



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



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

Isolamento de Linhagens Fúngicas Termofílicas Produtoras de Pectinases Termoestáveis: Produção, Caracterização e Purificação Parcial da Poligalacturonase.

NATALIA MARTIN

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes

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

Maio - 2006

576 Martin, Natalia
M379i Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras
de pectinases, produção, caracterização da poligalacturonase /
Natalia Martin. – Rio Claro : [s.n.], 2006
65 f. : il., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Eleni Gomes

1. Microorganismos. 2. Produção de poligalacturonase. 3.
Fungos termofílicos. 4. Fermentação em estado sólido. 5.
Fermentação submersa. I. Título.

“Sabedoria é saber qual a próxima coisa a fazer,
Capacidade é saber como faze-la e
Virtude é faze-la.”

David Starr Jordan

Aos meus pais e minha irmã,

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

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 namorado Elton, pela seu grande amor, carinho, amizade e por compartilhar comigo todos os momentos.

A minha orientadora Prof^a Dr^a 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.

Aos amigos de laboratório pela ajuda na realização deste trabalho e pelos agradáveis momentos durante os últimos anos: Alessandra, Andréia, Ana Flávia, Alexandre, Aline, Ana Paula, Carol, Daniela, Dênis, Ellen, Eduardo, Érika, Fabiana, Gisele, Heloíza, Luís Gustavo, Márcia Maria, Márcia Rizzatto, Marcelo, Máira, Paula, Patrícia, Rosângela, Rodolfo, Roberto, Rodrigo, Valquíria.

Ao Claudinei por seu trabalho técnico e sua amizade.

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 !!!

SÚMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
II. INTRODUÇÃO	1
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
III.1. Substâncias Pécicas.....	2
III.2. Enzimas Pectinolíticas.....	3
III.3. Aplicação de pectinases.....	6
III.4. Fermentação em estado sólido e submerso na produção de enzimas microbianas ..	8
III.5. Microrganismos termofílicos e produção de pectinases termoestáveis.....	10
III.6. Purificação e Propriedades Bioquímicas de Pectinases Microbianas.....	14
IV. OBJETIVOS.....	16
V. MATERIAL E MÉTODOS	17
V.1 Meios de cultivo.....	17
V.1.1 Meio nutriente	17
V.1.2 Meio para seleção das linhagens	17
V.1.3 Meio para manutenção das culturas selecionadas	17
V.1.4 Meios para processos fermentativos	17
V.2 Isolamento e seleção dos microrganismos	18
V.3 Identificação das linhagens microbianas.....	18
V.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento fúngico em meio sólido.	19
V.5 Processos Fermentativos.....	19
V.5 Medida da atividade de poligalacturonases (PG).....	19
V.6 Medida da atividade de Xilanase	20
V.7 Medida da atividade de Avicelase e CMCase	20
V.8 Medida da atividade Amilase	20

V.9	Determinação de proteínas totais.....	21
V.10	Clarificação do extrato enzimático bruto.	21
V.11	Caracterização da Poligalacturonase.....	21
V.11.1	Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima.	21
V.11.2	Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH	22
V.12	Concentração da enzima e separação das frações de PG por cromatografia de filtração em gel.....	22
VI.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
VI.1.	Isolamento e identificação dos fungos	23
V.2.	Produção de pectinases pelas linhagens isoladas em FES e FSM.....	25
VI.3.	Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31 em meio sólido.	31
VI.4.	Produção de exo-PG em FES pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31.....	32
VI.5.	Ensaio para clarificação da solução enzimática obtida em FES.....	40
V.6.	Produção de poligalacturonases em meio contendo casca de laranja lavada e bagaço de laranja industrializado misturados ao farelo de trigo.	42
VI.7.	Estudo do perfil de produção de outras enzimas despolimerizantes.....	45
VI.8.	Caracterização Bioquímica da PG produzida pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31.....	46
VI.8.1	Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de PG.	47
VI.8.2	Determinação da estabilidade da PG frente a variação de pH e temperatura....	48
VI.9.	Purificação Parcial das Poligalacturonases produzidas pelo microrganismo <i>Rhizomucor</i> sp N31 por filtração em gel.	51
VII.	CONCLUSÕES	55
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura primária de substâncias pécticas.....	2
Figura 2: Mecanismo de ação das pectinases.....	5
Figura 3: Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína.....	7
Figura 4: Crescimento do fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31 em diferentes temperaturas.....	31
Figura 5: Crescimento do fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31 em diferentes temperaturas.....	32
Figura 6: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 100% farelo de trigo.....	33
Figura 7: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% farelo de trigo e 50% bagaço de laranja.....	34
Figura 8: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% farelo de trigo e 50% bagaço de cana-de-açúcar.....	34
Figura 9: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% bagaço de laranja e 50% bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Figura 10: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 40% farelo de trigo, 40% bagaço de laranja e 20% bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Figura 11: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, por FES, em meio 70% bagaço de laranja, 20% bagaço de cana-de-açúcar e 10% farelo de trigo.....	36
Figura 12: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% bagaço de laranja industrializado e 50% farelo de trigo.....	43
Figura 13: Produção de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo.....	44
Figura 14: Produção de enzimas despolimerizantes pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES, em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo.....	45
Figura 15: Efeito do pH sobre a atividade de PG pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31.....	47
Figura 16: Efeito da temperatura sobre a atividade de PG produzida pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31.....	48
Figura 17: Efeito do pH sobre a estabilidade de PG produzida pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo.....	49

Figura 18: Efeito da temperatura sobre a estabilidade de PG produzida pelo fungo <i>Rhizomucor</i> sp N31, através de FES em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo.....	50
Figura 19: Perfil de eluição da Poligalacturonase bruta em cromatografia de gel filtração, em coluna aberta, utilizando a resina Sephadex G-75.....	52
Figura 20: Atividade de poligalacturonase nas frações.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades bioquímicas e físico-químicas de algumas poligalacturonases microbianas.....	6
Tabela 2: Amostras das coletas na Constroeste e Açúcar Guarani.....	24
Tabela 3: Produção de poligalacturonase em FSM e FES pelas linhagens fúngicas.....	26
Tabela 4: Valores de produção máxima de PG em diferentes meios.....	37
Tabela 5: Teores de proteínas totais e atividade específica de PG.....	39
Tabela 6: Aplicação de caulin, celite e carvão vegetal ativado na clarificação da solução enzimática bruta.....	41
Tabela 7: Síntese do processo de purificação da PG em coluna Sephadex G-75 a partir da solução enzimática bruta obtida após 24 horas de cultivo.....	51
Tabela 8: Atividades enzimáticas das frações coletadas na filtração em gel em resina Sephadex G-75.....	52

RESUMO

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. As pectinases produzidas por fungos termofílicos apresentam características importantes para aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura. O tipo de processo fermentativo utilizado para a obtenção dessas enzimas influencia a quantidade obtida e as propriedades das mesmas. O presente trabalho teve como objetivos isolar e identificar linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases e cultivá-las por FES e por FSM para a avaliação do potencial de produção de poligalacturonases, além de caracterizar a PG produzida. Foram coletadas amostras (0,5 g) de compostagem e depósitos de resíduos agrícolas e agro-industriais, as quais foram transferidas para tubos contendo pectina como única fonte de carbono. As linhagens fúngicas isoladas foram cultivadas a 45°C, por 120 horas em FES, utilizando-se como substratos, farelo de trigo (FT), bagaço de laranja industrializado (BL), bagaço de cana-de-açúcar (BC) e casca de laranja lavada (CL) e em FSM utilizando-se meio nutriente líquido contendo 1% de pectina como fonte de carbono. As amostras foram retiradas a cada 24 horas e a atividade enzimática foi avaliada a partir da quantificação do ácido galacturônico liberado por hidrólise de pectina citrus (1%). De um total de 40 amostras coletadas, foram isoladas 34 linhagens fúngicas entre as quais as maiores produtoras de poligalacturonases por FSM foram *Thermomyces* sp N4 (1,8 U/mL) e *Scopulariopsis* sp N7.1 (0,74 U/mL). As maiores produtoras de PG em FES foram as linhagens *Thermomucor* sp N31 (15 U/g), *Aspergillus* sp N12 (76,1 U/g) e *Aspergillus* sp N29 (64,7 U/g). A linhagem maior produtora de PG foi a *Rhizomucor* sp N31, em meio composto por 50% farelo de trigo e 50% casca de laranja lavada em 24 horas de fermentação. A enzima produzida por esse fungo apresentou pH ótimo de 4,0, temperatura ótima entre 55 e 60°C e manteve-se estável na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 por 1 hora a 60°C (80% de sua atividade original). Além das pectinases, outras enzimas hidrolíticas, como xilanase, CMCase, avicelase e amilase foram produzidas pelo fungo. A separação das frações da solução enzimática bruta, por cromatografia de filtração em gel em coluna sephadex G-75, apresentou duas frações com atividade de PG.

ABSTRACT

Fungi, due to their reproduction and growth characteristics, are well adapted to a large variety of substrates, being excellent decomposers of vegetal matter. Pectinases produced by thermophilic fungi exhibit important characteristics for application in bioprocesses, such as stability towards pH and temperature. The type of fermentation process used for the production of these enzymes has great influence on the amount of enzyme that is produced and on their properties. The goal of this work was to isolate and identify thermophilic fungal strains that produce pectinases and cultivate them in solid state fermentation (SSF) and in submerged fermentation (SmF) in order to evaluate their potential to produce polygalacturonases (PG), as well as to characterize the PG produced. Samples (0.5 g) were collected from piles of composting material and from deposits of agricultural and agro-industrial residues, which were transferred to tubes containing pectin as the only carbon source. The isolated fungal strains were cultivated at 45°C, for 120 hours in SSF, using wheat bran (WB), orange peel (OP), sugar cane bagasse (SB) and washed orange bagasse (WP) as substrates and in SmF, using a liquid nutrient medium containing 1.0% pectin as carbon source. Samples were taken every 24 hours and the enzymatic activity was assayed through the quantification of galacturonic acid released by citrus pectin (1.0%) hydrolysis. Of a total of 40 samples collected, 34 fungal strains were isolated, of which the best PG producers in SmF were *Thermomyces* sp N4 (1.8 U/mL) and *Scopulariopsis* sp N7.1 (0.74 U/mL). The best PG producers in SSF were *Thermomucor* sp N31 (15.0 U/g), *Aspergillus* sp N12 (76.1 U/g) and *Aspergillus* sp N29 (64.7 U/g). The strain with the most production of PG was *Rhizomucor* sp N31, in medium containing 50% WB and 50% WP in 24 hours of fermentation. The enzyme produced by this fungus exhibited optimum pH at 4.0, optimum temperature between 55 and 60°C and remained stable in the pH range between 4.0 and 5.0 and for 1 hour at 60°C (80% of its original activity). Besides pectinases, other hydrolytic enzymes were also produced, such as xylanase, CMCase, avicelase and amylase. Separation of the fractions of the crude enzymatic extract, by gel filtration chromatography on a sephadex G-75 column, showed two fractions with PG activity.

II. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005).

As pesquisas sobre produção de enzimas por microrganismos termofílicos, assim como a diversidade de substratos alternativos têm crescido significativamente nos últimos anos (VIEILLE; ZEIKUS, 2001; MAHESHWARI et al., 2000; MARTINS et al., 2002; MARTIN et al., 2004; PHUTELA et al., 2005; KAUR et al., 2004).

Microrganismos que vivem em condições extremas são, usualmente, uma rica fonte para obtenção de bioprodutos com propriedades diferenciadas, em particular, enzimas. Devido às suas propriedades únicas, esses bioprodutos podem ser empregados em condições ambientais drásticas, que com freqüência 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 termófilos são usualmente moléculas mais termoestáveis e não perdem a sua conformação original e a sua atividade em elevadas temperaturas. Como vários processos industriais requerem enzimas funcionais em temperaturas superiores a 70°C, há um grande interesse comercial na busca desses catalisadores biológicos (VIEILLE; ZEIKUS, 2001; BRUINS et al., 2001).

O conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em um determinado substrato, permite avaliar o potencial do preparado enzimático obtido. A presença de um conjunto específico de enzimas pode ser desejável em alguns processos industriais. Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheça suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (KASHYAP et al., 2001; ALKORTA et al., 1998).

Enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes principalmente na lamela média da célula vegetal e são produzidas por plantas superiores e microrganismos. As pectinases são enzimas de grande importância ao se considerar sua aplicação industrial, e estão entre as mais comercializadas, sobretudo para a indústria alimentícia. As pectinases microbianas

são responsáveis por 25% do valor global de enzimas alimentícias comercializadas. A maioria das preparações comerciais de pectinases são produzida por fungos, sendo a espécie *Aspergillus niger* a principal produtora (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa (FSM) quanto em estado sólido (FES). O processo de FES tem se mostrado muito promissor na produção de enzimas fúngicas (PANDEY et al., 2000), pois apresenta uma série de vantagens em relação a FSM, como maior concentração de produtos formados, menor espaço requerido para equipamentos, facilidade de extração do produto desejado e diminuição de problemas de contaminação microbiana (AIDOO et al., 1982). O uso de resíduos agroindustriais como substratos, também é permitido e estes são de baixo custo e podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, antibióticos, biocombustíveis, proteínas e enzimas (PANDEY et al., 2000).

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Substâncias Pécicas

Substâncias pécicas são macromoléculas complexas, de alto peso molecular, carregadas negativamente e constituídas principalmente por ácidos galacturônicos ligados por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ (Fig. 1), sendo os maiores componentes da lamela média, na forma de pectato de cálcio e pectato de magnésio (KASHYAP et al., 2001).

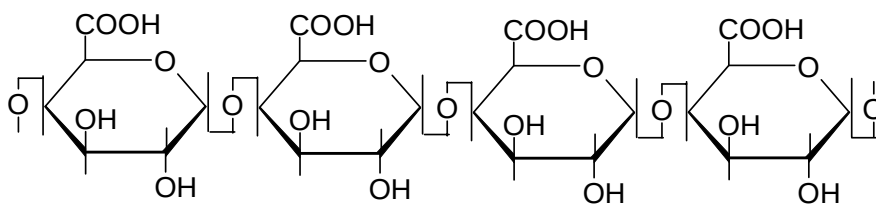


Figura 1 – Estrutura primária de substâncias pécicas.

As substâncias pécicas consistem principalmente de galacturonas e ramnogalacturonas cujo carbono C-6 do galactato é oxidado a um grupo carboxil. O grupo carboxila do ácido galacturônico pode ser esterificado com grupo metil e, parcial ou completamente, neutralizado por íons de sódio, potássio ou amônia. Alguns dos grupos hidroxila no C₂ e C₃ podem ser acetilados. A cadeia primária consiste de unidades de α - D – galacturonato ligadas $\alpha(1\rightarrow4)$ (JAYANI et al., 2005).

A sociedade americana de química classificou as substâncias pécticas dentro de quatro principais tipos (KASHYAP et al., 2001):

- i) **Protopectina:** substância péctica insolúvel em água, presente em tecidos intactos.
- ii) **Ácido Péctico:** 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 pécticas que contém ácido pectínico como principal componente.

III.2. Enzimas Pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes nos materiais vegetais. A classificação destas enzimas é baseada nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos. São descritos três grupos de enzimas: as protopectinases, as esterases (pectinesterases) e as despolimerases (hidrolases e liases) (Fig. 2) (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005).

Protopectinases: são enzimas que degradam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada altamente solúvel.

Esterases: catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase. As pectinesterases (PE) são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais.

Despolimerases: catalizam a quebra das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ entre os monômeros do ácido D – galacturônico da cadeia de galacturonana. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise (poligalacturonase), catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases), quebrando a ligação glicosídica por reação de transeliminação do H, formando dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico.

As despolimerases podem ser subdivididas em 4 categorias diferentes,

dependendo da preferência da enzima pelo substrato:

Liases (Pectina liases – PL): são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio. Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endo liases, que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ da pectina e as exo liases, que catalisam a ruptura das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora.

As liases que têm preferência por ácido péctico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação) são denominadas poligalacturonato liases (endo ou exo), enquanto aquelas que atuam preferencialmente no ácido pectínico são as polimetilgalacturonato liases (endo ou exo).

Hidrolases (Poligalacturonases – PG): são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ da cadeia de ácido poligalacturônico. As Endo-poligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico, enquanto as Exo-poligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico. As hidrolases, em relação a especificidade e a esterificação do substrato são também classificadas em poligalacturonases, que têm preferência pelo substrato desmetoxilado (ácido péctico) e em polimetilgalacturonases, que têm preferência pelo substrato altamente metoxilado (ácido pectínico).

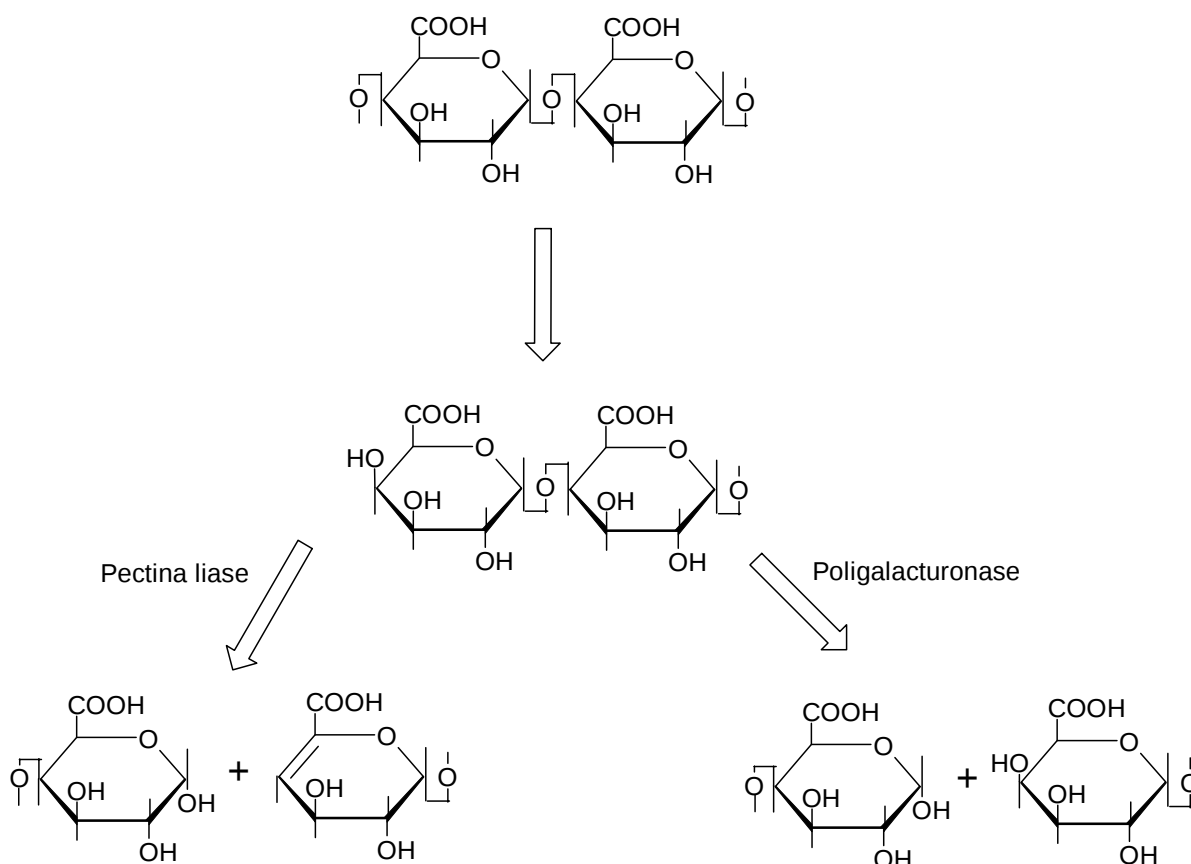


Figura 2 – Mecanismo de ação das pectinases (ALKORTA et al., 1998).

As endo – PGs são amplamente distribuídas entre os microrganismos. Elas têm sido relatadas em várias espécies fúngicas, incluindo *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium italicum*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* sp, *Thermomyces lanuginosus*, *Sporotrichum thermophile* (HASUNUMA et al, 2003; SATHISH-KUMAR; PALANIVELU, 1999; KAUR et al., 2004; JAYANI et al., 2005).

Em contraste, as exo – PGs ocorrem com menos frequência e têm sido reportadas em *A. niger*, *Trichoderma viride*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum*, *Penicillium viridicatum*, *Thermoascus aurantiacus*. As exo – PGs podem ser diferenciadas em exo – PGs fúngicas, que liberam ácido monogalacturônico e em exo – PGs bacterianas, que produzem ácido digalacturônico como principal produto final (SILVA et al., 2005; MARTINS et al., 2002; JAYANI et al., 2005)

As pectinases, têm sido produzidas industrialmente por fungos filamentosos como *A. niger*, *Coniotryrium diplodiela*, *Sclerotinia libertina* e espécies de *Botrytis*, *Penicillium* e

Rhizopus (JAYANI et al., 2005).

PGs isoladas de diferentes fontes microbianas diferem umas das outras em suas propriedades bioquímicas. A Tabela 1 resume algumas dessas propriedades de PGs obtidas de vários microrganismos.

Tabela 1 – Propriedades bioquímicas e físico-químicas de algumas poligalacturonases microbianas.

Fontes das PGs	Natureza	Peso Mol. (Kda)	pI	Ativ Esp (U/mg)	Temp ótima (°C)	pH ótimo	Temp estab (°C)	pH estab	Ref.
<i>Aspergillus japonicus</i>	Endo	38 (PGI)	5,6	-	30	4,0 – 5,5	-	-	Hasunuma et al., 2003
	Endo	65 (PGII)	3,3	-	30	4,0 – 5,5	-	-	
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Exo	-	-	-	55	7,0	-	-	Kaur et al., 2004
<i>Apinis</i>									
<i>Mucor flavus</i>	-	40	8,3	-	45	3,5 – 5,5	40	2,5 – 6,0	Margo et al., 1994
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Endo	35	5,9	5890	55	5,0	60	4,0 – 6,5	Martins et al., 2002
<i>Aspergillus niger</i>	Endo	61 (PGI)	-	982	43	3,8 – 4,3	50	-	Singh, et al., 2002
	Endo	38 (PGII)	-	3750	45	3,0 – 4,6	51	-	
<i>Aspergillus awamori</i>	Endo	41	6,1	487	40	5,0	50	4,0 – 6,0	Nagai et al., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		59	-	131,43	60	5,5	65	-	Sathish-Kumar; Palanivelu, 1999
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 4707	Endo	29,7	-	75,3	45	4,5	55	-	Saito et al., 2004
<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	Exo	-	-	-	55	5,0	30 - 40	5,5 – 8,0	Silva et al., 2005

III.3. Aplicação de pectinases

Pectinases são importantes para a indústria alimentícia assim como, em outras áreas biotecnológicas (KASHYAP et al., 2001; SALAZAR; JAYASINGHE, 1999; VIIKARI et al., 2001; REID; RICHARD, 2004). A principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração.

As paredes celulares dos tecidos que compõem os frutos contêm uma grande variedade de polissacarídeos, entre eles, as substâncias pécticas classificadas geralmente como pectina, as quais aparecem concentradas na lamela média e parede

primária das células (ALKORTA et al., 1998).

A extração de sucos é feita, de modo habitual, por prensagem mecânica que provoca o rompimento das paredes celulares das células do mesocarpo levando à liberação do suco. Frutas ricas em pectina geram sucos com alta viscosidade e turbidez, uma vez que os mesmos arrastam resíduos de pectina e outros polissacarídeos de parede. A adição de pectinases e outras enzimas despolimerizantes hidrolisam esses compostos e promovem a redução da viscosidade dos sucos aumentando a vida de prateleira dos mesmos (LEA, 1998).

Alguns tipos de suco apresentam acentuada turbidez a qual nem sempre é eliminada com a centrifugação, visto que, mesmo após esse processo, pequenas partículas contendo pectina podem manter-se em suspensão. Nesses casos, a despectinização tem duas funções: a de degradar as pectinas solúveis que geram a viscosidade e também a que causa agregação de partículas responsáveis pela turbidez (complexo pectina-proteína). A Figura 3 mostra como o fenômeno ocorre (PILNIK; VORAGEN, 1993; LEA, 1998)

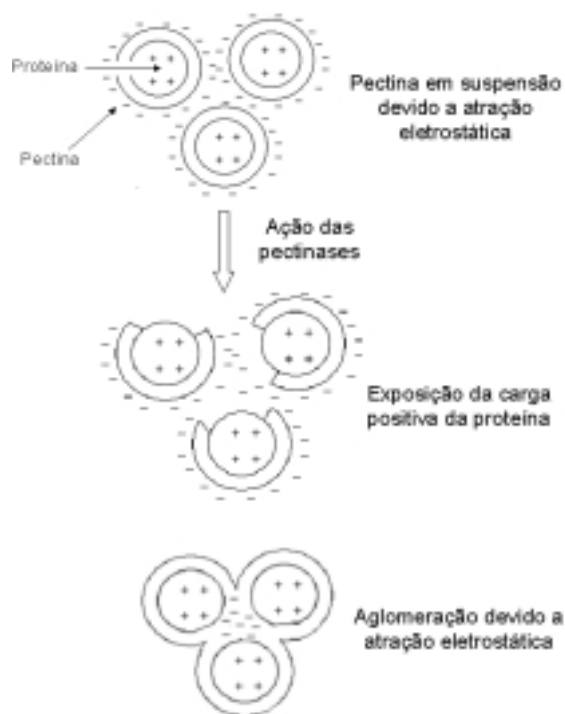


Figura 3 – Mecanismo de formação do complexo pectina-proteína (LEA, 1998).

Em um ambiente ácido, na faixa de pH 3,0 – 4,0, as moléculas de pectina estão carregadas negativamente, causando o efeito de repulsão entre as partículas de mesma carga, que ficam suspensas e conhecidas como “partículas turvas”, e são responsáveis pela turbidez do suco. A pectinase atua degradando a pectina e expondo a parte carregada positivamente da proteína. A repulsão eletrostática entre essas partículas é então reduzida, permitindo que elas formem aglomerados que precipitam (LEA, 1998)

Na indústria de processamento de suco de laranja, a aplicação das pectinases no processo de extração está limitada ao tratamento da polpa (semente e carpelo) gerada pela filtração do suco de primeira, obtido pelo esmagamento da fruta. O suco “pulp wash” é conhecido por ser um suco de segunda classe destinado a indústria de confeitos. A pulp wash é caracterizada como um material altamente viscoso, o que algumas vezes torna difícil a obtenção de bons rendimentos; entretanto, a adição de pectinases reduz a viscosidade e permite um rendimento maior durante a prensagem para extração do suco (PILNIK; VORAGEN, 1993; KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005).

Indústrias de processamento de alimentos vegetais geram resíduos líquidos que contêm grande quantidade de pectinas e seus derivados. O pré-tratamento de resíduos líquidos com enzimas pectinolíticas facilita a remoção de parte do material orgânico com baixa solubilidade facilitando a decomposição pelo lodo aditivado (HOONDAL et al., 2000).

O tratamento com pectinases acelera a fermentação do chá e também destrói a propriedade de formar espuma de chá solúvel em pó, por causa da destruição de pectinas. A pectinases também são usadas na fermentação do café para a remoção de camada de mucilaginosos de seus grãos (CARR, 1985).

Óleos da casca da fruta cítrica podem ser extraídos com pectinases. Elas destroem as propriedades emulsificantes das pectinas (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005).

III.4. Fermentação em estado sólido e submerso na produção de enzimas microbianas

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia que resta muito ainda para se conhecer e explorar. Entre esses processos, a fermentação submersa (FSM) tem sido a mais usada. Entretanto, nas últimas décadas

tem aumentado a tendência do uso da fermentação em estado sólido (FES) 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 grupo de microrganismos a ser utilizado.

A FES é definida como um processo de fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (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. Na 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 e a dificuldade de separação produto / substrato (MITCHELL et al., 2000).

Na FES podem ser destacadas como principais vantagens: a simplicidade, o baixo custo, a alta produtividade, a alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2000). 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. Desse modo, a FES tem se mostrado adequada para a produção de enzimas por fungos filamentosos (PANDEY, et al., 1999), ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (PANDEY, 2002; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

A utilização de inúmeros materiais orgânicos como resíduos agrícolas, florestais e da indústria alimentícia tem sido proposta como substratos para a FES (KALOGERIS, et al., 2003). Esses resíduos promovem, ao mesmo tempo, um substrato alternativo e barato para a fermentação e a 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, farelo de mandioca e polpa de limão, 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., 2005; DE GREGORIO et al., 2002).

III.5. Microrganismos termofílicos e produção de pectinases termoestáveis.

Apesar da grande importância ecológica, o número conhecido de espécies de microrganismos (diversidade de espécies), representado pelos organismos cultivados descritos na literatura, representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (entre <0.1 a 1%, dependendo do habitat) (MAHESHWARI et al., 2000).

Os fungos constituem um grupo microbiano extremamente diverso, com uma ampla variedade morfológica, metabólica e de habitat. Levantamentos estimativos da década de 90 (HAWKSWORTH, 1991) propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos eram conhecidas, com aproximadamente 69.000 espécies descritas na literatura. Estima-se que os fungos sejam o grupo microbiano com o maior número de espécies na natureza, aproximando-se da casa dos 1,5 milhões de espécies estimadas (HAWKSWORTH, 2001).

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos 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).

Dentre todos esses fatores, a temperatura é o que mais influencia o funcionamento de moléculas e manutenção das estruturas biológicas. Em temperaturas elevadas, as reações químicas e enzimáticas na célula ocorrem mais rapidamente e o crescimento microbiano é por consequência mais rápido e acentuado. No entanto, sob temperaturas mais altas que a temperatura ótima para o crescimento do microrganismo, as proteínas,

os ácidos nucleicos e outros componentes celulares podem ser danificados de modo irreversível (MADIGAN et al., 2003).

Os microrganismos apresentam uma temperatura mínima de crescimento, abaixo da qual isso não ocorra, uma temperatura ótima, na qual o crescimento microbiano é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual o crescimento não é possível e ocorre a morte celular por colapso da membrana citoplasmática e desnaturação de proteínas e do DNA. Estas temperaturas são em geral características para cada microrganismo, mas não são completamente fixas, uma vez que podem ser modificadas por fatores ambientais, em especial pela composição do meio de crescimento (MADIGAN et al., 2003).

A maioria dos organismos atualmente conhecida, pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis têm permitido a seleção, ou a persistência, de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos e são classificados em (MADIGAN et al., 2003):

- a)Termofílicos: correspondem a 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 procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e eucariotos (fungos filamentosos);
- b)Termofílicos extremos: que são organismos capazes de crescer em temperaturas entre 65° a 85°C. Esse grupo é representado pelos procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea;
- c)Hipertermofílicos: correspondem a Archeobactérias com capacidade de crescer a 85° até 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). Os organismos termofílicos apresentam algumas adaptações que permitem o seu crescimento sob altas temperaturas. Suas enzimas e proteínas são muito mais estáveis ao calor que as presentes nos organismos mesofílicos

e atuam otimamente sob altas temperaturas (PELCZAR et al., 1996)

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, *Fervidobacterium pennavorans* e *Thermotoga marítima* (MADIGAN et al., 2003).

Entre os eucariotos, poucas espécies conseguem crescer entre 45° a 55°C. Essa maior termoestabilidade deve-se mais ao seu sistema de membrana, do que a termoestabilidade enzimática. Apenas 30 espécies de fungos, entre as 50.000, descritas crescem entre 40° e 45°C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60° e 62°C (MAHESHWARI et al., 2000).

O fungo termofílico *Mucor pusillus* foi isolado há um século quando Hugo Miehe estudou a microflora de pilha de compostagem de resíduos agrícolas. O autor comparou a capacidade de gerar calor de fungos termofílicos e mesofílicos, avaliando o aumento da temperatura do material sólido inoculado com culturas mesofílicas e termofílicas e demonstrou que a temperatura máxima de aquecimento depende da temperatura máxima de crescimento da linhagem (MAHESHWARI et al., 2000).

As temperaturas elevadas só são encontradas na natureza em algumas áreas restritas, como regiões vulcânicas e fontes termais. Fora desses ambientes, são observadas em solos completamente expostos à luz solar, onde a temperatura pode chegar a 50°C, e em pilhas de material em decomposição, cuja temperatura no seu interior geralmente atinge 60 a 80°C (VIEILLE; ZEIKUS, 2001). Os fungos termofílicos desenvolvem-se em processos de compostagem durante a fase de alta temperatura (acima de 40°C), que sucede a microflora mesofílica. Num processo de compostagem, pode-se distinguir três fases: na primeira fase, a microbiota mesofílica cresce com rapidez e assimila, de preferência, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de mais fácil acesso, que geram calor através das reações metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura para mais ou menos 40°C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesofílicos e estimula a germinação dos esporos dos fungos termofílicos, iniciando a segunda fase do processo. Nessa etapa, as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, já estariam exauridas, restando os polissacarídeos constituintes da biomassa, como a celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas

extracelulares. O resultado desse processo é a degradação do material vegetal a polímeros menores e um aumento da temperatura para próximo de 60°C. A terceira fase do processo caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução de atividade bioquímica no material (MAHESHWARI et al.; 2000).

Espera-se que fungos termofílicos decompositores de material vegetal produzam pectinases. Entretanto, poucos fungos termofílicos pectinolíticos têm sido isolados (MAHESHWARI et al., 2000). Alguns fungos termofílicos não conseguem utilizar a celulose como fonte de carbono, como *T. lanuginosus*, *Talaromyces duponte* e *M. pusillus*. Os organismos que não degradam a celulose 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. Alguns fungos como, *Humicola insolens*, não degradam celulose, mas são capazes de usar a xilana como fonte de carbono, crescendo melhor sobre esse polímero do que em meio com açúcares mais simples (SINGH et al., 2000).

As termozimas, como são chamadas as enzimas termoestáveis, são produzidas por microrganismos termofílicos e hipertermofílicos, as quais apresentam temperatura ótima entre 60°C e 125°C (VIEILLE; ZEIKUS, 2001). Além das enzimas e outras proteínas celulares, a maquinaria de síntese protéica (ribossomos, RNAs e outros componentes), bem como a membrana citoplasmática, são também mais resistentes às temperaturas (TOLNER et al., 1997).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no interesse de produção das termozimas, devido ao grande potencial biotecnológico que apresentam. Elas têm sido usadas em biologia molecular (como a Taq polimerase), adicionadas em detergentes (proteases) e nas indústrias de processamento do amido (α -amilase, glicose-isomerase) e são potencialmente capazes de atuar em outros processos que requerem altas temperaturas (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

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). Poucos relatos são apresentados na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas

(MAHESHWARI et al., 2000, MARTINS et al., 2002, PHUTELA, 2005; KAUR et al., 2004).

Além da temperatura, a produção de enzimas por microrganismos é afetada por diversos outros fatores, como o tipo de processo fermentativo, tempo de incubação, tipo de substrato, umidade, concentração de oxigênio e pH que precisam ser considerados (SCANDURRA et al., 1998).

III.6. Purificação e Propriedades Bioquímicas de Pectinases Microbianas

Em geral as proteínas de interesse biotecnológico estão presentes em fluidos naturais tais como plasma sanguíneo, extratos de tecidos animal ou vegetal, meio de cultura, cultura ou lise celular de microrganismos. Muitas vezes, para possibilitar a utilização destas proteínas na área clínica, ou ainda, no desenvolvimento de pesquisas de base como caracterização físico-química, estudos cristalográficos e outros, há necessidade de isolamento desta proteína das demais moléculas do meio de origem (HO et al., 2000).

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais constitui uma etapa complexa do processo, devido as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos, proteínas e enzimas a proporção de água e componentes inorgânicos. Como resultado dessa variedade de características descritas, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação de aplicação geral. A purificação pode ser dividida em três etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução (PESSOA, et al., 2005).

As proteínas podem ser purificadas através de métodos que se baseiam em certas propriedades características como solubilidade, peso molecular, carga elétrica, polaridade e afinidade por determinados compostos (VOET et al., 2002).

A maior dificuldade nos processos de purificação de proteínas, está em encontrar as melhores estratégias que garantam a preservação de todas as características do produto final necessárias para a sua utilização (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002). Para se

desenhar um protocolo de purificação, outros fatores também devem ser considerados: facilidade na produção da proteína; escala de manufatura necessária à demanda do produto purificado; eficiência do processo em termos de rendimento e fator de purificação; viabilidade econômica (HO *et al.*, 2000).

Diversas metodologias de purificação de pectinases microbianas são descritas na literatura (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).

A caracterização bioquímica enzimática é um passo importante para se estabelecer as condições do processo, pH e temperatura nas quais a enzima se mantém estável. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo, além disso, permite controlar a velocidade do processo variando estes parâmetros no meio reacional.

IV. OBJETIVOS

Com base no exposto, foi desenvolvido um projeto com o objetivo de isolar linhagens de fungos termofílicos a partir de ambientes com temperaturas acima de 40°C, como pilhas de compostagem e depósitos de resíduos agrícolas e agro-industriais; essas linhagens foram cultivadas em FES e FSM para avaliação de seus potenciais de produção de pectinases. Buscou-se ainda, caracterizar e purificar parcialmente as enzimas obtidas, enfocando principalmente suas propriedades de termoestabilidade.

V. MATERIAL E MÉTODOS

V.1 Meios de cultivo

V.1.1 Meio nutriente

Foi utilizado o meio nutriente conforme descrito por Mandels, Sternberg (1976) com pequena modificação: 1% de pectina (Kelco) com 64 – 72% de esterificação; 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,5% de solução de elementos traços (2,2% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1% de H_3BO_3 ; 0,5% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16% de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11% de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5% de EDTA).

V.1.2 Meio para seleção das linhagens

Foi utilizado o meio nutriente descrito no item V.1.1, acrescentando-se 3% de agar (a porcentagem maior de agar que a usual (2%) serviu para diminuir a fluidez do meio a temperaturas mais altas) e 0,4% de cloranfenicol.

V.1.3 Meio para manutenção das culturas selecionadas

As culturas de fungos foram mantidas em meio de Saboraud com 3% de pectina, sob óleo mineral em temperatura ambiente.

V.1.4 Meios para processos fermentativos

Para a fermentação submersa foi utilizado como substrato o meio nutriente sintético descrito no item V.1.1.

Na fermentação em estado sólido foram usados como substratos:

- farelo de trigo (FT) adquirido no mercado, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) fornecido pela Usina de Açúcar e Alcool São Domingos de Catanduva – SP;
- bagaço de laranja industrializado (BL) fornecidos pela Citrovita S/A de Catanduva – SP;
- casca de laranja (CL) fornecidos pela Citrovita S/A de Catanduva – SP. A casca de laranja foi lavada com água corrente, seca a 65°C, moída e peneirada usando peneira para seleção de partículas de 0,1 entre 0,5 mm. As misturas utilizadas foram homogeneizadas e esterilizadas em autoclave a 120° C, por 30 min, sendo os meios identificados como:

meio A - 30% BL e 70% FT;
meio B - 100% FT;
meio C - 50% FT e 50% BL;
meio D - 50% FT e 50% BC;
meio E - 50% BL e 50% BC;
meio F - 40% BL, 40% FT 20% BC;
meio G - 70% BL, 20% BC e 10% FT
meio H - 50% CL e 50% FT

V.2 Isolamento e seleção dos microrganismos

Foi seguido o procedimento de Da Silva (1992). Aproximadamente 0,5g de amostra do material em compostagem foram transferidos diretamente para tubos contendo 4 mL de meio nutriente (item V.1.1). No laboratório, após 48 horas de incubação a 45°C, as amostras foram transferidas, por meio de estrias, para placas de Petri que continham o meio de seleção, amostras essas que foram incubadas a 45°C.

Após surgirem as colônias dos fungos, as mesmas foram separadas com base no aspecto do micélio, cor dos esporos e em outras características do anverso e reverso das colônias. Estas colônias foram reinoculadas, através de estrias, em meio de seleção até a obtenção de culturas puras. Para análise das hifas, corpos de frutificação, esporos e outras características, foram feitos exames microscópicos.

V.3 Identificação das linhagens microbianas

Em nosso laboratório foram realizados os testes preliminares para identificação das linhagens selecionadas.

Foram feitos exames morfológicos das culturas e microcultivo em lâmina para exame de corpo de frutificação (COLLINS; LYNE, 1989; ALEXOPOULOS; MIMS, 1996). Pretendeu-se chegar até a identificação do gênero, quando possível, por estes métodos. Para identificação em nível de espécie e de gêneros menos comuns, recorreremos a laboratório especializado do Instituto de Botânica (São Paulo), no qual foram realizados os testes de identificação apenas para a linhagem escolhida para dar continuidade ao projeto.

V.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento fúngico em meio sólido.

O teste do efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento do fungo em meio sólido foi realizado em placas de petri que continham o meio de cultura descrito no item V.1.2. O fungo foi inoculado por picada no centro das placas, as quais foram incubadas a 27, 35, 45, 50 e 55°C, em estufas contendo sistema de umidificação. A cada 24 horas, durante 3 dias, os diâmetros das colônias foram medidos para a avaliação do crescimento.

V.5 Processos Fermentativos

A fermentação submersa ocorreu em erlenmeyer de 100 mL, contendo 25 mL de meio, o qual foi inoculado com 2 mL de suspensão micelial ou de esporos, e incubados a 45° C sob agitação de 120 rpm, por 120 horas. Após o período de fermentação o material do erlenmeyer foi filtrado a vácuo, utilizando papel Watman nº 1 e o filtrado obtido foi usado como solução enzimática bruta.

A fermentação em estado sólido ocorreu em erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do substrato a 70% de umidade. O material foi inoculado com 5 mL de suspensão micelial ou de esporos em solução nutriente (0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) com 0,5% de solução de elementos traços descrito no item V.1.1. O cultivo ocorreu a 45° C, durante 15 dias. A cada 24 horas foi tomado um erlenmeyer no qual foram adicionados 40 mL de água destilada, sendo, após homogeneização, agitado por 30 min em shaker a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 10000xg durante 15 min a 10° C e o sobrenadante, utilizado como solução enzimática bruta.

V.5 Medida da atividade de poligalacturonases (PG)

A atividade da exo-poligalacturonase foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,0, contendo 1% de pectina (Kelco) com 64% – 72% de esterificação e 0,2 mL de solução enzimática bruta. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura de reação a 50° C por 10 min., foi quantificado pelo método do DNS (3,5 – ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

A atividade de endo-PG foi determinada através da medida da redução da viscosidade de solução de pectina após reação enzimática. Foram incubados volumes de soluções enzimáticas brutas com tampão acetato 0,2M, pH 5,0, contendo pectina, de forma que a concentração final do substrato fosse de 3%. As misturas de reação foram incubadas por 10 min a 50°C. A viscosidade da mistura de reação foi determinada aplicando-se no viscosímetro basic da Fungilab em temperatura de 25°C. O controle foi feito usando mistura de enzima inativada, tampão e pectina em igual proporção à da amostra e foram medidos para cada série de experimento. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução nas condições de ensaio.

V.6 Medida da atividade de Xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada numa mistura contendo 0,9 mL de substrato (solução 0,5% de xilana Birchwood-Sigma em tampão acetato 0,2 M em pH 5,0) e 0,1 mL da solução enzimática bruta, incubada por 10 min a 60 °C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do DNS. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose.

V.7 Medida da atividade de Avicelase e CMCase

A atividade da avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, embora que o substrato utilizado foi solução de avicel (Sigma Co) a 0,5% e a substância redutora quantificada a partir de curva padrão de glicose. O mesmo procedimento foi utilizado para detectar a atividade da CMCase, exceto que o substrato utilizado foi solução de CMC (carboximetilcelulose Sigma Co). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de reação, usando curva padrão de glicose.

V.8 Medida da atividade Amilase

A atividade da amilase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, mas que o substrato utilizado foi solução de amido a 0,5% e a substância redutora

quantificada a partir de curva padrão de glicose. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz deliberar 1 μmol de glicose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de glicose.

V.9 Determinação de proteínas totais

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta foi feita através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina para realização da curva padrão, nas condições de reação.

V.10 Clarificação do extrato enzimático bruto.

As soluções enzimáticas brutas obtidas após 48 horas da FES dos meios A, B, C e E foram submetidas a tratamento com caulin (silicato de alumínio), celite e carvão vegetal ativado em concentrações que variaram de 20 a 60 mg / mL de solução. Após 15 min de incubação a temperatura ambiente (± 25), as soluções enzimáticas brutas foram centrifugadas a 12000 xg / 15 min a 5°C. Foram tomadas alíquotas e medida a atividade de exo-PG, proteínas totais e absorbância (nm) lida em comprimentos de ondas:

Caulin - meio A: 284 nm; meio B: 315 nm; meio C: 290 nm; meio E: 350 nm;

Celite - meio A: 280 nm; meio B: 310 nm; meio C: 287 nm; meio E: 378 nm;

Carvão vegetal ativado - meio A: 343 nm; meio B: 417 nm; meio C: 370 nm; meio E: 389 nm

V.11 Caracterização da Poligalacturonase.

V.11.1 Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima.

O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em tampões 0,2M: acetato-NaOH (pH 3,0 a 5,5), citrato-NaOH (pH 5,5 a 7,0), tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5), sendo dosada a atividade a 60°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 80°C, e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo.

V.11.2 Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de temperatura e pH

A enzima foi mantida por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 90°C. Após esse período, foram tomadas alíquotas para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando a enzima em tampões 0,1M (1:1) com pH variando de 2,5 a 10, em ausência de substrato, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade da enzima.

V.12 Concentração da enzima e separação das frações de PG por cromatografia de filtração em gel.

A solução enzimática bruta foi concentrada usando-se o sistema Quixstand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 KDa em peso molecular em tampão acetato-NaOH 40 mM pH 4,5.

A enzima bruta concentrada foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna contendo resina Sephadex G-75 (Pharmacia). Para a eluição foi usou-se tampão acetato-NaOH 40 mM pH 4,5. O fluxo foi de 10 mL por hora, coletando-se 2,5 mL por tubo. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado por leitura da absorbância a 280 nm. A atividade de poligalacturonase foi determinada nas frações eluídas, conforme metodologia descrita no item V.5.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1. Isolamento e identificação dos fungos

As linhagens fúngicas termofílicas isoladas de material orgânico em compostagem foram purificadas e suas características de cultura e morfologia foram examinadas por microcultivo em lâmina para visualização do corpo de frutificação, as linhagens foram inicialmente identificadas e estão apresentadas na Tabela 2.

Foram feitas 3 coletas na usina de processamento de lixo urbano Constroeste Ltda, de São José do Rio Preto, com um total de 30 amostras, a partir das quais foram isoladas 22 linhagens fúngicas. Na coleta 1, foram feitas 4 amostragens sendo isoladas 2 linhagens fúngicas; na coleta 2, de 15 amostras foram isoladas 13 linhagens e na coleta 3, das 11 amostras tomadas foram isoladas 7 linhagens (Tabela 2). Outra coleta foi realizada na indústria Açúcar Guarani S/A sendo isoladas 10 linhagens em 10 amostras.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos sobre o isolamento de fungos termofílicos, assim como, poucas espécies de fungos termofílicos têm sido descritas (MAHESHWARI et al., 2000; PUCHART et al., 1999; ALVES et al., 2002).

Considerando o número de amostras tomadas pode-se considerar baixo o número de cepas morfologicamente distintas isoladas. Esses resultados indicam uma baixa proporção de fungos termofílicos, levando-se em conta a totalidade de formas microbianas que poderiam estar presentes num ambiente de intensa atividade de biodecomposição. Amostragens nesses mesmos ambientes para isolamento de bactérias, realizadas por Rabalho (2002), levaram a uma média de 8 colônias bacterianas, morfologicamente diferentes, isoladas por amostra coletada.

Conforme descrito por Maheshwari et al. (2000) poucas espécies de fungos termofílicos são conhecidas (cerca de 30 espécies) dentro de um total de mais de 50000 descritas. No processo de compostagem, a temperatura no interior das pilhas atinge de 60 a 80°C e atua como um fator de seleção de formas microbianas, desfavorecendo as formas eucarióticas que são muito mais termolábeis, em função de seus sistemas de membranas e de suas macromoléculas não serem adaptados para tolerar temperaturas acima de 60°C.

Tabela 2: Amostras das coletas na Constroeste e Açúcar Guarani.

AMOSTRAS	GÊNERO	LOCAL DA COLETA	DATA
N 2	Não Identificada	PILHA DE COMPOSTAGEM DE LIXO URBANO CONSTROESTE LTDA	23 / 01
N 4	<i>Thermomyces</i> sp		23 / 01
N 6	<i>Aspergillus</i> sp		03 / 02
N 7.1	<i>Scopulariopsis</i> sp		03 / 02
N 7.2	<i>Rhizomucor pusillus</i>		03 / 02
N 8	<i>Aspergillus fumigatus</i>		03 / 02
N 9	<i>Aspergillus</i> sp		03 / 02
N 12	<i>Aspergillus</i> sp		03 / 02
N 13	<i>Chaetomium</i> sp		03 / 02
N 15	<i>Neosartorya</i> sp		03 / 02
N 16	<i>Thermomyces</i> sp		03 / 02
N 17	Não Identificada		03 / 02
N 18	<i>Thermomyces</i> sp		03 / 02
N 19	<i>Thermomyces</i> sp		03 / 02
N 20	<i>Aspergillus</i> sp		03 / 02
N 21	<i>Thermomyces</i> sp		29 / 04
N 23	<i>Aspergillus</i> sp		29 / 04
N 24	<i>Thermomyces</i> sp		29 / 04
N 25	<i>Thermomyces</i> sp		29 / 04
N 28	<i>Thermomyces</i> sp		29 / 04
N 29	<i>Aspergillus</i> sp		29 / 04
N 30	Não Identificada		29 / 04
N 31	<i>Rhizomucor</i> sp	BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR AÇÚCAR GUARANI S/A	25 / 05
N 32	Não Identificada		25 / 05
N 33	Não Identificada		25 / 05
N 34	Não Identificada		25 / 05
N 35	Não Identificada		25 / 05
N 36	Não Identificada		25 / 05
N 37	<i>Chaetomium</i> sp		25 / 05
N 38	Não Identificada		25 / 05
N 39	Não Identificada		25 / 05
N 40	Não Identificada		25 / 05

Uma vez que as linhagens isoladas foram capazes de crescer em meio com pectina como única fonte de carbono, considera-se que as mesmas sejam produtoras de poligalacturonases. Essa propriedade foi avaliada nos experimentos de fermentação em meios sólido e líquido.

V.2. Produção de pectinases pelas linhagens isoladas em FES e FSM.

Foram feitos testes para a verificação da produção de poligalactugoranase (PG) em fermentação submersa em meio líquido contendo 1% de pectina como fonte de carbono e também em fermentação em estado sólido em meio contendo mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja (meio A).

Todas as linhagens foram capazes de produzir PG, tanto em FES quanto em FSM, cujas atividades estão apresentadas na Tabela 3. Foi usada a cepa termofílica *Thermoascus aurantiacus* 179-5 como referência, visto que a mesma tem mostrado considerável produção de PG em ambos os sistemas fermentativos (MARTINS et al., 2002). As maiores produções da enzima em FSM foram obtidas em meio de cultivo de *Thermomyces* sp N4 (1,8 U/mL) e de *Scopulariopsis* sp N7.1 (0,8 U/mL) porém, esses valores foram mais baixos do o alcançado obtido em meio de cultivo de *T. aurantiacus* 179-5, qual foi de 3,5 U/mL.

Em FES, as maiores atividades de PG foram conseguidas quando as cepas *Aspergillus* sp N12, *Aspergillus* sp N29 e *Rhizomucor* sp N31 foram usadas, obtendo-se 76,1 U/g, 64,7 U/g e 87,3 U/g, respectivamente, valores acima daqueles atingidos por cultivo de *T. aurantiacus* 179-5 que produziu 53,4 U/g. As linhagens de *Aspergillus* sp N6, *Scopulariopsis* sp N7.1 e Ascomiceto N8, também produziram quantidades consideráveis da enzima (44,2 U/g, 53,1 U/g e 48,8 U/g), respectivamente.

Existem poucos trabalhos disponíveis que relatam a produção de pectinases termoestáveis por fungos termofílicos (PHUTELA et al., 2005; SATHISH KUMAR; PALANIVELU, 1999; KAUR et al., 2004; MARTINS et al., 2002; ADAMS; DEPLOEY, 1978).

Tabela 3: Produção de poligalacturonase em FSM e FES pelas linhagens fúngicas em meio A, 45°C.

Linhagens	Tempo (horas)	FSM	FES
		U/mL	U/g
N 2	24	0,47	7,3
	48	0,32	13,6
	72	0,28	19,3
	96	0,1	15
	120	0,1	12,1
<i>Thermomyces</i> sp N 4	24	0,7	1,6
	48	1,8	0,7
	72	0,25	4,6
	96	0,14	3,1
	120	0,12	2,8
<i>Aspergillus</i> sp N 6	24	0,2	2,9
	48	0,3	17,6
	72	0,2	42
	96	0,6	42,9
	120	0,3	44,2
<i>Scopulariopsis</i> sp N 7.1	24	0,08	1,3
	48	0,8	4,7
	72	0,7	39,5
	96	0,7	50
	120	0,5	53,1
Ascomyceto N 7.2	24	ND	46,2
	48	0,01	4,7
	72	0,02	6,8
	96	0,3	22,3
	120	0,3	28,9
Ascomyceto N 8	24	0,3	2,3
	48	0,2	32,2
	72	0,2	48,8
	96	0,2	35,6
	120	0,2	32,8
<i>Aspergillus</i> sp N 9	24	0,14	38,1
	48	0,37	23,9
	72	0,35	43,2
	96	0,12	29,6
	120	0,1	26,2
<i>Aspergillus</i> sp N 12	24	ND	3,4
	48	ND	36,4
	72	ND	76,1
	96	ND	36,2
	120	ND	28
<i>Chaetomium</i> sp N 13	24	ND	2,2
	48	ND	1,3
	72	0,11	4,0
	96	0,16	1,3
	120	0,17	1,0

Tabela 3: continuação.

Linhagens	Tempo (horas)	FSM	FES
<i>Neosartorya</i> sp N 15	24	ND	3,7
	48	ND	30,4
	72	ND	20,3
	96	0,18	11,2
	120	0,29	11,2
<i>Thermomyces</i> sp N 16	24	0,37	1,5
	48	0,29	3,6
	72	0,17	3,7
	96	0,10	4,0
	120	0,11	1,5
N 17	24	ND	5,3
	48	ND	19,0
	72	ND	31,5
	96	ND	11,0
	120	ND	9,4
<i>Thermomyces</i> sp N 18	24	0,02	37,1
	48	0,1	35
	72	0,27	14,7
	96	0,40	3,5
	120	0,41	3,0
<i>Monascus</i> sp N 19	24	0,21	19,2
	48	0,26	35,6
	72	0,33	24,
	96	0,52	11,7
	120	0,5	0,36
N 20	24	0,05	1,34
	48	ND	1,1
	72	ND	0,4
	96	ND	3,5
	120	ND	20
<i>Thermomyces</i> sp N 21	24	ND	15
	48	ND	21,6
	72	ND	27,1
	96	ND	29,9
	120	ND	36,7
<i>Aspergillus</i> sp N 23	24	ND	9,3
	48	ND	14,9
	72	ND	24,1
	96	ND	26,7
	120	ND	36,7
<i>Thermomyces</i> sp N 24	24	0,43	3,6
	48	0,2	37,0
	72	0,1	16,0
	96	0,01	8,4
	120	ND	4,4

Tabela 3: continuação.

Linhagens	Tempo (horas)	FSM	FES
<i>Thermomyces sp</i> N 25	24	ND	5,2
	48	ND	14,4
	72	ND	14,0
	96	ND	11,0
	120	ND	10,0
<i>Thermomyces sp</i> N 28	24	0,9	22,0
	48	0,5	22,6
	72	0,4	17,3
	96	0,2	16,1
	120	0,1	12,9
<i>Aspergillus sp</i> N 29	24	0,59	39,9
	48	0,68	57,8
	72	0,62	58,2
	96	0,58	61,3
	120	0,43	64,7
N 30	24	0,13	1,9
	48	0,22	3,0
	72	0,27	17,3
	96	0,47	9,0
	120	0,41	5,0
<i>Rhizomucor sp</i> N 31	24	0,99	87,3
	48	0,32	74,2
	72	0,52	82,2
	96	0,17	85,7
	120	0,17	57,2
N 32	24	ND	4,9
	48	ND	8,2
	72	ND	7,8
	96	ND	7,2
	120	ND	5,3
N 33	24	0,76	7,3
	48	0,51	10,0
	72	0,13	13,3
	96	ND	13,0
	120	ND	11,0
N 34	24	0,58	21,4
	48	0,47	29,2
	72	0,31	41,9
	96	0,27	35,7
	120	ND	30,1
N 35	24	ND	6,9
	48	ND	9,7
	72	ND	8,1
	96	ND	8,0
	120	ND	8,4

Tabela 3: continuação.

Linhagens	Tempo (horas)	FSM	FES
N 36	24	0,32	34,8
	48	0,49	37,1
	72	0,4	35,1
	96	0,4	29,4
	120	0,2	27
<i>Chaetomium sp</i> N 37	24	0,49	14,7
	48	0,63	19,3
	72	0,59	16,6
	96	0,34	12
	120	0,2	9,3
N 38	24	ND	26,1
	48	ND	27
	72	ND	33,8
	96	ND	32,4
	120	ND	28,3
N 39	24	0,56	21,4
	48	0,63	27,0
	72	0,71	25,1
	96	0,59	22,2
	120	0,33	18,7
N 40	24	ND	29,7
	48	ND	31,3
	72	ND	32,1
	96	ND	27,2
	120	ND	26,4
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 179-5 (Controle)	24	2,3	11,0
	48	3,5	33,9
	72	3,1	22,7
	96	2,6	53,4
	120	1,9	27,2

* ND – Não Detectado

Inamdar (citado por MAHESHWARI 2000) isolou e estudou 40 fungos termofílicos, dos quais, apenas 7 gêneros foram capazes de crescer em meio líquido contendo pectina. Desses a maioria não mostrou atividades de poligalacturonase detectável no meio. Somente a espécie *T. aurantiacus* produziu quantidades consideráveis de pectinase. Várias linhagens diferentes de *Thermomyces lanuginosus* foram estudadas por Puchart et al. (1999), as quais produziram pectinases em substrato contendo pectina citrus e polpa de beterraba. Alves et al. (2002) isolaram 56 linhagens do gênero *Mucor*, totalizando 11 taxons, os quais foram obtidos de fezes de herbívoros, e os resultados demonstram que 96% dos isolados produziram PG.

Kaur et al. (2004) observaram que a produção de poligalacturonase termoestável por uma forma termofílica de *Sporotrichum thermophile* Apinis foi maior depois de 4 dias de FSM (9,0 U/mL) em meio contendo 5% de pectina. Sathish Kumar e Palanivelu (1999) reportaram a produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *T. lanuginosus* em FSM sendo a atividade máxima detectada em cultura de 40 horas (199,8 U/mL), quando o fungo foi cultivado em meio com 1% de pectina e sacarose.

Dados de produção de pectinases por fungos mesofílicos mostraram que *A. niger*, produziu 12 U/g quando cultivado em farelo de trigo (CASTILHO et al., 1999). Moreira et al. (2005) estudaram a produção de pectinase em FSM por *Myrothecium verrucaria* e observaram que ao usarem pectina de laranja associada com outras fontes de carbono, como amido, caseína, xilana e xilana com caseína, aumentou a produção da enzima, sendo obtidas 8,1, 7,6, 9,9, 10,1 U/ml, respectivamente.

Olsson et al. (2003) estudaram a produção de pectinases em FES pelo fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30 em polpa de beterraba e celulose, sendo obtidos os valores de 0,82 U/mL em polpa de beterraba, 0,1 U/mL em celulose e 1 mL em polpa de beterraba mais celulose.

A análise dos dados de produção de PG, apresentada na Tabela 3, deve ser feitas considerando que os parâmetros fermentativos foram fixados e, portanto, as condições de fermentação podem não ter sido as mais adequadas para algumas linhagens. Ainda que, as atividades das enzimas foram determinadas em condições únicas de pH, temperatura e tipo de substrato o que pode ter resultado em atividades sub-estimadas.

Os resultados mostrados na Tabela 3 indicam que a maior produção de PG foi pela linhagem fúngica *Rhizomucor* sp N31 9 (Fig 4) a qual foi escolhida para dar continuidade ao trabalho e a FES como processo fermentativo, considerando a maior produção de pectinases obtida pelo mesmo.



Figura 4: Crescimento do fungo *Rhizomucor* sp N31 em meio ágar com 1% de pectina.

VI.3. Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo *Rhizomucor* sp N31 em meio sólido.

A linhagem N31 foi incubada em diferentes temperaturas medindo-se o diâmetro da colônia a cada 24 horas.

Os dados da Figura 5 indicam que a cepa apresentou um comportamento característico de termófilo, não crescendo a 27°C e com crescimento máximo entre 45 e 50°C. Nota-se um crescimento considerável do fungo a 55°C.

Com base nesses resultados, a temperatura de 45°C foi escolhida para dar continuidade aos ensaios de fermentação em meio sólido.

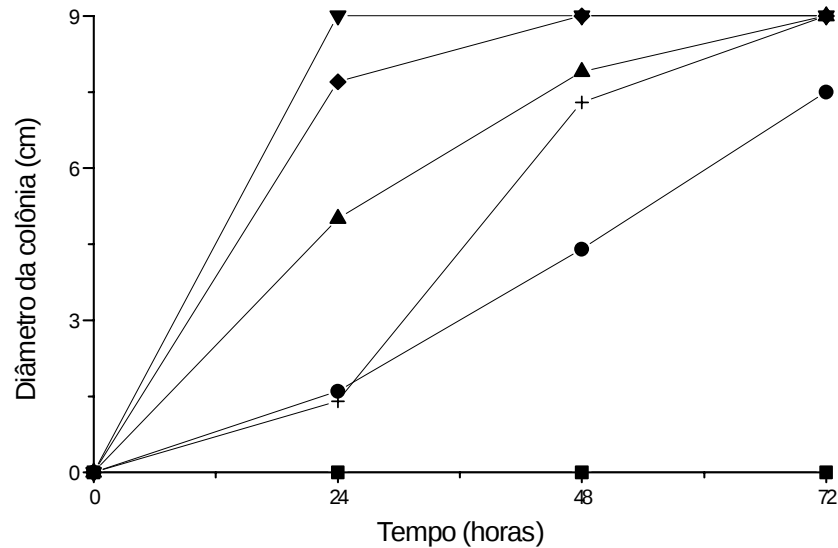


Figura 5: Crescimento do fungo *Rhizomucor* sp N31 em diferentes temperaturas. -■- 27°C; -●- 35°C; -▲- 40°C; -▼- 45°C; -◆- 50°C; -+- 55°C.

VI.4. Produção de exo-PG em FES pelo fungo *Rhizomucor* sp N31.

Foram feitos testes para a seleção do substrato mais adequado para a produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31 em FES (item V.1.4).

Os valores de PG obtidos nos diferentes meios fermentados são mostrados nas Figuras 6 a 11.

No meio B (100% farelo de trigo), a produção atingiu o máximo em 48 horas (98 U/g) e manteve-se constante até 192 horas (Fig. 6). No meio C (50% farelo de trigo e 50% bagaço de laranja), o pico de atividade ocorreu também em 48 horas (105,6 U/g) (Fig. 7), porém, essa atividade foi reduzida gradativamente ao longo do percurso fermentativo. No meio D (50% farelo de trigo e 50% bagaço de cana-de-açúcar) a produção máxima ocorreu em 48 horas com o valor de 110 U/g, Essa atividade diminui progressiva e acentuadamente entre 96 e 288 horas (Fig. 8).

A produção de PG, no meio E (50% bagaço de laranja e 50% bagaço de cana-de-açúcar) mostrou-se semelhante àquela alcançada nos meios B e C quanto ao perfil de produção ao longo do período de fermentação, porém em quantidade bem menor, sendo o pico em 288 horas (39 U/g) (Fig. 9). No meio F (40% farelo de trigo, 40% bagaço de

laranja e 20% bagaço de cana-de-açúcar) a produção de PG foi semelhante àquela do meio D, ou seja, ao longo da fermentação houve apenas um pico em 48 horas com o valor de 107,9 U/g seguido de decréscimo dessa atividade até 288 horas (Fig. 10). No meio G, houve um pico máximo em 48 horas (57,2 U/g) e a atividade manteve-se até 240 horas (Fig. 11).

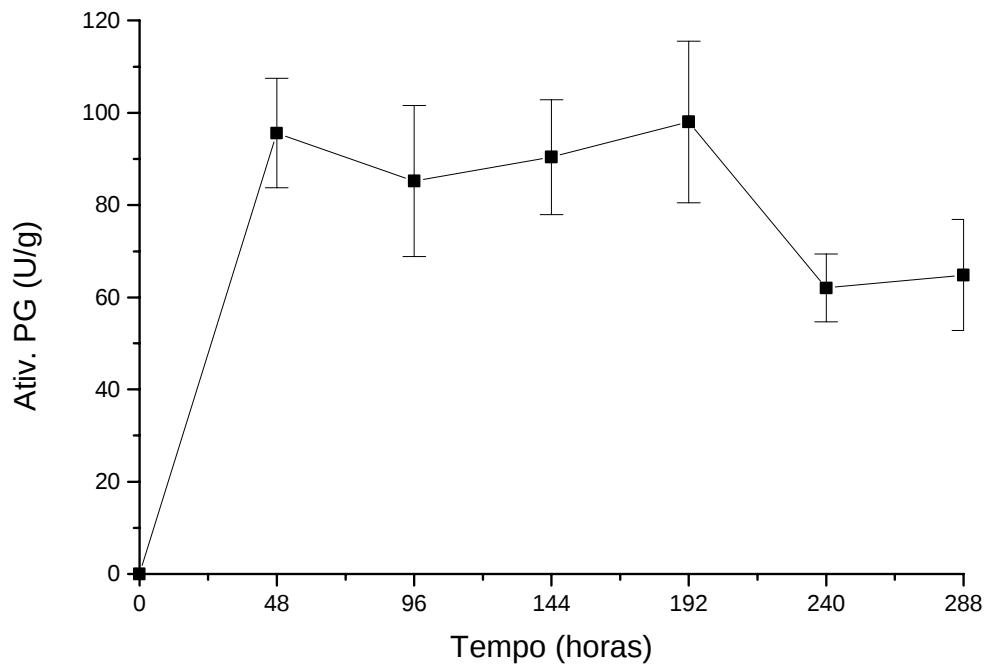


Figura 6: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp n31, através de FES, em 100% farelo de trigo (meio B).

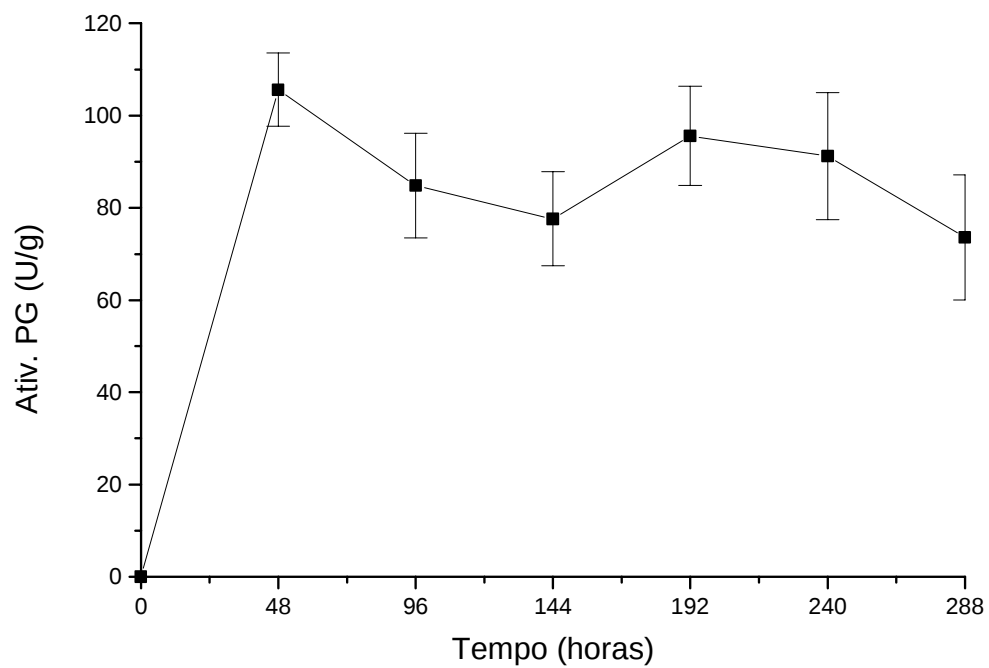


Figura 7: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% farelo de trigo e 50% bagaço de laranja (meio C).

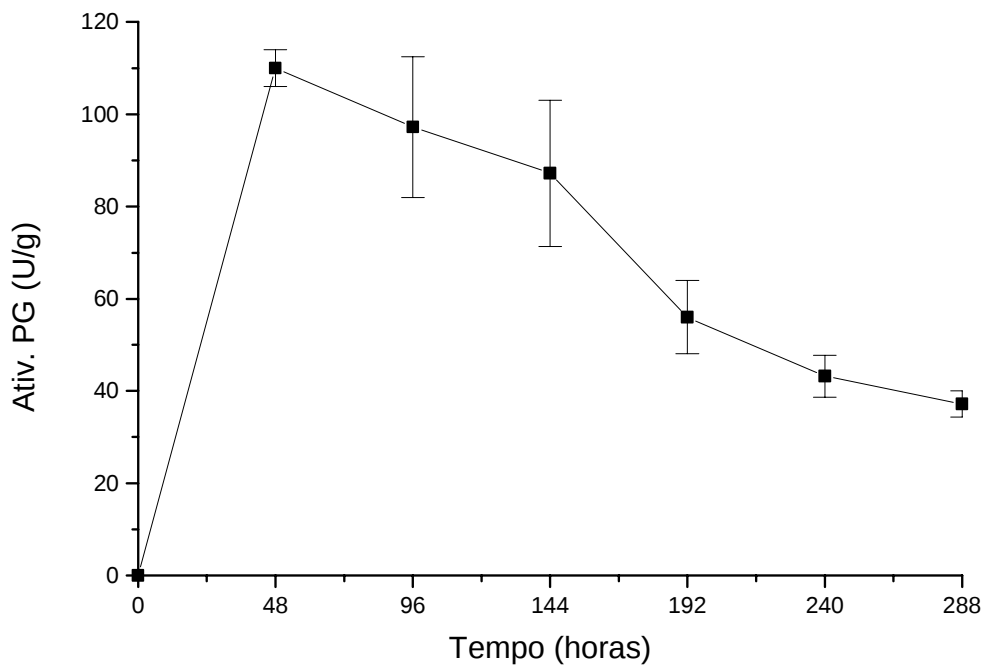


Figura 8: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% farelo de trigo e 50% bagaço de cana-de-açúcar (meio D).

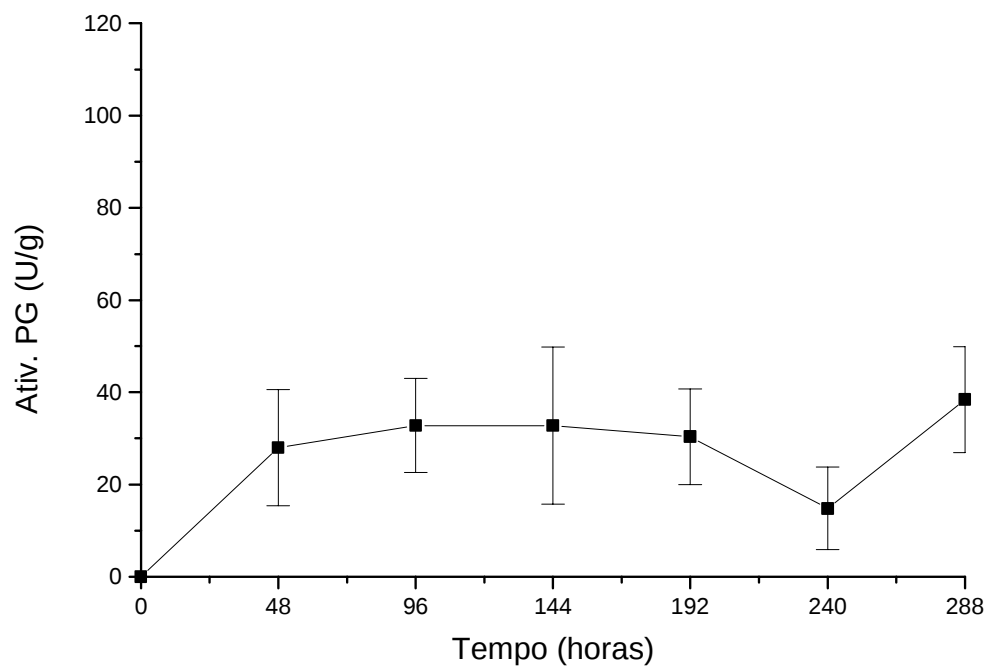


Figura 9: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% bagaço de laranja e 50% bagaço de cana-de-açúcar (meio E).

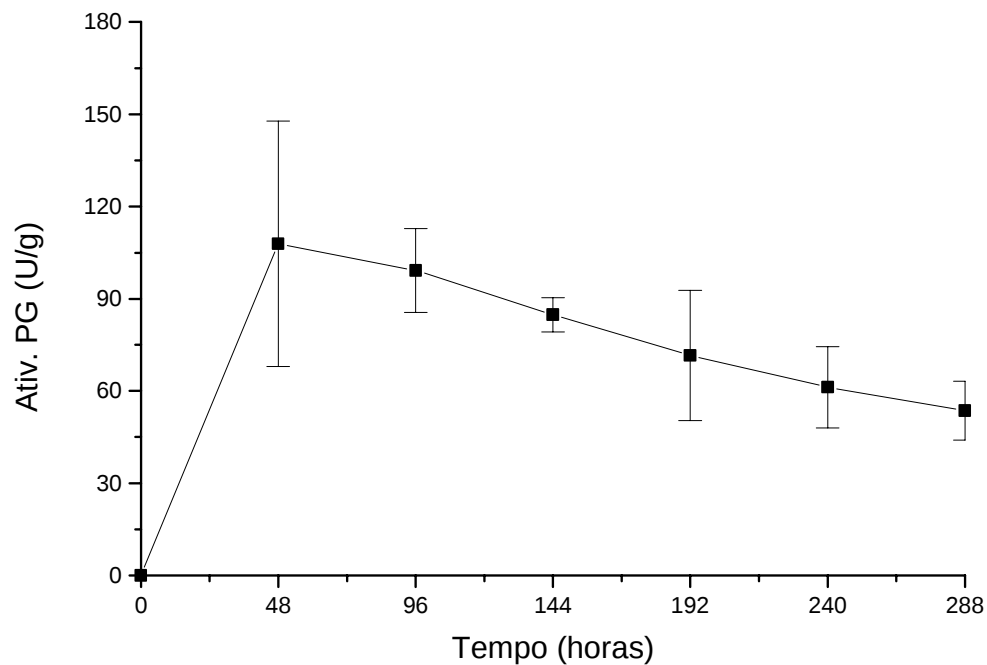


Figura 10: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 40% farelo de trigo, 40% bagaço de laranja e 20% bagaço de cana-de-açúcar (meio F).

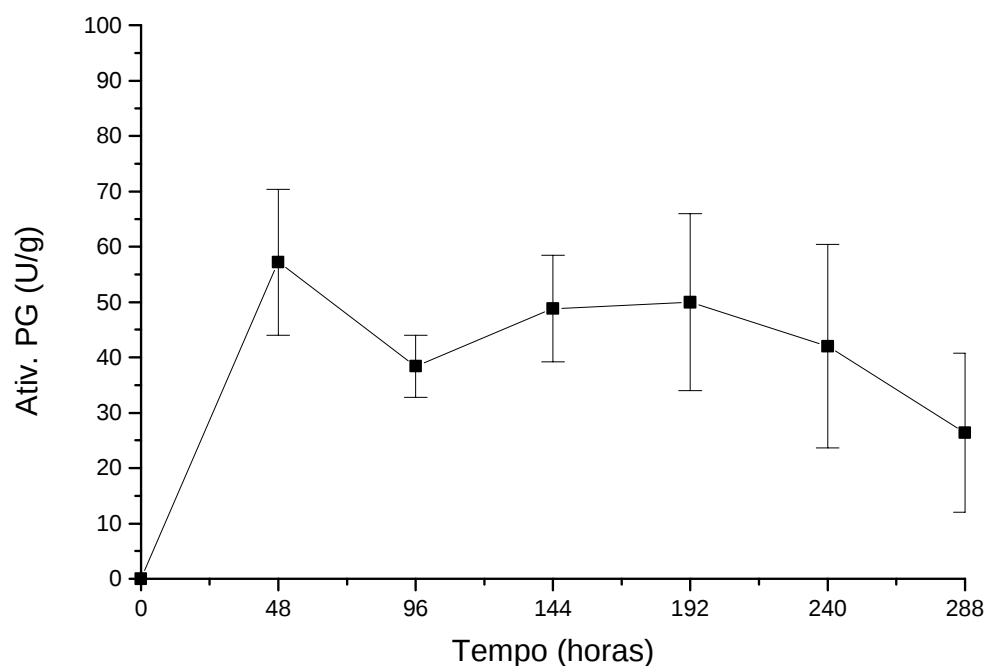


Figura 11: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, por FES, em meio 70% bagaço de laranja, 20% bagaço de cana-de-açúcar e 10% farelo de trigo (meio G).

Os resultados confirmaram que o fungo *Rhizomucor* sp N31 é um bom produtor de PG e que foi capaz de se adaptar aos diferentes meios testados. Ainda, pode-se concluir que, considerando a produção total da enzima (U/g), o tempo de fermentação mais apropriado foi 48 horas.

Deve-se destacar que, embora os picos de produção da enzima tenham ocorrido em 48 horas, a estabilidade da mesma foi muito diferente nos meios testada, sendo a perda da atividade enzimática muito mais acentuada nos meios D (50% de farelo de trigo e 50% bagaço de cana-de-açúcar) e no meio F (40% de farelo de trigo, 40% bagaço de laranja e 20% bagaço de cana-de-açúcar). Essa perda de atividade pode estar relacionada com diversos fatores, além da alta temperatura de incubação. A perda de água dos meios e a presença de proteases podem ter sido responsáveis pela desnaturação da proteína. Entretanto, num sistema complexo com o de FES é difícil inferir qualquer explicação para esse comportamento da enzima. Deve-se considerar também a possibilidade da síntese de isoformas da enzima, ao longo do percurso da fermentação, de forma diferente em função do meio de cultura usado.

Os resultados de produção de PG em diferentes meios estão resumidos na tabela 4, onde são destacados as produções máximas e o tempo de cultivo no qual ocorreu.

Tabela 4: Valores de produção máxima de PG em diferentes meios.

Meio	Produção Máxima (U/g)	Horas de cultivo*
A: 70% farelo de trigo e 30% bagaço de laranja	87,3	24
B: 100% farelo de trigo	98	192
C: 50% farelo de trigo e 50% bagaço de laranja	105,6	48
D: 50% farelo de trigo e 50% bagaço de cana-de-açúcar	110	48
E: 50% bagaço de laranja e 50% bagaço de cana-de-açúcar	40	288
F: 40% bagaço de laranja, 40% farelo de trigo e 20% bagaço de cana-de-açúcar	107,9	48
G: 70% bagaço de laranja, 20% bagaço de cana-de-açúcar e 10% farelo de trigo	57,2	48
H: 50% farelo de trigo e 50% casca de laranja lavada	87,6	96

* Horas em que se observou a produção máxima.

Os meios utilizados proporcionaram, de maneira geral, boa produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, quando comparados com dados da literatura. Substratos contendo farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar têm sido usados com sucesso na obtenção de enzimas pectinolíticas microbianas. Castilho et al. (2000) utilizaram o fungo *A. niger* para a produção de PG através de fermentação em estado sólido em meio contendo misturas de farelo de trigo e farinha de soja, obtendo produção máxima de 18 U/g. Silva et al. (2002) relataram a produção de 55 U/g de PG pela linhagem *P. veridicatum* RFC3 em FES em meio contendo bagaço de laranja e farelo de trigo.

Em estudos de produção de pectinases pela espécie *Rhizopus oryzae* NBRC4707 em fermentação em estado sólido, usando polpa de morango, de maçã e de framboesa foram obtidos 29,4 U/g, 20,1 U/g e 14 U/g de atividade dessa enzima, respectivamente (ZENGH; SHETTY, 2000). Couri et al. (2000), estudaram a produção de poligalacturonase

por *A. niger* 3T5B8 através da fermentação de casca de banana, de manga e farelo de trigo e obtiveram 30,7 U/mL.

Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se considerar as diferenças de metodologia de fermentação e de dosagem de atividades usadas.

A produção de pectinases microbianas tem sido muito estudada, mas a maioria das pesquisas tem focado a produção destas enzimas por linhagens fúngicas mesofílicas, principalmente pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (CASTILHO et al., 2000; COURI et al., 2000; SILVA et al., 2002), enquanto que existem poucos relatos na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI et al., 2000; MARTINS et al., 2002; PHUTELA et al., 2005; SATHISH KUMAR; PALANIVELU, 1999; KAUR et al., 2004; ADAMS; DEPLOEY, 1978). Nesse contexto, os dados aqui apresentados fornecem informações importantes sobre fungos termofílicos pectinolíticos.

Foi também determinada para cada meio, a quantidade de proteínas totais e a partir desses dados, a atividade específica de PG foi calculada (Tabela 5). As maiores atividades específicas foram obtidas nos meios D, E e F, (83, 73,3 e 101,6 U/mg, respectivamente) sugerindo que as presenças de bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar induziram a produção de PG. Tendo-se em conta as atividades totais e específicas, o melhor meio para a produção da enzima foi a mistura de bagaço de laranja, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de laranja tem sido indicado como indutor de pectinase por vários autores (SILVA et al., 2002; MARTINS et al., 2002; MARTIN et al., 2004; RIZZATTO, 1999; ISMAIL, 1996), enquanto o farelo de trigo tem sido considerado um meio completo para o crescimento microbiano em baixa aw, estabelecendo-se como meio referência para cultivos em meio sólido (COURI et al., 2000, SOARES et al., 2001, CASTILHO et al., 2000, SINGH et al., 1999).

Por outro lado, a presença de bagaço de cana-de-açúcar, além de ser fonte de carbono para o crescimento microbiano, visto que o fungo N31 foi capaz de produzir celulasas (ver adiante), pode ter contribuído para diminuir o empacotamento do meio e com isso, permitir melhor aeração e troca de calor no mesmo. A presença de fibras de bagaço de cana-de-açúcar no substrato de fermentação sólida favoreceu a produção de

pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 mesmo em ausência de celulases (SILVA et al., 2002).

Tabela 5: Teores de proteínas totais e atividade específica de PG.

Meio	Tempo (h)	Teor de Proteína (mg/mL)	Ativ. PG (U/mL)	Ativ. Espec. (U/mg)
B	48	0,40	10,9	27
	96	0,59	9,3	15,6
	144	0,52	10,3	19,7
	192	0,44	10,7	24
	240	0,38	7,2	18,5
	288	0,58	12,8	25,2
C	48	0,44	13,9	31
	96	0,53	9,6	17,9
	144	0,62	8,9	14,3
	192	0,48	11	22,9
	240	0,49	13,5	27,5
	288	0,32	10,4	32,5
D	48	0,16	14,1	83
	96	0,14	11	78
	144	0,14	9,5	64,8
	192	0,11	6,3	53,6
	240	0,21	12,7	59,5
	288	0,31	13,9	44
E	48	0,07	5,5	73,3
	96	0,24	5	20,4
	144	0,21	2,6	14,4
	192	0,18	2	11,1
	240	0,20	2,3	11,6
	288	0,23	6,7	28,8
F	48	0,18	18,4	101,6
	96	0,29	14,1	48,1
	144	0,27	8,9	32,9
	192	0,26	6,3	24,2
	240	0,21	6	28,9
	288	0,20	14	71
G	48	0,37	5,5	14,7
	96	0,32	4	12,4
	144	0,46	4,9	10,5
	192	0,35	3	8,5
	240	0,39	8,8	22,2
	288	0,40	5,1	12,7

VI.5. Ensaio para clarificação da solução enzimática obtida em FES.

As soluções enzimáticas obtidas em FES normalmente apresentam coloração escura decorrente de uma possível liberação de derivados de lignina por hidrólise de materiais fibrosos lignocelulósicos ou pela síntese de pigmentos pelo fungo durante a fermentação (SAIZ-JIMENEZ, 1995). Embora não se conheça totalmente a composição química desses complexos coloridos, supõe-se que os mesmos sejam resultados de reações entre derivados fenólicos, açúcares e aminoácidos, favorecidas pelo aquecimento do meio (MARTINS et al., 2003; BURDURLU et al., 2003; YAYLAYAN et al., 1998). Segundo Saiz-Jimenez (1995), em meio de crescimento fúngico, sob baixa umidade e altas temperaturas, são geradas as melanoidinas que são polímeros complexos e escuros, originados de reações entre aminoácidos, carboidratos e derivados fenólicos presentes no meio. Os fungos produzem ainda, por metabolismo secundário, melanina e fenóis como ácido 6-metil-salicílico, ácido orsilínico e antraquinonas. A oxidação desses fenóis a quinonas pode ocorrer espontaneamente em presença de oxigênio. Essas quinonas se polimerizam em pH baixo e em presença de substâncias nitrogenadas, formando polímeros marrons (SEVERINI et al., 2003; BILLAUD et al., 2004).

O clareamento da solução enzimática bruta foi necessário para facilitar as análises de caracterização e purificação da enzima. Deve-se observar ainda, que geralmente, as pectinases são aplicadas na indústria em forma não purificada (preparações enzimáticas) e portanto, uma solução clarificada é requerida. Desse modo, realizou-se ensaios com vários agentes na tentativa de adsorção dos pigmentos presentes na solução enzimática bruta.

Fez-se testes com caulin, celite e carvão vegetal ativado como agentes clarificantes. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 6, o carvão vegetal ativado foi o único que proporcionou o clareamento da solução e não afetou a atividade enzimática.

Tabela 6: Aplicação de caulín, celite e carvão vegetal ativado na clarificação da solução enzimática bruta.

<i>Tratamento</i>	<i>Meio</i>	<i>Concentração do Agente (mg/mL)</i>	<i>Ativ. PG (U/mL)</i>	<i>Teor de proteína (mg/mL)</i>	<i>Ativ. Espec. (U/mg)</i>	<i>Rend</i>	<i>Absorbância*</i>
<i>Caulin</i>	B	0	12,2	0,33	37		0,2983
		20	1,8	0,24	7,4	0,15	0,2973
		30	1,7	0,25	6,7	0,13	0,2963
		40	2	0,29	7	0,16	0,2933
		50	2,8	0,29	9,7	0,23	0,2945
		60	2,2	0,3	7,3	0,18	0,2877
	C	0	11,3	0,34	33		0,3471
		20	1,8	0,25	7,2	0,16	0,3356
		30	2	0,25	8	0,17	0,3465
		40	2	0,22	9,2	0,17	0,3323
		50	1,9	0,24	7,9	0,17	0,3412
		60	1,8	0,27	6,6	0,16	0,3426
	D	0	12,1	0,2	60,6		0,2826
		20	1,9	0,16	12	0,16	0,2800
		30	1	0,14	7,3	0,08	0,2777
		40	0,9	0,1	9	0,07	0,2741
		50	0,8	0,13	6,1	0,06	0,2710
		60	0,8	0,09	9,6	0,06	0,2815
	E	0	10,2	0,25	40,9		0,1285
		20	1,5	0,19	8,2	0,15	0,1185
		30	1,2	0,19	6,5	0,12	0,1111
		40	1,3	0,18	7,3	0,13	0,1101
		50	0,4	0,19	2,1	0,04	0,1148
		60	0,02	0,18	0,13	0,02	0,1189
<i>Celite</i>	B	0	9,5	0,06	158,3		0,3983
		20	9,7	0,09	107,7	1,02	0,3973
		30	10,9	0,09	121,1	1,15	0,3963
		40	10,9	0,09	121,1	1,15	0,3933
		50	9	0,05	180	0,95	0,3945
		60	10,5	0,08	131,2	1,10	0,3877
	C	0	7,65	0,08	95,6		0,4471
		20	6,4	0,09	71,1	0,83	0,4356
		30	7,4	0,09	82,2	0,97	0,4465
		40	8,0	0,11	72,7	1,04	0,4323
		50	7,75	0,07	110,7	1,01	0,4412
		60	7,4	0,08	92,5	0,97	0,4426
	D	0	9,0	0,09	100		0,3826
		20	9,97	0,06	166,1	1,10	0,3800
		30	10,9	0,08	136,2	1,21	0,3777
		40	12,3	0,03	410	1,36	0,3741
		50	10,3	0,03	343,3	1,14	0,3710
		60	11,5	0,06	191,6	1,3	0,3815
	E	0	7,65	0,06	127,5		0,2285
		20	7,8	0,06	130	1,02	0,2185
		30	7,5	0,02	375	0,98	0,2111
		40	8,7	0,06	145	1,14	0,2101
		50	6,6	0,05	132	0,86	0,2148
		60	8,0	0,06	133,3	1,05	0,2189

Tabela 6: continuação

Tratamento	Meio	Concentração do Agente (mg/mL)	Ativ. PG (U/mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Ativ. Espec. (U/mg)	Rend	Absorbância*
Carvão Vegetal Ativado	B	0	14,4	0,09	160,3		0,2128
		20	14,9	0,09	166,2	1,03	0,0946
		30	13,9	0,09	156,2	0,96	0,0649
		40	16,1	0,08	183,7	1,12	0,0537
		50	14,1	0,06	220,8	0,98	0,0400
		60	12,5	0,08	149,1	0,87	0,0354
	C	0	11,6	0,1	116		0,2461
		20	12,9	0,1	129	1,11	0,2063
		30	12,2	0,08	152,5	1,05	0,1814
		40	11,8	0,08	148,1	1,02	0,1622
		50	12,4	0,07	177,1	1,07	0,1291
		60	13,7	0,07	196,4	1,18	0,1151
	D	0	8,5	0,05	169,5		0,1843
		20	14,6	0,04	365	1,72	0,0857
		30	16,5	0,03	550	1,94	0,0718
		40	10,7	0,04	267,5	1,26	0,0572
		50	15,5	0,02	775	1,82	0,0390
		60	14	0,04	350	1,65	0,0385
	E	0	7,65	0,06	127,5		0,2343
		20	7,8	0,06	130	1,02	0,1476
		30	7,5	0,02	375	0,98	0,1322
		40	8,7	0,06	145	1,14	0,1079
		50	6,6	0,05	132	0,86	0,0924
		60	8,0	0,06	133,3	1,05	0,0774

*Absorbância lida em diferentes λ .

V.6. Produção de poligalacturonases em meio contendo casca de laranja lavada e bagaço de laranja industrializado misturados ao farelo de trigo.

Os dados obtidos na primeira etapa do trabalho indicaram o bagaço de laranja industrializado como um possível indutor da produção de pectinases pelo fungo *Rhizomucor* sp N31.

Com base nessa possibilidade, decidiu-se estudar outra forma de resíduo cítrico aqui denominado casca de laranja. A diferença entre o bagaço industrializado e a casca é que o primeiro foi prensado termicamente ($\pm 200^\circ \text{C}$), seco e adicionado carbonato de cálcio (tipo pellets) e o segundo é que a casca de laranja “crua”, triturada, lavada e desidratada ($\pm 65^\circ \text{C}$).

Com relação ao tipo de mistura a ser usada na continuidade do trabalho optou-se por usar apenas bagaço de laranja e farelo de trigo em função da maior atividade específica obtida nesse meio. Foram realizados outros experimentos comparando o meio C (50%

bagaço de laranja industrializado e 50% farelo de trigo) e o meio H (50% casca de laranja e 50% farelo de trigo). Foram feitas amostragens a cada 24 horas, até 96 horas e, a partir de 144 horas, a cada 48 horas.

No meio C, foi obtido uma maior produção de exo – PG e endo-PG em 24 horas de incubação, com atividade máxima de 111,9 U/g e 1150 U/g, respectivamente (Fig. 12) com redução continua dessa atividade até 288 horas. No meio H a atividade de exo-PG iniciou-se em 24 horas e manteve-se inalterada até 192 horas, sendo o valor máximo 87,6 U/g em 96 horas (Fig 13). A atividade de endo-PG nesse foi máxima em 24 horas (1100 U/g) e se manteve até 192 horas.

Durante o processo fermentativo, o consumo de açúcares prontamente assimiláveis presentes em grandes quantidades (1,02 $\mu\text{mol/mL}$) no bagaço de laranja industrializado (BL) promove melhor crescimento fúngico e maior colonização do meio fermentaivo (observação visual) e, conseqüentemente, a produção da enzima foi maior. A casca de laranja lavada (CL) com menores quantidades de açúcares assimiláveis proporcionou menor crescimento do fungo. Entretanto, deve ser observado que as quantidades PGs detectadas não foram muito diferentes nos dois meios.

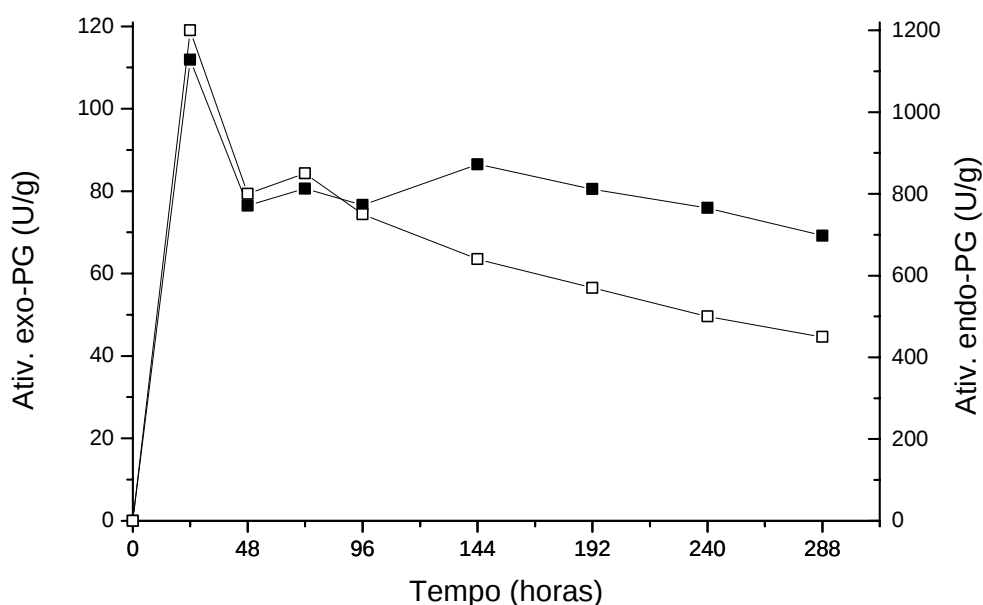


Figura 12: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% bagaço de laranja industrializado e 50% farelo de trigo (meio C).
 -■- exo-PG; -□- endo-PG

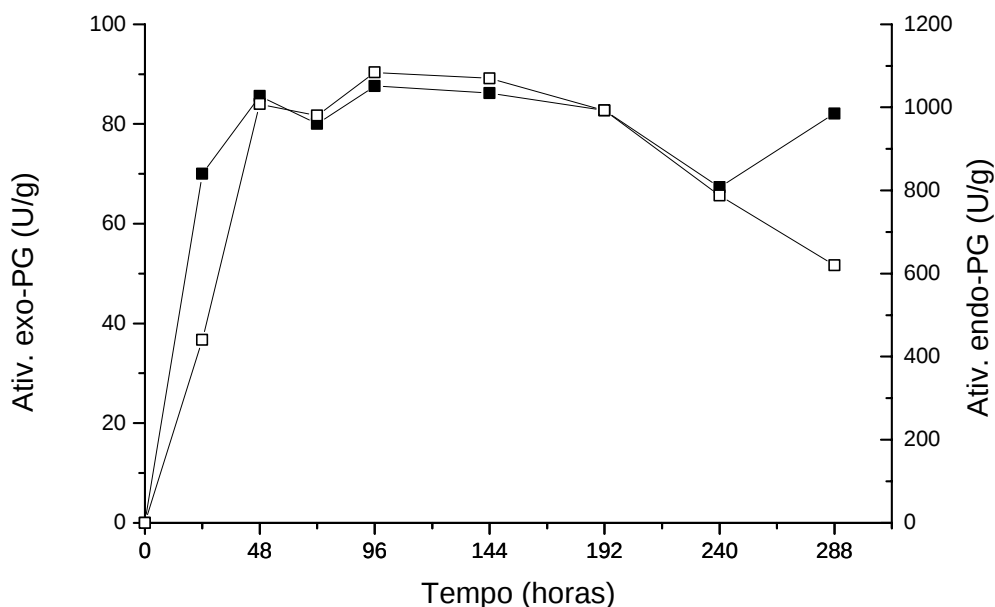


Figura 13: Produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo (meio H). -■- exo-PG; -□- endo-PG

As fermentações utilizando bagaço de laranja industrializado e casca de laranja lavada pelo fungo *Rhizomucor* sp N31 resultaram em altas quantidades de exo-PG quando comparadas com dados da literatura. A produção de poligalacturonase pelo fungo *T. aurantiascus* 179-5 quando cultivado em meio contendo farelo de trigo e bagaço de laranja foi de 43 U/g entre 4 e 6 dias de cultivo (MARTINS et al., 2002). Em estudos de produção de pectinases por *A. niger* em FES contendo farelo de trigo e farelo de arroz como substratos foram obtido 36,3 U/g (DEBING et al., 2005).

Silva et al. (2005) estudaram a produção de exo-PG e endo-PG por *P. viridicatum* RFC3 em FES tendo como substrato bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1) e obtiveram o pico de produção entre 96 e 144 horas com valor máximo de 5,6 U/g de endo-PG e 46,4 U/g para exo-PG em 336 horas.

Phutela et al. (2005) reportaram a produção de poligalacturonase pelo fungo termofílico *Aspergillus fumigatus* em cultivo em estado sólido, na qual obtiveram atividade máxima 473 U/g entre 48 e 72 horas de incubação.

VI.7. Estudo do perfil de produção de outras enzimas despolimerizantes.

Uma vez definidas às condições ótimas para a produção de PG, foram determinadas as atividades de outras enzimas despolimerizantes na solução enzimática bruta obtida por FES no meio H, em 24 horas de fermentação. As enzimas testadas foram xilanase, CMCase, avicelase e amilase. Os resultados estão apresentados na Figura 14.

A produção de xilanase iniciou-se em 48 horas e se estendeu até 192 horas, com atividade máxima de 5,7 U/g, em 192 horas. A produção de amilase foi máxima em 48 horas (18 U/g). A produção de CMCase ocorreu em 24 e 48 horas com a atividade máxima de 8 U/g, enquanto a produção de avicelase ocorreu entre 72 e 240 horas com atividade máxima de 2,5 U/g.

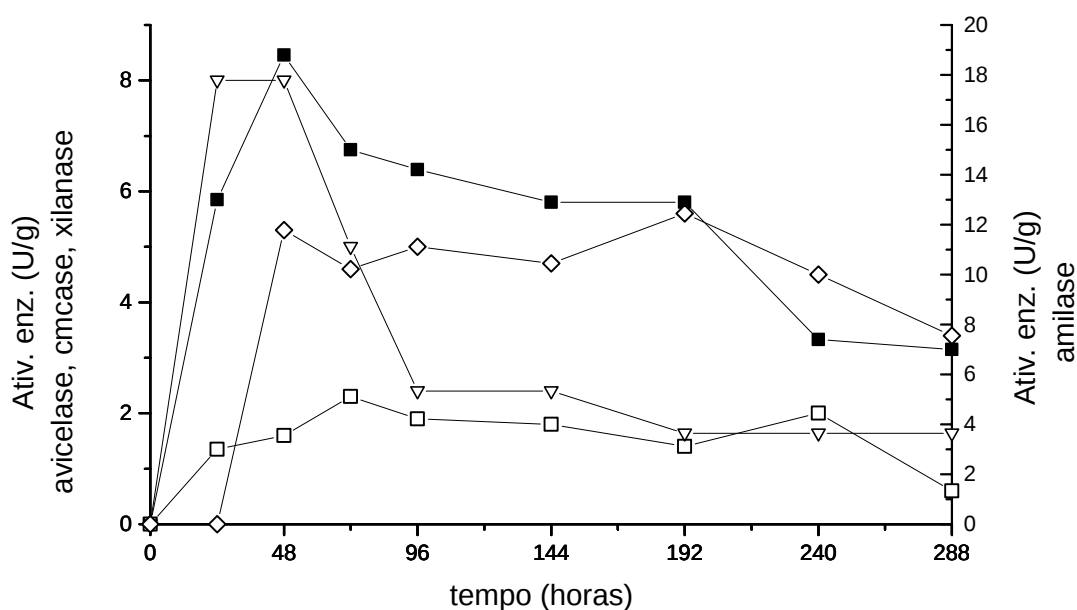


Figura 14: Produção de enzimas despolimerizantes pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES, em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo (meio H). -◇- xilanase; -▽- CMCase; - - Avicelase; -■- Amilase.

Embora com baixa atividade, a presença de endoglucanase (CMCase), xilanase, avicelase e amilase na solução enzimática bruta, indicam que o fungo estudado tem um potencial hemicelulolítico e amilolítico considerável, uma vez que as atividades dessas enzimas não foram determinadas nas condições ótimas para suas atividades e portanto,

os valores apresentados podem estar subestimados.

A produção de um “pool” de enzimas é necessária para o que o microrganismo possa degradar um material complexo no meio ambiente. Por outro lado, o uso de enzimas que atuam na degradação da parede celular vegetal como celulase e xilanase, em um preparado enzimático, aumentam o rendimento de processos de extração de sucos, além de degradarem partículas suspensas nos mesmos durante a clarificação. A ação das amilases é importante na remoção do amido residual do suco de maçã, de banana e de pêra durante a clarificação. As preparações de enzimas comerciais usadas em processamento de suco são conhecidas por conter essas enzimas despolimerizantes (SILVA et al, 2005).

Couri et al. (2000) relataram a produção de xilanase por *A. niger* 3T5B8 através da fermentação de casca de banana, de manga e farelo de trigo e obtiveram 30,6 U/mL. Kalegoris et al. (1999) cultivaram a linhagem *T. Aurantiacus* IMI 216529 em FES utilizando como substrato farelo de trigo, suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, obtendo produção máxima de 6193 U/g. Jain (1995) estudou a produção de xilanase pelo fungo *Melanocarpus albomyces* II-68 em FES em meio contendo farelo de arroz, obtendo atividade máxima de 1084 U/g.

Bahkali (1995) estudou a produção de CMCase e avicelase por *Verticillium tricornis* obtendo atividade 25 U/mL em ambas as enzimas.

A produção de amilase pela linhagem *Mucor* sp A13-36 em FES de meio nutriente com resíduo de mandioca foi estudado por Rabalho (2002) que obteve 40,8 U/g.

A produção de xilanase, CMCase, avicelase e amilase pelo fungo *Rhizomucor* sp N31 demonstra o alto potencial desse fungo para a produção de diversas enzimas, as quais podem ser usadas em diferentes processos industriais. Além disso, diferentes preparados enzimáticos, com grande potencial biotecnológico, podem ser obtidos.

VI.8. Caracterização Bioquímica da PG produzida pelo fungo *Rhizomucor* sp N31.

Os testes para a caracterização bioquímica da PG foram realizados utilizando-se solução enzimática bruta obtida por cultivo do fungo no meio H (50% farelo de trigo e 50% casca de laranja lavada) em 24 horas de fermentação.

VI.8.1 Determinação do pH e temperatura ótima para a atividade de PG.

Com relação a influência do pH na atividade da PG em diferentes tampões, nota-se que, a maior atividade ocorreu na faixa de pH entre 3,5 e 5,0, atingindo atividade máxima em pH 4,0 (Fig 15).

Pela Figura 16 observa-se que a enzima apresentou um perfil típico de enzima termofílica, com atividade muito baixa a 40°C e atividade máxima entre 55-60°C. Em valores mais elevados de temperatura a atividade decresceu, porém, ainda manteve cerca de 56% de sua atividade máxima a 70°C.

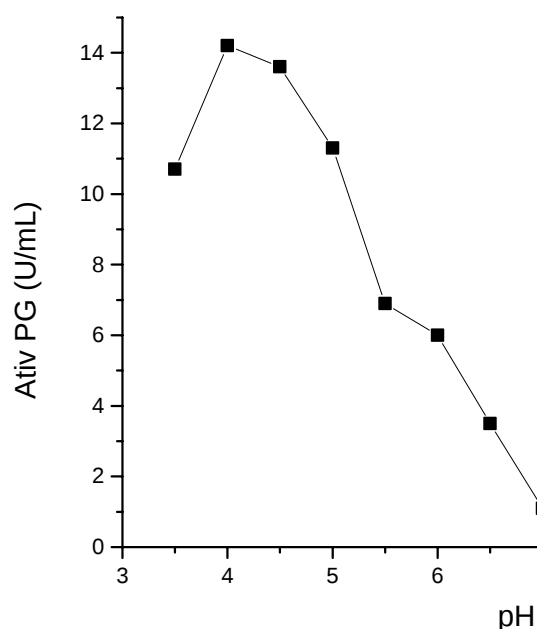


Figura 15: Efeito do pH sobre a atividade de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N31. Tampões: acetato-NaOH 3,5 – 5,5; citrato-NaOH 5,5 – 7,0; Tris-HCl 7,0 – 8,5; glicina-NaOH 8,5 – 10,5. ■ - PG.

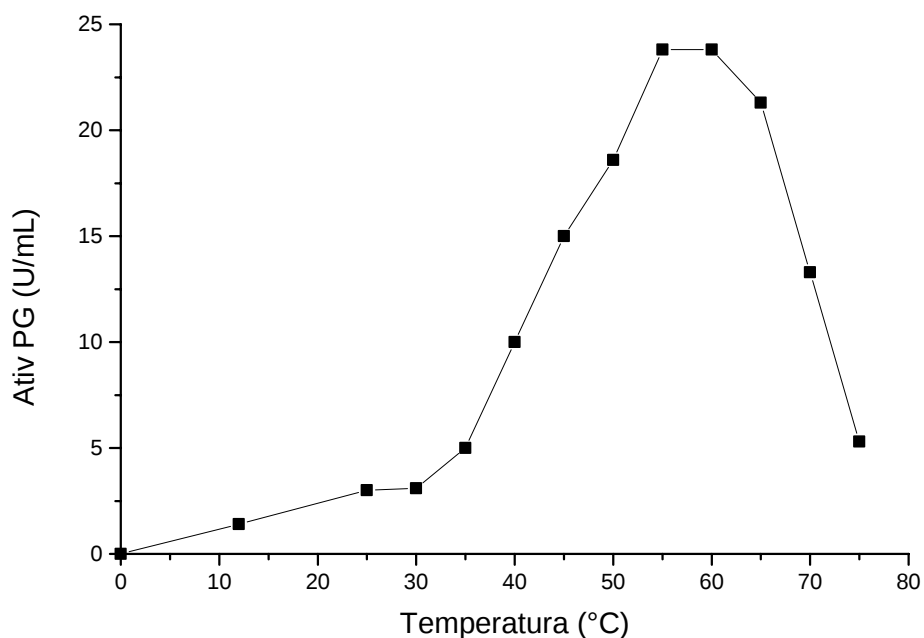


Figura 16: Efeito da temperatura sobre a atividade de PG produzida pelo fungo *Rhizomucor* sp N31. -■- PG.

VI.8.2 Determinação da estabilidade da PG frente a variação de pH e temperatura.

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da PG, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente as variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

A PG mostrou-se estável entre o pH 7,5 e 8,0, apresentando 100% de sua atividade original. Porém, preservou mais de 75% de sua atividade original na faixa de pH 3,5 a 10,0, após a incubação da enzima em tampão sem substrato, por 24 horas a 25° C (Fig 17).

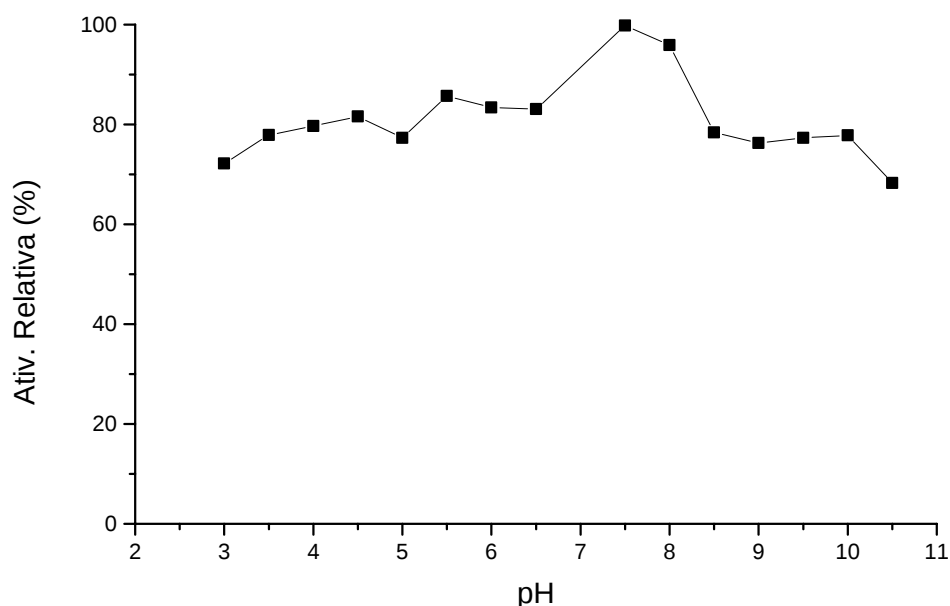


Figura 17: Efeito do pH sobre a estabilidade de PG produzida pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo. Tampões: acetato-NaOH 3,5 – 5,5; citrato-NaOH 5,5 – 7,0; Tris-HCl 7,0 – 8,5; glicina-NaOH 8,5 – 10,5. -■- PG.

Com relação a estabilidade em várias temperaturas, em ausência de substrato, nota-se que a PG manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora na temperatura de 25 e 30°C, decrescendo para cerca de 80% em temperaturas de 40°C a 60°C, ocorrendo uma queda bastante acentuada para 20% em 70°C (Fig 18).

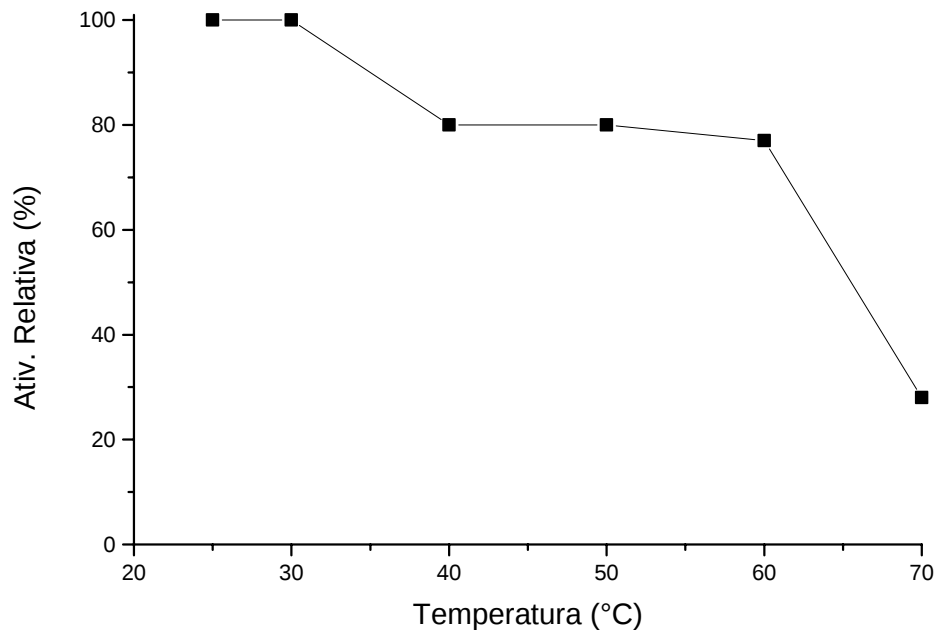


Figura 18: Efeito da temperatura sobre a estabilidade de PG produzida pelo fungo *Rhizomucor* sp N31, através de FES em 50% casca de laranja lavada e 50% farelo de trigo. -■- PG.

Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) relataram uma poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *T. lanuginosus*, para a qual, as condições ótimas de atividade foram pH 5,5 e 60°C. A enzima manteve 100% de sua atividade original após 2 h de incubação a 65°C e reteve 50% de sua atividade após 6 h a 50°C.

Martins et al (2002) produziram poligalacturonase (Pg) por *T. aurantiacus* 179-5 utilizando fermentação em estado sólido com bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono, a qual mostrou atividade máxima em pH 5,0 e a temperatura de 65°C. Esta foi estável na faixa de pH ácida a neutra e a 60°C por 1 h.

Kaur et al (2004) mostraram que a poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo *S. thermophile* Apinis, utilizando fermentação submersa, teve suas condições ótimas de atividade em pH 7,0 e 55°C.

Phutela et al. (2005) descreveram a produção de uma pectinase pelo fungo termofílico *A. fumigatus* cuja atividade máxima ocorreu a 60°C.

VI.9. Purificação Parcial das Poligalacturonases produzidas pelo microrganismo *Rhizomucor* sp N31 por filtração em gel.

Para a obtenção da solução enzimática bruta para ser submetida aos ensaios cromatográficos, foi utilizado o meio H, constituído de farelo de trigo e casca de laranja lavada numa proporção de 1:1, visto que esse meio foi bom indutor da produção de PGs por *Rhizomucor* sp N31. O fungo foi cultivado nesse meio por 24 horas e a atividade máxima de produção da enzima foi de 11,6 U/mL.

Usualmente a primeira etapa de um processo de purificação é a concentração da enzima, que pode ser realizada por ultrafiltração ou ainda por precipitação da enzima, usando solventes como etanol e acetona ou sais como sulfato de amônio.

A concentração foi feita através do sistema Quixstand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 10 KDa em peso molecular, a partir de um volume de 1000 mL de solução enzimática bruta. O material foi concentrado até um volume 160 mL (concentração de 6 vezes).

A atividade da PG no material filtrado foi de 88 U/mL e a recuperação nesse ensaio foi de 121,4% e fator de purificação de 4,27 vezes (Tabela 7).

Um volume de 10 mL da amostra concentrada foi aplicado em coluna Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech) sendo eluidos dois picos com atividade enzimática (Frações I e II). As frações com atividade enzimática foram coletadas entre 150 e 300 mL do volume de eluição (Fig. 19). Esta etapa apresentou um rendimento final de 1,3% e 3,8% e um fator de purificação de 19,6 e 60,5 vezes, respectivamente para as frações I e II (Tabela 7).

Tabela 7: Síntese do processo de purificação da PG em coluna Sephadex G-75 a partir da solução enzimática bruta obtida após 24 horas de cultivo.

Etapa		Volume (mL)	U/mL	U total	Proteína (mg/mL)	Ativ. Espec. (U/mg)	Rend. (100%)	Fator de Purif.
Enzima Bruta		1000	11,6	11600	0,18	64,4	100	1
Concentração		160	88	14080	0,32	275	121,4	4,27
Sephadex G-75	Fração PG - I	21	7,6	147	0,006	1266,6	1,3	19,6
	Fração PG - II	38	11,7	444,6	0,003	3900	3,8	60,5

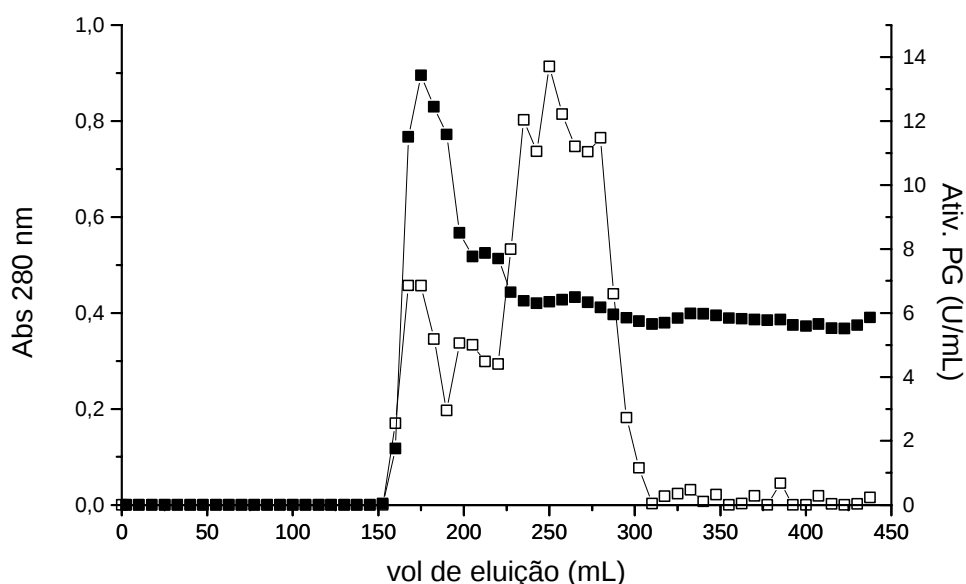


Figura 19: Perfil de eluição da Poligalacturonase bruta em cromatografia de gel filtração, em coluna aberta, utilizando a resina Sephadex G-75. Tampão de eluição acetato de sódio 40 mM, pH 4,5, fluxo de 0,16 mL/min. -■- abs 280 nm; -□- PG.

O processo cromatográfico realizado em resina de filtração em gel Sephadex G-75, apresentou resultados satisfatórios. As duas frações que apresentaram atividade da enzima (PG-I e PG-II) foram separadas e analisadas através da medida da atividade de poligalacturonase através da determinação de açúcar redutor e redução de viscosidade do substrato. A fração PG-I apresentou 7,6 U/mL de exo-PG, com atividade específica de 126,6 U/mg e 8,6 U/mL de endo-PG, com atividade específica de 1433,3 U/mg, enquanto que a fração PG-II foi observado 11,7 U/mL e 11,4 U/mL para exo-PG e endo-PG, respectivamente e com atividade específica de 3900 U/mg para exo-PG e 3800 U/mg para endo-PG (Tabela 8 e figura 20).

Tabela 8: Atividades enzimáticas das frações coletadas na filtração em gel em coluna Sephadex G-75.

Etapa	Proteína (mg/mL)	U/mL exo	Ativ. Espec. (U/mg) exo	U/mL endo	Ativ. Espec. (U/mg) endo
Fração PG - I	0,006	7,6	126,6	8,6	1433,3
Fração PG - II	0,003	11,7	3900	11,4	3800

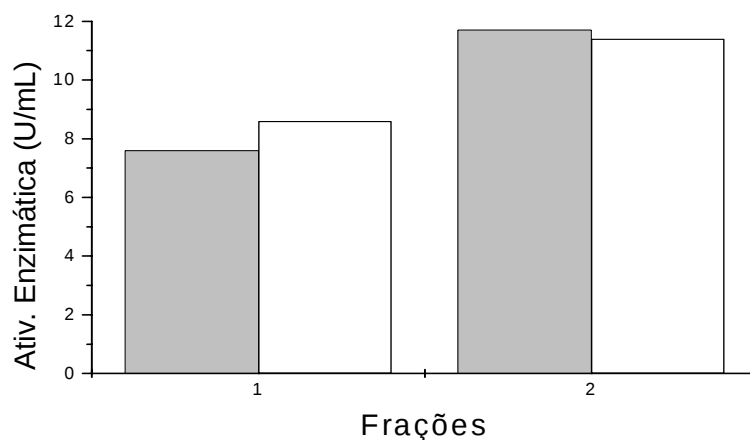


Figura 20: Atividade de poligalacturonase nas frações.
 Medida de atividade enzimática: -■- -açúcar redutor;
 -□- redução de viscosidade.

A comparação desses valores com aqueles reportados para pectinases de outras fontes não é muito significativa porque é muito alta a variabilidade de métodos utilizados entre os laboratórios e também porque as enzimas pectinolíticas diferem uma das outras no que diz respeito ao seu mecanismo de ação.

Os resultados obtidos nesse trabalho apresentaram um fator e rendimento de purificação parcial da poligalacturonase, um pouco abaixo de outros trabalhos com purificação dessa enzima.

Uma poligalacturonase é produzida pelo fungo termofílico *T. lanuginosus* foi purificada até atingir homogeneidade e apresentou um rendimento de 12,7% e um fator de purificação de 5,57 vezes. Primeiro, o extrato enzimático bruto foi submetido a ultrafiltração e a precipitação com acetona e depois a uma cromatografia de troca iônica, DEAE – sepharose (SATHISH-KUMAR; PALANIVELU;1999). PG produzida pela forma termofílica *S. thermophile* Apinis foi parcialmente purificada. A enzima foi precipitada com 30% de saturação de acetona e em seguida dialisada, obtendo-se um rendimento de 22,18% e um fator de purificação de 19 vezes (KAUR et al.;2004).

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. 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 hidroxapatite (SAITO, et al., 2004).

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. Uma exo-PG foi purificada de cultura filtrada de *A. kawachii* IFO 4033 com um fator de purificação de 400 vezes e um rendimento de 40% (ESQUIVEL; VOGEL, 2004).

A separação de frações exo-PG a partir do meio de cultura de *Aspergillus niger* 3T5B, utilizando filtração em gel em Sephadex G-100, levou a obtenção apenas de um pico da atividade enzimática (COELHO et al.; 1995).

VII. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nos permitem concluir que:

1. A partir de amostra de material orgânico em compostagem foi possível o isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases capazes de crescer em temperatura de 45°C com pectina como única fonte de carbono. As linhagens isoladas foram capazes de produzir poligalacturonase em FES e FSM.
2. Misturas de resíduos como farelo de trigo, bagaço de laranja industrializado, casca de laranja lavada e bagaço de cana-de-açúcar foram bons substratos para a produção de pectinases.
3. Entre as linhagens termofílicas isoladas, a zigomiceto *Rhizomucor* sp N31 foi a que proporcionou maior produção de PG.
4. A PG produzida por *Rhizomucor* sp N31 apresentou o pH ótimo de 4,0, temperatura ótima de 55-60°C e manteve-se estável na faixa de pH entre 3,5 e 10,0. A exo-PG foi estável por 1 hora a 60°C (80% de sua atividade original). O extrato enzimático bruto pode ser clarificado com o uso de carvão ativado vegetal sem afetar a atividade da enzima.
5. A linhagem fúngica *Rhizomucor* sp N31, produziu, além das pectinases, outras enzimas hidrolíticas, como xilanase, CMCase, avicelase e amilase, o que demonstra o grande potencial para a produção de complexos enzimáticos passíveis que podem ser utilizados em diferentes processos industriais.
6. A separação da solução enzimática bruta por cromatografia de filtração em gel em resina sephadex G-75 apresentou duas frações de atividade de PG sugerindo que o fungo é capaz de produzir 2 formas diferentes dessa enzima.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. R.; DEPLOEY, J. J. Enzymes produced by thermophilic fungi. **Mycologia**, v. 70, p. 906 – 910, 1978.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.

ALEXOPOULUS, C.J.; MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology** 4th ed. Wiley: USA, 869p., 1996.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, nº 1, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como Purificar Proteínas? O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilha. **Biotecnologia**, 24: 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**, 33: 325-330, 2002

BAHKALI, A. H. Production of cellulose, xylanase and polygalacturonase by *verticillium tricornus* on different substrates. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 171 – 174, 1995.

BILLAUD, C.; MARASCHIN, C.; NICOLAS, J. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by maillard reaction products prepared from glucose or fructose with l-cysteine under various conditions of pH and temperature. **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 69 – 78, 2004

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BURDURLU, H. S.; KARADENIZ, F. Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. **Food Chemistry**, v. 80, p. 91-97, 2003

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

CARR, J. G. **Tea, coffee and cocoa**. In: Wood BJB, editor. Microbiology of fermented foods, v. 2. London: Elsevier Science Ltd.; p. 133-154, 1985

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.

COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F.; COURI, S. Partial purification of polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n.4. p. 318 – 322, 1995.

COLLINS, C.H.; LYNE, P. **Collins & Lyne's Microbiological Methods**, London, Butterworth & co Ltd, 409p., 1989.

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**, 36: 255-261, 2000.

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**, in press, 2005.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase by slurry – state fermentation of lemon pulps.

Bioresource Techonology, v. 83, p. 89 – 94, 2002.

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.

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termotáveis de *Humicola* sp 179-5 e aplicação dessas enzimas**. 1992. 147f. Tese apresentada a Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1992.

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

FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonases from newly isolated thermophilics *Monascus* sp N8 and *Aspergillus* sp N12 by Solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, in press, 2005.

HASUNUMA, T.; FUKUSAKI, E. I.; KOBAYASHI, A. Methanol production is enhaced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. **Journal of Biotechnology**, 106: 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 (12), p. 1422 – 1432, 2001.

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: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotechnologia**, 13, 24-26, 2000

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

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TIWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409-418, 2000.

ISMAIL, A. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 31, n^o 7, p. 645-650, 1996.

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**. 56: 263-271, 2000

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *melanocarpus albomyces* IIS – 68. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705 – 709, 1995.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

KALEGORIS, E.; FOUNTOUKIDES, G.; KEKOS, D. MACRIS, B. J. Design of a solid state fermentation bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 313-315, 1999.

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 setor: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

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

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

LEA, A. G. H. **Enzymes in production of beverages and fruit juices**. In: Tucker, G. A.; Woods, L. F. J., *Enzymes in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, pp. 223-249, 1998.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microrganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 10^a 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**, 117: 1-6, 1994.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **Journal of Fermentation Technology**, v.54, p.267-286,1976.

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

MARTINS, S. I. F. S.; BOEKEL, M. A. J. S. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine maillard reaction. **Food Chemistry**, v. 83, p. 135-142, 2003.

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.

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 bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

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

MOREIRA, F. G.; REIS, S.; COSTA, M. A. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *mirothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 7 – 11, 2005.

NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T. YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T.; Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 64: 1729-32, 2000.

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.

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

PELCZAR, M; J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia, Conceitos e Aplicações, v. 1, 2ª ed., S.P.: **Markron Books**, 1996.

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: 63-69, 2005.

PILNIK, W., VORAGEN, A. G. J. **Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture**. In: Reeds, G. (Ed), Food and Science Technology, enzymes in Food Processing, Academic Press, New York, pp. 363-399, 1993.

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.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: Produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca**. Dissertação apresentada na UNESP / IBILCE – São José do Rio Preto, para a obtenção do título de mestre, 2002.

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

RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**. Dissertação apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do título de mestre, 1999.

RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

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

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(1), p. 10-8, 2002.

SALAZAR, L. JAYASINGHE, U. **Fudamentals of purification of plants viruses**. In: Techniques in plant, virology, CIP., Training Manual, J. O, Virus Purification, International Potato Centre, Peru, p. 1-10, 1999.

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.

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

SEVERINI, C.; BAIANO, A.; DE PILLI, T.; ROMANIELLO, R.; DEROSI, A. Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions. **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie**, v. 36, p. 657 – 665, 2003.

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 Microbiolgy Technology**, v. 26(7), 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.

SAIZ-JIMENEZ, C. Microbial melanins in stone monuments. **The Science of the Total Environmental**, v. 167, p. 273-286, 1995.

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

TOLNER, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N.; Adaption of microorganisms and their transport systems to high temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 423 – 428, 1997.

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

VIIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. **Biotechnology in the pulp and paper industry**. In: Rehm H. J., editor. *Biotechnology*. VCH-Wiley; p. 523-546, 2001.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

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**, 86: 1160-1166, 1996.

YAYLAYAN, V. A.; KAMINSKY, E. Isolation and structural analysis of maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. **Food Chemistry**, v. 63, p. 25-31, 1998.

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