was evaluated by dispersing (1:1) enzyme solution in 0.1 M buffer solutions pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (Tris-HCl) and pH 8.5-11.0 (Glycine-NaOH) and maintaining these solutions at 25°C for 24 h. An aliquot was taken to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature.

The effect of various ions on the enzyme activity was evaluated at a concentration of 2 mM in the reaction mixture, with HgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, BaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Cl, KCl, FeCl<sub>2</sub>.

The substrate specificity was carried out using solutions of polygalacturonic acid, citrus pectin with 26% and 92% D.E and apple pectin (D.E. 82%) as substrates under optimal conditions for the enzyme activity. The product of the hydrolysis of 92 %-esterified citrus pectin by PG were analyzed by paper chromatography on Whatman n<sup>o</sup>. 1 paper, with ethyl acetate / isopropanol / water (6:3:1, by volume) as the mobile phase.

### *III.2.8. Kinetics constants and of thermal inactivation*

The Michaelis-Menten constant ( $k_m$ ) and  $V_{max}$  values were determined from Lineweaver-Burk plots of enzyme activity measured with citrus pectin (D.E. 26 %) as substrate, at concentrations between 0.25% and 1.25%. The kinetics of thermal inactivation, inactivation energy and estimation of thermodynamic parameters followed those described by Dogan and Tari [15].

### III.3. Results and discussion

*III.3.1. PG crude extract.* Thirteen units of PG per milliliter of culture medium were obtained after 96 h of submerged fermentation. A crude enzyme solution with similar PG activity ( $14 \text{ U ml}^{-1}$ ) was achieved after dilution of the fermented material obtained by SSF (after 48 h of fermentation) in 40 ml of distilled water.

*III.3.2. Purification of PG.* The crude enzyme extracts from both fermentative processes were concentrated by ultrafiltration with a 10 kDa cut-off membrane and separated through a Sephadex G-75 column, providing two peaks of PG activity per enzyme extract (Fig. 1a and c). Several reports on crude enzyme extracted from mesophilic fungi cultures have shown a number of isoforms of PG [16, 17, 18, 19], while the extract obtained from thermophilic *T. aurantiacus* culture exhibited only one peak, as described by Martins et al. [8], similar to what have been observed in this work. PG isoforms produced by mesophilic microorganisms can exhibit different molecular weights, degrees of glycosylation and substrate specificity, as a result of post-translational modifications of a single gene product or the expression of different genes [20]. Saprophytic or pathogenic mesophilic fungi produce multiple pectin-degrading isozymes. Their variable modes of action (endo or exo) and substrate affinity allow for a successful attack of the pectate and cellulose network present in the cell wall of living plants [21], resulting in an effective saprophytic growth, infection and colonization of host tissues [22]. According to Martins et al. [8], the presence of a smaller amounts of polygalacturonase found in cultures of thermophilic *T. aurantiacus*, when compared to those of mesophilic fungi, could be an important difference between mesophilic and thermophilic fungi, since thermophilic fungi are strict saprophytes. They normally grow in compost conditions where the temperatures can reach  $70^{\circ}\text{C}$  and are never associated with living tissues.

The PG I peaks from SmF and SSF, corresponding to elution volumes ranging from 100 to 140 ml, were applied onto a Q Sepharose column, and after elution with NaCl solution (around 0.25 M) only one peak of PG was detected for both enzymes (Fig 1b and d). PG peaks were homogeneous on SDS-PAGE (Fig.2). Three stages were necessary to reach an 8-fold PG purification from SmF and 2.6-fold for PG from SSF, with a final yield of 27.7% and 15.5% respectively (Table 1).



### III.3.3. Physical-Chemical and Biochemical properties of PG.

Isoelectric focusing showed a single band with isoelectric point ( $pI$ ) of 4.2 for both enzymes (Table 2). The estimated molar masses for the PGs from SmF and SSF were estimated to be 38.9 kDa and 37.1, respectively, using a plot of protein markers (Fig 2).

Purified PGs exhibited higher activity on citrus pectin with low esterification levels (26% D.E.) (Fig. 3a) and the mode of action on citrus pectin (26% D.E.), assessed by measuring viscosity, shows that both PGs have a poor ability to decrease the viscosity of the pectin solution, indicating that the enzymes are exo-PGs (Fig. 3b). Analysis by paper chromatography of the pectin hydrolyzed by both exo-PG revealed that galacturonic acid was the only product of enzyme activity after 10 and 60 min of incubation (Fig.4), reinforcing the evidence in favor of exo-polygalacturonases.

The effect of ions on the exo-PG activity was tested, at concentrations of 2.0 mM in the reaction mixture. The ions  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  inhibited the exo-PG activity (approximately 99, 85 and 30%, respectively), while  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  enhanced the enzymatic activity by 17 to 40% (Table 3). The ion  $Ca^{2+}$  increased by 30% both enzymes the activity and the thermal stability of PG II from *Penicillium viridicatum* [23]. Divalent ions such as  $Ca^{2+}$  act directly on the pectin molecule, stabilizing its negatively charged carboxyl groups and indirectly stimulating the polygalacturonase activity [24; 25].

Although the exo-PG from both fermentative processes have presented similar molar masses, substrate specificity, response in the presence of ions and the same  $pI$ , the data from figure 5 indicate that variations in pH and temperature affect their activity and stability. Exo-PG from SmF showed its maximum activity at pH 5.5, and PG from SSF, at pH 4.5-5.0. Exo-PG from SmF was stable (70-100%) in a wider pH range (2.5-9.5) than the PG from SSF, which maintained the initial optimum activity at pH 2.5-6.0 (Fig. 5a, b).

Regarding the effect of temperatures on the reaction, both enzymes exhibited optimum activity between 55–60°C (5c). However, when in the absence of substrate for 1h, the exo-PG from SmF showed 65% of its original activity at 55 °C, while PG from SSF retained only 40% of activity at this temperature.

### III.3.4. Kinetics parameters

The exo-PG affinity for citrus pectin (26% D.E.) was determined from a Lineweaver-Burk plot. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were lower for the PGs from SmF (590.9 and 4.0) than those from SSF enzymes (661.6 and 4.9) (Table 2), suggesting that the

formers have a higher substrate affinity. Fungal exo-PGs have shown widely differing values in their kinetic parameters, which range from 0.11 mg ml<sup>-1</sup> to 4.47 mg ml<sup>-1</sup> for  $K_m$  and 1.68  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  to 1100  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  for  $V_{\text{max}}$  [26; 27; 28; 29].

### III.3.5. Kinetics of thermal inactivation

The higher activation energy necessary for the SmF enzyme (478.927) than the SSF enzyme (381.1465) (Table 2) indicates that the later enzyme has to overcome a lower energy barrier in order to hydrolyze the substrate. On the other hand, the higher activation energy could indicate a higher barrier of unfolding or higher thermostability.

The evaluation of the thermodynamic stability of exo-PGs obtained from submerged and solid fermentative systems showed that both enzymes have a similar energy of unfolding ( $\Delta G$ ), but exo-PG from SmF exhibited higher enthalpy and entropy of unfolding than PG from SSF. The half-life of exo-PG from SmF was 2.8 times higher than the exo-PG from SSF at 55°C, and 1.6 times at 60°C (Table 4). This data suggest that PGs from SmF have greater thermal and thermodynamic stability in comparison to the similar PG produced by SSF. The higher thermostability could be attributed to greater glycosylation level of the enzyme from SmF (31.2 for PG from SmF and 22.2 for PG form SSF) (Table.3).

The fermentative process (SmF or SSF) used has been considered the reason behind the differential properties of extracellular enzymes, such as optima temperature and pH for enzymatic activity, thermostability, stability under several pHs and substrate affinity [30]. However, the higher thermostability, the stability under a wider pH range and the higher substrate affinity of the PGs from SmF described in this work, are results opposite to those reported by [31] for endo and exo-PG produced by *Aspergillus niger*. The *A.niger* enzymes which shared these same traits were those obtained from SSF, not from SmF. Similar results were obtained by Diaz et al. [32] for lipases produced by *Rhizopus homothalicus*. On the other hand, our results corroborate the profile of PGs produced by the thermophilic *T. aurantiacus* in SmF and SSF [8]. It is possible that the thermophilic fungi have a diverse response to the water activity of the medium when compared to mesophilic specimens.

The  $t_{1/2}$  of the enzymes at temperatures of 57.5 and 60°C reveal that their thermal stability is higher than that of exo-PG from the mesophilic *A. niger* [33; 34], but lower than that of exo-PG from *A. sojae* [15]. There is no consensus whether the enzyme from thermophilic fungi is thermodynamically more stable than its mesophilic

counterpart. Leite et al [35] demonstrate that  $\beta$ -glucosidase produced by the mesophilic *Aureobasidium pulullans* were more stable ( $t_{1/2}$  at 80 °C of 50 min) than a similar enzyme extracted from the thermophilic *T. aurantiacus* ( $t_{1/2}$ , at 80 °C of 12 min) [8]. In opposition, Beadle et al [36] demonstrate a higher thermodynamic stability of cellulases from the thermophile bacteria *Thermomonospora fusca* than that of their analogues from the mesophile *Cellulomonas fini*.

### **III.4. Conclusions**

*T. indicae-seudaticae* N31 produced similar exo-polygalacturonases by SmF and SSF, but the enzyme purified from fermentation in liquid medium was more thermostable and more tolerant to pH variation than its analogue obtained from solid state fermentation, suggesting a differential pos-translational process as an increased glycosilation.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) for financial support.

### III.5. References

1. Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). *Process Biochem.*, 33, 21-28.
2. Silva, D., Martins, E. S., Da Silva, R., & Gomes, E. (2002). *Braz. J. Microbiol.*, 33, 318-324.
3. Niture, S. K. (2008). *Biologia*, 63, 1-19.
4. Niture, S. K., & Pant, A. (2004). *Microbiol Res.*, 159, 305-314.
5. Borin, F. M., Said, S., & Fonseca, M. J.V. (1996). *J Agric Food Chem.*, 44, 1616-1620.
6. Devi, N. A., & Rao, A. G.A. (1996). *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 59-65.
7. Celestino, S. M. C., Freitas, S. M., Medrano, F. J., Valle de Sousa, M., & Filho, E. X. F. (2006). *J. Biotechnol.*, 123, 33-42.
8. Martins, E. S., Silva, D., Leite, R. S. R., Da Silva, R. & Gomes, E. (2007). *Ant van Leeu*, v 91, p. 291 – 299.
9. Sathish-Kumar, S, & Palanivelu, P., (1999). *World J Microb Biot.*, 1999, vol. 15, pp 643-646.
10. Martin, N.; Guez, M. A. U.; Sette, L. D.; Da Silva, R. & Gomes, E. (2010). *Microbiol*, in press.
11. Somogyi, M., (1952). *J. Biol. Chem.*, 195, 19 – 23.
12. Laemmli, U. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
13. Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
14. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. Rebers, P. A. & Smith (1956). *Analyt Chem.*, 195, 19 – 23.
15. Dogan, N. & Tari, C. (2008). *Biochem Eng J.*, 39, 43 – 50.
16. Silva, D., Martins, E. S., Leite, R. S. R., Da Silva, R., Ferreira, V., & Gomes, E. (2007). *Process Biochem.*, 42, 1237-1243.
17. Waksman, G., Keon, J. P. R. & Turner, G. (1991). *Bioch. Bioph Acta (BBA)*., 23, 43 – 48.
18. Benen, J. A. F., Kester, H. C. M. & Visser, J. (1999). *Eur J Biochem.*, 159, 577 – 585.
19. Ismail, A. S. (1996). *Process Biochem.*, 1, 645-650.

20. Ali Asaff, C. M.; Viniestra-González, G. U. & Mayra de la Torre, M. L. (2006). *Process Biochem.*, 41, 1303-1310.
21. Herron S. R., Benen, J. A., Scavetta, R. D., Visser, J. & Jurnak, F. (2000). *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97, 8762-8769.
22. Yao, C.; Conway, W.C. & Sams, C.E. (1996). *Biochem Cell Biol*, 86: 1160-1166.
23. Gomes, E. Umsza-Guez, M. A., Martin, N., Da Silva, R. (2007) *Quím Nova*, 30, 136 – 145.
24. Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R.N. (2006). *Food Chem.*, 95, 30-36.
25. Pressey, R., & Avants, J. K. (1977). *Plant Physiol.*, 60, 548-553.
26. Martel, M. B, Letoublon, R.. & Fevre, M. (1998). *FEMS Microbiol. Lett.*, 158, 133-138.
27. Gillespie, A. M., Cook, K., & Coughlan, M. P. (1990). *J. Biotechnol.*, 13, 279-292.
28. Singh, S. A., & Rao, A. G. A. (2002). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35, 115-123.
29. Cabanne, C., & Doneche, B. (2002). *Microbiol. Res.*, 157, 183-189.
30. Alazard, D., & Rimbault, M. (1981). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 113-117.
31. Acuña-Argüelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-González, G., Favela-Torres, E. (1995) *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, 808-814.
32. Diaz, J. C. M., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. (2006). *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 1042-1050.
33. Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2004). *Food Chem.*, 88, 209-217.
34. Naidu, G. S. N. & Panda, T. (2003) *Biochem Eng J.*, 16, 57 – 67.
35. Leite, R. S. R., Alves-Prado, H. F., Cabral, H., Pagnocca, F. C., Gomes, E. & Da Silva, R. (2008). *Enzyme Microb Technol.*, 43, 391 – 395.
36. Beadle, B. M., Baase, W. A., Wilson, D. B., Gilkes, N. R. & Shoichet, B. K. (1999). *Biochem.*, 38, 2570 – 2576.

**Tabela 1.** Purification of the PG produced by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in submerged and solid-state fermentation.

<b>Step</b>	<b>Total U</b>	<b>Specif. activ.(U/mg protein)</b>	<b>Yield (%)</b>	<b>Purification fold</b>
<i>PG from SmF</i>				
Crude enzyme	440.0	62.5	100	1.0
Ultra filtration	200.0	190	45.0	3.0
Sephadex G-75 PGI	18.0	257	39.0	4.1
Q-Sepharose	10.0	500	27.7	8.0
<i>PG from SSF</i>				
Crude enzyme	98.0	1.2	100	1.0
Ultra filtration	84.0	4.4	86.0	1.6
Sephadex G-75 PGI	5.5	2.6	49.0	2.2
Q-Sepharose	2.5	3.1	15.5	2.6

**Table 2** : Kinetic parameters (Michaelis-Menten-GraFit 5.0), isoelectric point, activation energy and glycosylation level of PG from SSF and SmF

<b>Parameter</b>	<b>SSF</b>	<b>SmF</b>
$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol AG min}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$ )	661.6	590.9
$K_m$ ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	4.9	4.0
PI	4.2	4.2
$E_a$ ( $\text{KJmol}^{-1}$ )	381.1465	478.927
Glycosylation level (%)	22.2	31.2

**Table 3:** Ions effect on PG activities

Íon (2mM)	Residual activity (%)	
	SSF	SmF
None	100	100
Hg <sup>2+</sup>	1.0	0.7
Cu <sup>2+</sup>	14.0	15.0
Ba <sup>2+</sup>	69.0	70.0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	102.0	103.0
Mg <sup>2+</sup>	104.0	105.0
Mn <sup>2+</sup>	105.0	107.0
K <sup>+</sup>	122.0	123.0
Fe <sup>2+</sup>	117.0	118.0
Ca <sup>2+</sup>	140.0	140.0



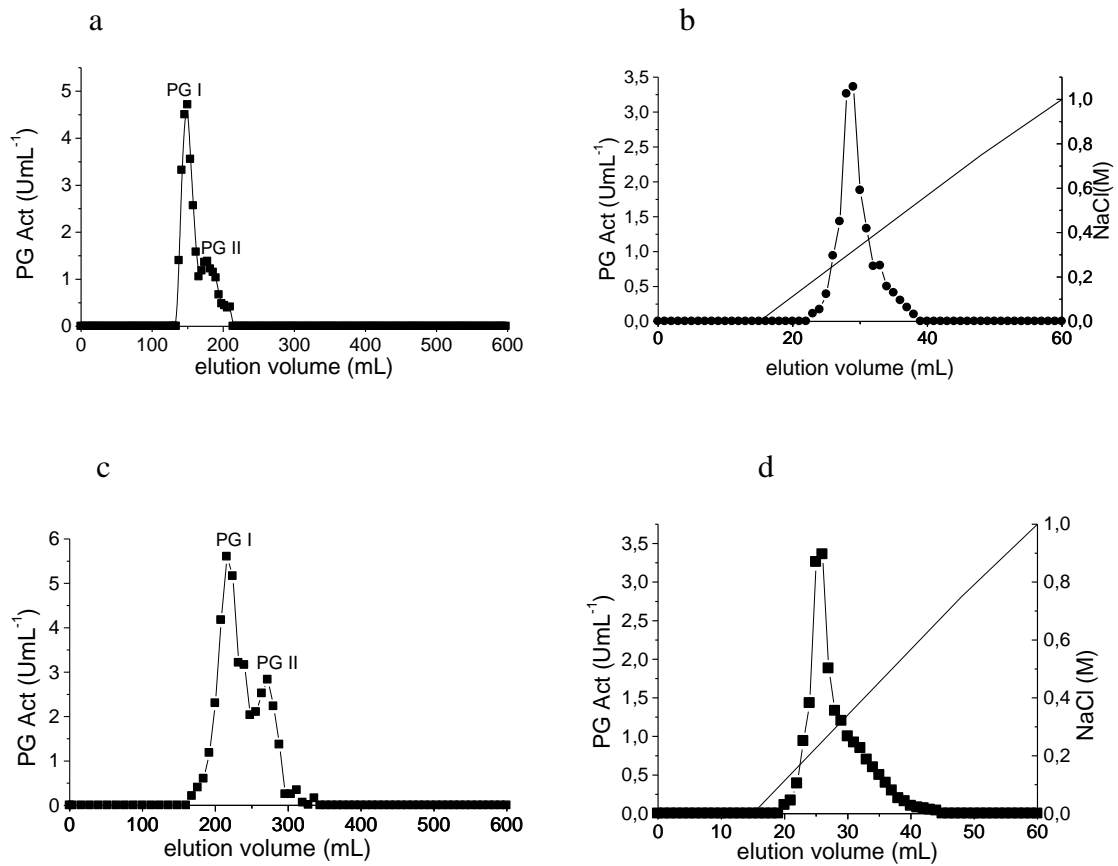
**Table 4:** Kinetic parameters for thermal inactivation of the purified polygalacturonase from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Temp.(°C)	K	k <sup>*1</sup>	ΔG (KJmol <sup>-1</sup> )	ΔH (KJmol <sup>-1</sup> )	ΔS (Jmol <sup>-1</sup> )	t (1/2) (min)
<b>SmF</b>						
<b>55</b>	328.15	0.0043	106.67	476.20	1126.11	161.2
<b>57,5</b>	330.65	0.0106	105.02	476.18	1122.51	65.2
<b>60</b>	333.15	0.0725	100.51	476.16	1127.57	9.6
<b>62,5</b>	335.65	0.1770	98.79	476.14	1124.22	3.9
<b>SSF</b>						
<b>55</b>	328.15	0.01188	103.89	378.74	837.56	58.3
<b>57,5</b>	330.65	0.02605	102.55	378.72	835.23	26.6
<b>60</b>	333.15	0.11262	99.29	378.70	838.68	6.1
<b>62,5</b>	335.65	0.23472	98.00	378.67	836.20	2.9

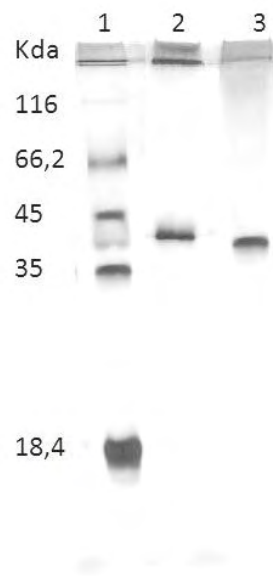
\*1 – from slope of the semi-logarithmic plot of activity residual vs. Time for each temperature, the inactivation rate constants (k)

Ea SmF = 478.927 KJmol<sup>-1</sup>; Ea SSF = 381.465 KJmol<sup>-1</sup>

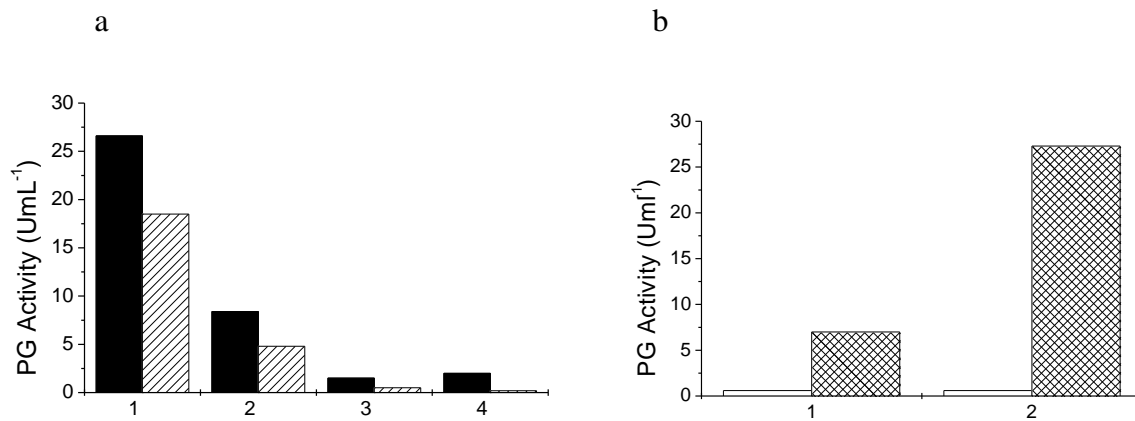
**Figure 1:** Chromatographic steps for PG purification. Elution of PG obtained in SmF from Sephadex G75 (a) and Q-sepharose (b) columns; elution of PG obtained in SSF from Sephadex G75 (c) and Q-sepharose (d) columns;



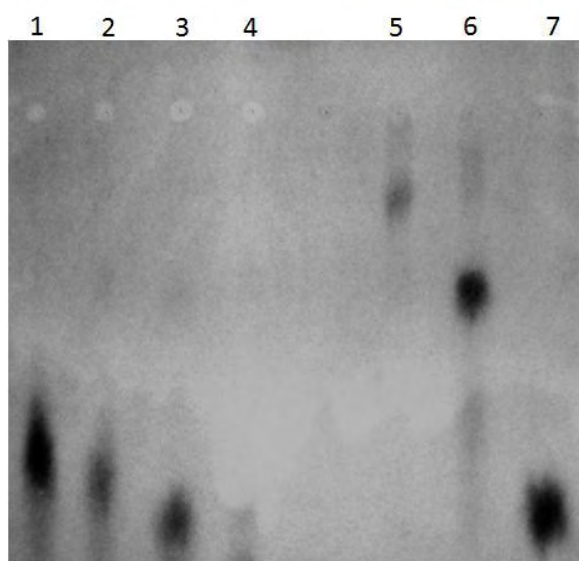
**Figure 2:** SDS-PAGE analysis of the purified PG from *T. indicae-seudaticae*. PG was visualized by silver staining. Line1= molecular weight markers in *kDa*; line2=PG from SmF, line3=PG from SSF



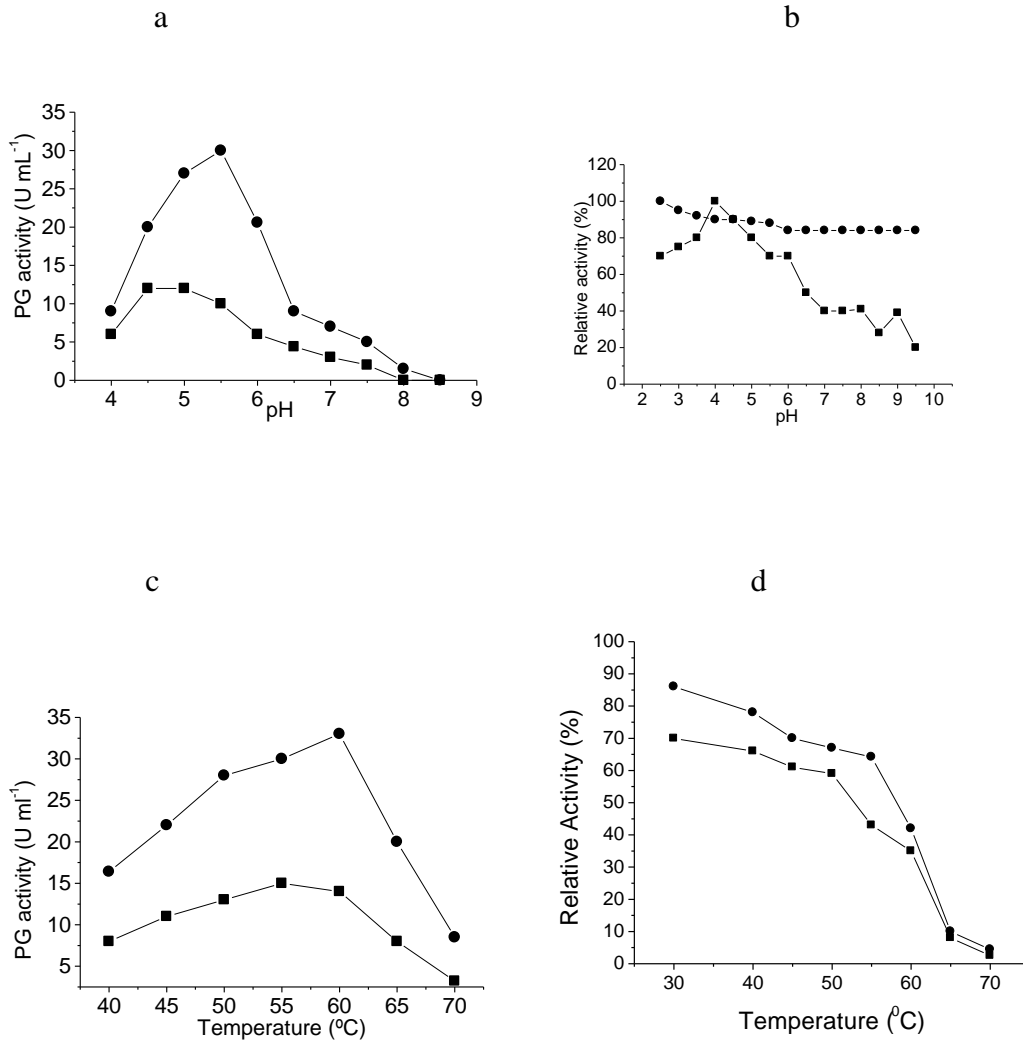
**Figure 3:** Properties of PG. (a) Substrate specificity: 1 = citrus pectin (26% D.E.); 2 = citrus pectin (92% D.E.); 3 = apple pectin (82% D.E.); 4 = Polygalacturonic acid ; SSF = ■; SmF = ▨ (b) Mode of action of PG (endo and exo activity). 1 = SmF; 2 = SSF; endo-PG = □; exo-PG = ▩.



**Figure 4:** Paper-chromatographic analysis of hydrolysis products of PG from *T. indicaseudaticae* acting on 1.0 % (w/v) citrus pectin 26% D.E., at 60°C. lines 1 and 2= hydrolyzed with enzyme from SmF for 10 and 60 min, respectively; lines 3 and 4= hydrolyzed with enzyme from SSF for 10 and 60 min, respectively. 5=trigalacturonic acid; 6=digalacturonic acid; 7=galacturonic acid.



**Figure 5:** Properties of PG. Effect of pH (a), temperature (c) on activity of PG, effect of pH (b) and temperature (d) on stability of PG when in absence of substrate. SSF (■); SmF (●).



## CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para o isolamento dos fungos termofílicos, foi aplicada com sucesso. Apesar de uma baixa diversidade de fungos termofílicos (34 isolados) ter sido recuperada a partir das amostras estudadas, todos os fungos apresentaram potencial de produção de PG. O isolado N31, identificado como *Thermomucor indicae-seudaticae* foi selecionado por produzir maior quantidade da enzima.

Os estudos de produção de PG em FES e FSm utilizando diferentes resíduos agro-industriais como fonte de carbono e energia, revelaram que a produção enzimática não foi afetada por esses parâmetros.

A purificação e caracterização da PG produzida por *T. indicae-seudaticae* N31 em FES e FSm resultou na detecção de características diferenciadas quanto a termoestabilidade, tolerância ao pH, glicosilação e massa molecular, apesar dessas enzimas apresentarem características similares, como pH ótimo, temperatura ótima, ponto isoelétrico e ambas apresentarem também características de uma exopoligalacturonase.

De maneira geral, podemos concluir que os objetivos propostos pelo presente trabalho foram concluídos com êxito. A combinação dos dados obtidos contribui para a ampliação do conhecimento sobre a poligalacturonase.